

# Die Rolle von Sphingobasen in der pflanzlichen Zelltodreaktion



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

vorgelegt von

René Glenz

geboren in  
Darmstadt

Würzburg, 2019

Eingereicht am: 20. Mai 2019

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: PD Dr. Frank Waller

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Becker

Tag des Promotionskolloquiums: 03. September 2019

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Teile dieser Arbeit sind in folgender Veröffentlichung enthalten:**

Glenz, R., Schmalhaus, D., Krischke, M., Müller, M. J. und Waller, F. (2019). Elevated Levels Of Phosphorylated Sphingobases Do Not Antagonize Sphingobase- Or Fumonisin B1-Induced Plant Cell Death. *Plant Cell Physiol*, 60(5):1109–1119.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Pflanzen-Pathogen-Interaktion . . . . .	5
1.1.1 PAMP/MAMP-abhängige Immunität . . . . .	6
1.1.2 Effektor-abhängige Immunität . . . . .	7
1.2 Sphingolipide in Pflanzen . . . . .	8
1.2.1 Unterteilung und Struktur . . . . .	9
1.2.2 Biosynthese und Metabolismus . . . . .	10
1.2.3 Funktionen . . . . .	16
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1 Material . . . . .	24
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Wasser . . . . .	24
2.1.2 Medien . . . . .	24
2.1.3 Organismen . . . . .	26
2.1.4 Primer . . . . .	26
2.1.5 Plasmide . . . . .	27
2.1.6 Sphingolipide . . . . .	27
2.2 Methoden für die Arbeit mit <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	28
2.2.1 Pflanzenanzucht . . . . .	28
2.2.2 Kreuzung von <i>A. thaliana</i> . . . . .	29
2.2.3 Transformation von <i>A. thaliana</i> . . . . .	29
2.2.4 Zelltodmessungen in Blattscheiben . . . . .	29
2.2.5 Trypanblau-Färbung von Blättern . . . . .	30
2.3 Mikrobiologische Methoden . . . . .	30
2.3.1 Bakterienkultur . . . . .	30
2.3.2 Wachstumsassays . . . . .	31
2.4 Molekularbiologische Methoden . . . . .	31
2.4.1 RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe . . . . .	31
2.4.2 cDNA-Synthese . . . . .	32
2.4.3 DNA-Extraktion aus Pflanzengewebe . . . . .	32
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	32
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	33
2.4.6 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) . . . . .	34
2.4.7 Klonierungen . . . . .	35

2.4.8	Transformation von Bakterien . . . . .	37
2.4.9	Plasmid-Präparation . . . . .	38
2.4.10	Restriktionsverdau . . . . .	38
2.4.11	Sequenzierung . . . . .	38
2.5	Analytische Methoden . . . . .	38
2.5.1	Extraktion von Sphingolipiden . . . . .	38
2.5.2	HPLC-Bedingungen . . . . .	39
2.5.3	MS/MS-Bedingungen . . . . .	40
2.6	Statistik . . . . .	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Untersuchungen zum Zelltod nach exogener Zugabe von Sphingobasen in <i>A. thaliana</i> . . . . .	43
3.1.1	Evaluierung des Zelltods nach Behandlung mit LCB . . . . .	43
3.1.2	Zelltod bei gemeinsamer Zugabe von LCB und LCB-P . . . . .	45
3.1.3	Löslichkeit von LCB in organischen Phasen bei Anwesenheit von LCB-P . . . . .	46
3.1.4	Zelltod nach Vorbehandlung mit LCB-P . . . . .	47
3.2	Untersuchungen zum Einfluss von Sphingobasen auf den Pathogen-induzierten Zelltod in <i>A. thaliana</i> . . . . .	48
3.2.1	Einfluss von LCB und LCB-P auf <i>Pseudomonas</i> -induzierten Zelltod in Pflanzen und auf das Wachstum von Bakterien . . . . .	49
3.2.2	Einfluss von LCB und LCB-P auf den AvrRpm1-induzierten Zelltod	51
3.3	Untersuchungen zum Zelltod in <i>A. thaliana</i> -Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus . . . . .	53
3.3.1	Evaluierung des Zelltods nach Zugabe von LCB in Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus . . . . .	54
3.3.2	Evaluierung des FB <sub>1</sub> -induzierten Effekts auf das Wachstum in Mu- tanten des LCB/LCB-P-Metabolismus . . . . .	55
3.3.3	Evaluierung des Zelltods nach Zugabe von FB <sub>1</sub> in Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus . . . . .	58
3.3.4	Analyse des FB <sub>1</sub> -induzierten Zelltods in den <i>knockout</i> -Mutanten <i>dpl1</i>	59
3.3.5	Analyse des FB <sub>1</sub> -induzierten Zelltods bei Überexpression von <i>DPL1</i>	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Zelltodregulation bei exogener Zugabe von nicht-phosphorylierten und phos- phorylierten Sphingobasen . . . . .	64
4.2	Einfluss von Sphingobasen auf Pathogen-induzierten Zelltod in Pflanzen und direkter Effekt auf Bakterien . . . . .	67

---

4.3	Zelltodregulation in Mutanten von Enzymen des Metabolismus von LCBs/LCB-Ps . . . . .	71
4.4	Zelltodregulation in Mutanten der LCB-P-Lyase DPL1 nach Behandlung mit FB <sub>1</sub> . . . . .	74
4.5	Ausblick . . . . .	76
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Anhang</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>117</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAL	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
ACD	<i>Accelerated Cell Death</i>
ACER	alkalische Ceramidase
ANOVA	univariate Varianzanalyse
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
gDNA	genomische DNA
Cer	Ceramid
Cer-P	Ceramid-1-Phosphat
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia 0
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
Ctrl	Kontrolle
d18:0	Dihydrosphingosin/Sphinganin
d18:0-P	Dihydrosphingosin-1-Phosphat
d18:1	Sphingosin
d18:1-P	Sphingosin-1-Phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPL	Dihydrosphingosin-1-Phosphat-Lyase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Est	β-Estradiol
ETI	Effektor-abhängige Immunität
FB <sub>1</sub>	Fumonisin B <sub>1</sub>
FG	Frischgewicht
flg22	Flagellin-Motiv mit 22 Aminosäuren
×g	vielfaches der Erdbeschleunigung
(G)IPC	(Glycosyl)inositolphosphoceramid
GlcCer	Glycosylceramid
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	<i>hypersensitive response</i> (hypersensitive Antwort)
KB	King's B
KBE	koloniebildende Einheit
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCB	<i>long-chain base</i> (nicht-phosphorylierte Sphingobase)
LCB-P	<i>long-chain base phosphate</i> (phosphorylierte Sphingobase)
LOH	<i>LAG One Homolog</i>



---

M	Molarität (mol/l)
MAPK/MPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NCER	neutrale Ceramidase
nd	nicht detektierbar
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAMP/MAMP/DAMP	<i>pathogen/microbe/damage-associated molecular pattern</i>
PCD	<i>programmed cell death</i> (programmierter Zelltod)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	PAMP-abhängige Immunität
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-PCR
RF	<i>response factor</i>
R-Gene/Proteine	Resistenz-Gene/Proteine
SOC	<i>super optimal broth</i>
SPHK	Sphingosin-Kinase
SPP	Sphingosin-1-Phosphat-Phosphohydrolase
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase
t18:0	Phytosphingosin/4-Hydroxysphinganin
t18:0-P	Phytosphingosin-1-Phosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
VPE	<i>Vacuolar Processing Enzyme</i>
VLCFA/FA	<i>(very long-chain) fatty acid</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
w/v	<i>weight per volume</i> (Massenprozent)
YEB	<i>yeast extract broth</i>



## Zusammenfassung

Sphingobasen bilden das Grundgerüst und die Ausgangsbausteine für die Biosynthese von Sphingolipiden. Während komplexere Sphingolipide einen wichtigen Bestandteil von eukaryotischen Membranen bilden, sind Sphingobasen, die auch als *long-chain bases* (LCBs) bezeichnet werden, als Signalmoleküle bei zellulären Prozessen in Eukaryoten bekannt. Im tierischen System wurden antagonistische Effekte von nicht-phosphorylierten Sphingobasen (LCBs) und ihren phosphorylierten Gegenstücken (LCB-Ps) bei vielen Zellfunktionen, insbesondere der Apoptose, nachgewiesen und die zugrundeliegenden Signalwege umfassend aufgeklärt. Im Gegensatz dazu sind in Pflanzen weniger Belege für einen antagonistischen Effekt und mögliche Signaltransduktionsmechanismen bekannt. Für eine regulatorische Funktion von Sphingobasen beim programmierten Zelltod (PCD) in Pflanzen existieren mehrere Hinweise: (I) Mutationen in Genen, die den Sphingobasen-Metabolismus betreffen, führen zum Teil zu spontanem PCD und veränderten Zelltodreaktionen. (II) Die Gehalte von LCBs sind bei verschiedenen Zelltod-auslösenden Bedingungen erhöht. (III) Nekrotrophe Pathogene produzieren Toxine, wie Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), die mit dem Sphingolipid-Metabolismus der Wirtspflanze interferieren, was wiederum die Ursache für den dadurch ausgelösten PCD darstellt. (IV) Die Behandlung von Pflanzen mit LCBs, nicht aber mit LCB-Ps, führt zu Zelltod.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Sphingobasen in der pflanzlichen Zelltodreaktion untersucht, wobei der Fokus auf der Überprüfung der Hypothese eines antagonistischen, Zelltod-hemmenden Effekts von LCB-Ps lag. Anhand von Leitfähigkeit-basierten Messungen bei Blattscheiben von *Arabidopsis thaliana* wurde der durch Behandlung mit LCBs und separater oder gleichzeitiger Zugabe von LCB-Ps auftretende Zelltod bestimmt. Mit dieser Art der Quantifizierung wurde der an anderer Stelle publizierte inhibierende Effekt von LCB-Ps auf den LCB-induzierten Zelltod nachgewiesen. Durch parallele Messung der Spiegel der applizierten Sphingobasen im Gewebe mittels HPLC-MS/MS konnte dieser Antagonismus allerdings auf eine reduzierte Aufnahme der LCB bei Anwesenheit der LCB-P zurückgeführt werden, was auch durch eine zeitlich getrennte Behandlung mit den Sphingobasen bestätigt wurde. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer exogenen Zugabe von LCBs und LCB-Ps auf den durch *Pseudomonas syringae* induzierten Zelltod von *A. thaliana* untersucht. Für LCB-Ps wurde dabei kein Zelltod-hemmender Effekt beobachtet, ebenso wenig wie ein Einfluss von LCB-Ps auf den PCD, der durch rekombinante Expression und Erkennung eines Avirulenzproteins in *Arabidopsis* ausgelöst wurde. Für LCBs wurde dagegen eine direkte antibakterielle Wirkung im Zuge der Experimente mit *P. syringae* gezeigt, die den in einer anderen Publikation beschriebenen inhibierenden Effekt von LCBs auf den Pathogen-induzierten Zelltod in Pflanzen relativiert.

In weiteren Ansätzen wurden *Arabidopsis*-Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus (LCB-Kinase, LCB-P-Phosphatase, LCB-P-Lyase) hinsichtlich veränderter *in-situ*-Spiegel von LCBs/LCB-Ps funktionell charakterisiert. Der Phänotyp der Mutan-

ten gegenüber Fumonisin B<sub>1</sub> wurde zum einen anhand eines Wachstumstests mit Keimlingen und zum anderen anhand des Zelltods von Blattscheiben bestimmt und die dabei akkumulierenden Sphingobasen quantifiziert. Die Sensitivität der verschiedenen Linien gegenüber FB<sub>1</sub> korrelierte eng mit den Spiegeln der LCBs, während hohe Gehalte von LCB-Ps alleine nicht in der Lage waren den Zelltod zu verringern. In einzelnen Mutanten konnte sogar eine Korrelation von stark erhöhten LCB-P-Spiegeln mit einer besonderen Sensitivität gegenüber FB<sub>1</sub> festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die Hypothese eines antagonistischen Effekts von phosphorylierten Sphingobasen beim pflanzlichen Zelltod in Frage. Stattdessen konnte in detaillierten Analysen der Sphingobasen-Spiegel die positive Korrelation der Gehalte von LCBs mit dem Zelltod gezeigt werden. Die hier durchgeführten Experimente liefern damit nicht nur weitere Belege für die Zelltod-fördernde Wirkung von nicht-phosphorylierten Sphingobasen, sondern tragen zum Verständnis der Sphingobasen-Homöostase und des Sphingobasen-induzierten PCD in Pflanzen bei.

## Summary

Sphingobases are the building blocks for the biosynthesis of sphingolipids. While complex sphingolipids form a major part of eukaryotic membranes, sphingobases, which are also called long-chain bases (LCBs), are well-known signaling molecules of cellular processes in eukaryotes. In the animal system, antagonistic effects of nonphosphorylated sphingobases (LCBs) and their phosphorylated counterparts (LCB-Ps) have been reported in many cell functions, with a particular focus on apoptosis, and the underlying signaling pathways have been elucidated in detail. In contrast, few records of an antagonistic effect and the potential signal transduction mechanisms have been established in plants. Several lines of evidence point to a regulatory function of sphingobases in plant programmed cell death (PCD): (i) Mutations in genes related to sphingobase metabolism may cause spontaneous PCD and altered cell death reactions. (ii) Levels of LCBs are increased under different cell death conditions. (iii) Necrotrophic pathogens produce toxins, like fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), interfering with sphingolipid metabolism of the host plant and, thus, causing PCD. (iv) Treatment of plants with LCBs, but not LCB-Ps, induces cell death.

In the present study the role of sphingobases in plant cell death reactions, with a focus on the examination of the hypothesis of an antagonistic cell death-inhibitory effect of LCB-Ps, has been investigated. Using conductivity-based measurements of *Arabidopsis thaliana* leaf discs, cell death induced by treatment with LCBs and separated or combined feeding of LCB-Ps was determined. That kind of quantification allowed the verification of an inhibitory effect of LCB-Ps on LCB-induced cell death, which was published elsewhere. However, by simultaneous measurement of the applied sphingobase levels in the tissue with HPLC-MS/MS, this antagonism could be explained by a reduced uptake of the LCB in the presence of the LCB-P, which was also confirmed by a separated treatment with

the sphingobases. In addition to that an impact of exogenous applied LCBs and LCB-Ps on cell death in *A. thaliana* induced by *Pseudomonas syringae* has been investigated. For LCB-Ps no cell death inhibitory effect was observed. Similarly, there was no impact for LCB-Ps on the cell death induced by recombinant expression of an avirulence protein in *Arabidopsis*. For LCBs, a direct antibacterial effect against *P. syringae* was shown in this work. This puts previous findings of an inhibitory effect of LCBs on pathogen-induced cell death in plants into a new perspective.

In further approaches, *Arabidopsis* mutants of enzymes of the sphingobase metabolism (LCB kinase, LCB-P phosphatase, LCB-P lyase) were functionally characterized with regard to altered *in situ* levels of LCBs/LCB-Ps. The phenotype of the mutants in response to fumonisin B<sub>1</sub> was determined in a growth assay with seedlings, and by cell death measurements in leaf discs, which were accompanied by quantification of sphingobase levels. The sensitivity of different lines to FB<sub>1</sub> was closely correlated with the levels of LCBs, while high contents of LCB-Ps alone were not able to reduce cell death. Some mutants even showed a correlation of highly enhanced LCB-P levels with a pronounced sensitivity to FB<sub>1</sub>.

The results of the present study challenge the hypothesis of an antagonistic effect of phosphorylated sphingobases on plant cell death. Instead, a detailed analysis of sphingobase levels revealed a positive correlation of LCB contents with cell death. The conducted experiments not only provide further evidence for a cell death-promoting effect of non-phosphorylated sphingobases, but also contribute to the comprehension of sphingobase homeostasis, as well as of the sphingobase-induced PCD in plants.

# 1 Einleitung

Für mehrzellige Organismen ist von besonderer Wichtigkeit welche Zellen im Laufe eines Lebenszyklus sterben oder überleben. Die Möglichkeit bestimmte Zellen gezielt absterben zu lassen ist dabei essentiell für die Entwicklung und das Überleben des gesamten jeweiligen Organismus. Der programmierte Zelltod (PCD), als genetisch regulierter Prozess zur Eliminierung bestimmter Zellen, wurde deshalb auch in allen mehrzelligen eukaryotischen Organismen beschrieben (Ameisen, 2002). Mittlerweile wurde programmierter Zelltod zur Populationsregulation auch in einzelligen Eukaryoten und Prokaryoten nachgewiesen, sodass PCD-ähnliche Prozesse in allen Taxa zu finden sind (Allocati *et al.*, 2015). Die Formen und die Regulation des Zelltods sind dabei sehr unterschiedlich und in den meisten Organismen bisher nicht im Detail verstanden. Das beste Verständnis der molekularen Grundlagen der Apoptose, als Form des programmierten Zelltods, wurde in Säugetierzellen erreicht. Die regulatorischen Hintergründe mit pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen, der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol, der folgenden Aktivierung von Caspasen mit Degradierung der zellulären Makromoleküle und DNA-Fragmentierung sind dabei genau untersucht (Nagata, 2018). Neben weiteren Unterteilungen der Apoptose in genauer definierte Signalwege ist programmierter Zelltod, basierend auf den bekannten molekularen Mechanismen und morphologischen Unterscheidungen, in Tieren genau klassifiziert (Galluzi *et al.*, 2018).

In Pflanzen, bei denen weniger über die genauen molekularen Mechanismen und Signalwege bekannt ist als in tierischen Zellen, kann programmierter Zelltod morphologisch in zwei Formen, den vakuolären Zelltod (autolytischer Zelltod) auf der einen Seite und die Nekrose (nicht-autolytischer Zelltod) auf der anderen Seite, unterteilt werden (van Doorn *et al.*, 2011). Im ersten Fall ist der Zelltod gekennzeichnet durch die Bildung und Volumenzunahme von lytischen Vakuolen mit anschließendem Zerreißen des Tonoplasts und Freisetzung von Hydrolasen, was zur Degradierung der Bestandteile des Zytoplasmas führt. Obwohl dabei Enzyme mit Caspase-ähnlicher Funktion, wie beispielsweise VPE (*Vacuolar Processing Enzyme*), eine Rolle spielen, ist dieser Prozess klar gegenüber der in tierischen Zellen vorkommenden Apoptose abzugrenzen (Hara-Nishimura und Hatsugai, 2011). Bei der Nekrose hingegen kommt es zum Zerreißen der Plasmamembran zu einem frühen Zeitpunkt und zum Schrumpfen des Protoplasten, während die Bestandteile des Zytoplasmas weitestgehend nicht degradiert werden (van Doorn *et al.*, 2011). Der nekrotische Zelltod kommt hauptsächlich unter abiotischen oder biotischen Stressbedingungen vor, im Gegensatz zum vakuolären Zelltod, der an Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise Gewebebildung (Aerenchymbildung, eingeschlechtliche Blütenbildung, Blattform) oder Xylogenesen beteiligt ist (Fukuda, 1996; Gunawardena, 2008). Je nach Prozess können bei dieser Form des programmierten Zelltods die Reste der Strukturen von abgestorbenen Zellen mit der Zellwand erhalten bleiben.

Trotz der grundlegenden Einteilung des pflanzlichen PCD in die beiden Formen, vakuolä-

rer und nekrotischer Zelltod, anhand morphologischer Kriterien gibt es einige Beispiele, die nicht eindeutig in diese zwei Kategorien fallen. Diese Prozesse können Merkmale beider Zelltodformen aufweisen. Hierbei ist besonders die hypersensitive Antwort als Form des programmierten Zelltods zu nennen, die bei Interaktion von Pflanzen mit biotrophen Pathogenen auftritt. Die hypersensitive Antwort (HR, *hypersensitive response*) führt nach Erkennung der Pathogene durch die Pflanze zu PCD, wobei die meisten Charakteristika des nekrotischen Zelltods zu erkennen sind. Gleichzeitig wird PCD im Zuge der HR oft auch von Merkmalen des vakuolären Zelltods begleitet, wie der Volumenzunahme von lytischen Vakuolen und Zerstörung des Tonoplasts (van Doorn *et al.*, 2011). Ob die hypersensitive Antwort die Ausbreitung der Pathogene im Wirtsgewebe vermindert oder ob es sich um eine Konsequenz des Befalls handelt, ist seit langem umstritten (Coll *et al.*, 2011; Király *et al.*, 1972). Trotzdem ist auf molekularer Ebene die hypersensitive Antwort die am genauesten charakterisierte Form des programmierten Zelltods in Pflanzen.

## 1.1 Pflanzen-Pathogen-Interaktion

Aufgrund der ortsgebundenen Lebensweise, dem Fehlen eines zirkulären Systems und der Begrenzung von Zellen durch eine Zellwand hat sich in der Evolution von Pflanzen ein Zell-autonomes Immunsystem entwickelt (Coll *et al.*, 2011). Als potenzielles Reservoir von Nährstoffen sind Pflanzen dabei den Mikroorganismen in der Umgebung ausgesetzt, die diese besiedeln und in einer mutualistischen, parasitären oder destruktiven Weise interagieren. Mikroorganismen können dabei je nach Interaktion mit der Wirtspflanze als biotroph, hemibiotroph oder nekrotroph klassifiziert werden. Während biotrophe Parasiten Nährstoffe aus lebenden Zellen beziehen und dabei wenig Schaden bei der Pflanze anrichten, sind nekrotrophe Organismen darauf ausgerichtet durch Sekretion von Toxinen die Wirtszellen zu töten und die Energie aus deren freigesetzten Komponenten zu gewinnen (Oliver und Ipcho, 2004). Hemibiotrophe Phytopathogene, wie zum Beispiel das Bakterium *Pseudomonas syringae*, zeichnen sich hingegen durch eine anfängliche biotrophe Phase mit späterem Wechsel zur Nekrotrophie aus.

Pflanzen sind gegen diese Mikroorganismen durch zwei physische Barrieren geschützt, die vor einer Infektion überwunden werden müssen (Bigeard *et al.*, 2015). Zum einen bietet die der Epidermis von Blättern aufliegende, aus Wachsen und Cutin bestehende Cuticula ein Hindernis für manche Mikroorganismen. Zum anderen vermittelt auch die jede Pflanzenzelle umgebende Zellwand aus Zellulose, Pektin, Hemizellulose, Proteinen und in manchen Fällen Lignin einen Schutz vor biotischem Stress (Hamann, 2012). Zwar können die meisten phytopathogenen Pilze diese Strukturen durchdringen, Bakterien sind jedoch für die Infektion von Blättern auf das Eindringen durch Öffnungen, wie beispielsweise Stomata, angewiesen. Außerdem produzieren Pflanzen kontinuierlich Sekundärmetabolite mit antimikrobieller Aktivität (sogenannte Phytoanticipine), die eine Infektion durch Phytopathogene verhindern können (Osbourn, 1996). Selbst wenn diese konstituti-

ven Schutzmechanismen überwunden werden und es zu einer Infektion der Pflanze kommt, bleibt die pflanzliche Immunantwort für eine Bekämpfung der Pathogene, um ernsthafte Schäden abzuwenden. Im Gegensatz zu Tieren fehlen bei Pflanzen mobile Immunzellen und ein somatisches, adaptives Immunsystem, sodass jede Zelle selbst auf die Infektion reagieren muss. Durch evolutionären Druck auf Pflanzen und Pathogene mit wechselseitiger Resistenzbildung hat sich ein System mit mehreren unterscheidbaren Phasen der Immunantwort entwickelt (Jones und Dangl, 2006).

### 1.1.1 PAMP/MAMP-abhängige Immunität

Unterschiedliche Phytopathogene verwenden verschiedene Methoden zur Infektion von Pflanzen. Wie erwähnt, dringen Bakterien durch Stomata oder Wunden in Blätter ein und kolonisieren den apoplastischen Raum im Gewebe, während Pilze und Oomyceten in einigen Fällen mittels Hyphen in oder zwischen Epidermiszellen eindringen können und spezialisierte Strukturen (Haustorien) ausbilden, um die Wirtszellen zu infiltrieren. Nematoden und Blattläuse können sich dagegen durch das Einstechen von Fortsätzen in die Zellen ernähren (Jones und Dangl, 2006). Die Möglichkeit zur Induktion einer Immunantwort von Pflanzen bietet die Erkennung von sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*). Stammen die erkannten Faktoren hingegen von Mikroorganismen, die nicht zwangsläufig pathogen sind, spricht man auch von Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (MAMP, *microbe-associated molecular pattern*; Ausubel, 2005). Bei PAMPs/MAMPs handelt es sich um evolutionär konservierte Moleküle der Mikroorganismen, wie zum Beispiel bakterielle Proteine (Flagellin), Peptidoglycane, Polysaccharide (Chitin) oder Lipopolysaccharide (Bigeard *et al.*, 2015). Außerdem können auch Fragmente oder Abbauprodukte von anderen Pflanzenzellen wahrgenommen werden, die durch Pathogeninfektion freigesetzt und dementsprechend als Beschädigungs-assoziierte molekulare Muster (DAMP, *damage-associated molecular pattern*) benannt werden. Pflanzen können PAMPs/MAMPs/DAMPs durch Muster-erkennende Rezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) wahrnehmen (Boller und Felix, 2009). Diese Transmembranrezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne für die Bindung des Liganden und meistens aus einer intrazellulären Kinase-Domäne. Das am besten untersuchte Paar aus MAMP/PRR in Pflanzen bildet dabei ein aus 22 Aminosäuren bestehendes Motiv des Flagellins (flg22), das in *Arabidopsis thaliana* von dem Rezeptor FLS2 (*Flagellin Sensing 2*) erkannt wird, der daraufhin mit dem als Korezeptor fungierenden Protein BAK1 (*Brassinosteroid receptor 1-Associated Kinase*) heteromerisiert (Boller und Felix, 2009).

Die Bindung von PAMPs (oder MAMPs, DAMPs) durch PRRs führt zu basaler Immunität in Pflanzen, die als PAMP-abhängige Immunität (PTI, *PAMP-triggered immunity*) bezeichnet wird. Als Folge der Erkennung kommt es zur Öffnung von Ionenkanälen mit schnellem Einstrom von extrazellulären Calcium-Ionen, Bildung von reaktiven



Sauerstoffspezies, Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden (MAPK-Kaskaden), Transkription von spezifischen Abwehrgenen, Zellwandverdickung und Bildung von antimikrobiellen Sekundärmetaboliten, die Phytoalexine genannt werden (Bigeard *et al.*, 2015; Boller und Felix, 2009).

### 1.1.2 Effektor-abhängige Immunität

Da es sich bei PTI um eine basale Immunantwort von Pflanzen handelt, hat sich bei einigen Pathogenen die Fähigkeit entwickelt diese Form der Resistenz zu umgehen oder zu unterdrücken. Dazu übertragen erfolgreiche Pathogene Effektormoleküle in die extrazelluläre Matrix oder in den meisten Fällen direkt in die Wirtszelle. So werden bei Bakterien Effektoren über das Typ-III-Sekretionssystem übertragen, die in der Wirtszelle mit zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Proteindegradierung über das Proteasom, Phytohormon-Signalleitung, Inhibierung der MAPK-Kaskaden oder Genexpression interferieren und so die basale Immunantwort hemmen (Büttner, 2016). Die Virulenz von Pathogenen hängt davon ab, ob Pflanzen in der Lage sind diese Effektoren zu erkennen und die dadurch entstehende Suszeptibilität zu verhindern. So hat sich bei Pflanzen eine Gruppe von R-Proteinen (Resistenz-Proteinen) entwickelt, die Effektoren entweder direkt binden oder indirekt die Modifikationen der Wirtsproteine durch Effektoren erkennen (van der Hooft und Kamoun, 2008) und so zu Effektor-abhängiger Immunität (ETI, *effector-triggered immunity*) führen (Jones und Dangl, 2006). Die R-Proteine sind in den meisten Fällen intrazellulär lokalisiert und bestehen oft aus einer Nukleotid-Bindedomäne (NB) und aus Leucin-reichen Wiederholungsmotiven (LRR, *Leucine-Rich Repeat*; Lukasik und Takken, 2009). Die Koevolution mit gegenseitigem Selektionsdruck auf Pathogene und Pflanzen mit Effektoren oder R-Proteinen und die daraus entstehende Resistenz/Suszeptibilität lässt sich durch das von Jones und Dangl (2006) eingeführte „Zick-Zack-Modell“ der Pflanzenimmunität beschreiben. ETI führt zu einer beschleunigten und verstärkten PTI, was sich üblicherweise in programmiertem Zelltod in Form der hypersensitiven Antwort am Infektionsort zeigt (Jones und Dangl, 2006). Damit kann ETI nur bei (hemi)biotrophen Pathogenen als Resistenzmechanismus wirken, da nekrotrophe Pathogene vom Absterben des Wirtsgewebes profitieren und dieses kolonisieren (Glazebrook, 2005).

Ein Beispiel für ein Effektorprotein aus einem phytopathogenen Bakterium ist AvrRpm1. Dieses Protein wurde ursprünglich als Avirulenzfaktor aus *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* isoliert, der die hypersensitive Antwort in Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) auslöst, die den genetischen Locus des R-Proteins RPM1 (zum Beispiel Ökotyp Col-0) besitzen (Debener *et al.*, 1991). AvrRpm1 interagiert intrazellulär mit dem Wirtsprotein RIN4 (RPM1-*Interacting protein 4*), das einen negativen Regulator der Immunantwort darstellt (Mackey *et al.*, 2002). Durch diese Interaktion kommt es zur Phosphorylierung von RIN4 und diese Veränderung führt zur Aktivierung des R-Proteins RPM1 und somit zur ETI (Chung *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2011). Sowohl das Wirtsprotein RPM1 als auch die Ak-

tivierung desselben durch den Effektor/Avirulenzfaktor AvrRpm1 sind dabei für die ETI in Form der hypersensitiven Antwort notwendig. Trotzdem ist auch die Aktivierung von RPM1 durch andere Effektoren (AvrB) sowie die Erkennung von AvrRpm1 unter Umständen durch weitere R-Proteine (RPS2) möglich (Grant *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2009). Dies verdeutlicht das komplexe Verhältnis der molekularen Mechanismen, die zur HR führen (Belkhadir *et al.*, 2004).

Die morphologischen Merkmale der hypersensitiven Antwort, als besondere Form des programmierten Zelltods, wurden weiter oben bereits beschrieben. Hingegen überschneiden sich die molekularen Mechanismen der HR bei der Effektor-abhängigen Immunität mit denen, die auch mit der PTI in Verbindung gebracht werden. In vielerlei Hinsicht handelt es sich also um die beschleunigten und verstärkten Reaktionen einer basalen Immunität (Coll *et al.*, 2011; Jones und Dangl, 2006). So kommt es neben der Transkription von Abwehrgenen und der Aktivierung von MAPK-Kaskaden auch zum Anstieg von Calcium-Ionen im Zytoplasma. Das wiederum hat Einfluss auf die Produktion von Salicylsäure, Stickstoffmonoxid und die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (Mur *et al.*, 2008; Ogasawara *et al.*, 2008). Das am besten untersuchte Merkmal der HR ist der sprunghafte Anstieg (auch *oxidative burst*) von reaktiven Sauerstoffspezies (zum Beispiel Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikal, Hyperoxid-Anion, Singulett-Sauerstoff) mit deren Bildung durch Peroxidasen und NADPH-Oxidasen an der Plasmamembran oder in den Chloroplasten und Mitochondrien als Nebenprodukt der Elektronentransportketten (Baxter *et al.*, 2014). Der Zelltod könnte als Folge davon durch Lipidperoxidation ausgelöst werden (Mur *et al.*, 2008). Trotz der umfangreichen Untersuchungen zur Regulation der hypersensitiven Antwort und des programmierten Zelltods im Allgemeinen sind die genauen Mechanismen, besonders hinsichtlich der Zelltod-auslösenden Substanzen, in Pflanzen nach wie vor unbekannt. Hinweise für eine wichtige Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltods existieren auch für die Gruppe der Sphingolipide, die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

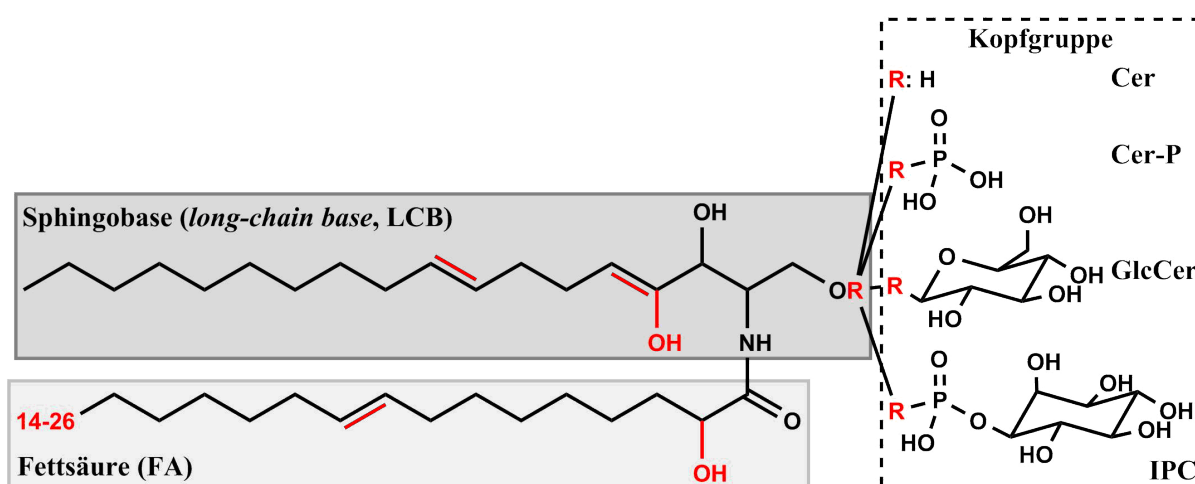
## 1.2 Sphingolipide in Pflanzen

Sphingolipide formen eine wichtige Gruppe von Membran-bildenden Lipiden und Signalmolekülen in eukaryotischen Zellen. Der Name leitet sich vom Begriff der Sphinx ab, aufgrund ihrer zum Zeitpunkt der Entdeckung im Jahr 1884 rätselhaften Natur (Thudichum, 1884). Inzwischen ist bekannt, dass Sphingolipide in allen Eukaryoten und auch in einigen Prokaryoten vorkommen, auch wenn die Anzahl der Bakterienphyta, in denen sich diese Lipide finden, stark eingeschränkt ist (Heaver *et al.*, 2018). Trotz einer Grundstruktur aller Sphingolipide, die im nachfolgenden Abschnitt dargestellt wird, unterscheidet sich die genaue Zusammensetzung teilweise stark zwischen den einzelnen Organismen. Dank des Einsatzes von analytischen Methoden, wie besonders Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS), wurden viele ver-

schiedene Sphingolipide nachgewiesen und weitere sind aufgrund der großen Diversität von Einzelkomponenten denkbar (Pata *et al.*, 2010). So können in Tieren mindestens 500 unterschiedliche Spezies beschrieben werden und in *Arabidopsis thaliana* wurden 168 Sphingolipide gemessen (Futerman und Hannun, 2004; Markham und Jaworski, 2007).

### 1.2.1 Unterteilung und Struktur

Um die Vielfalt der Sphingolipide zu verstehen, muss man sich die Struktur dieser Gruppe der Lipide ansehen. Die Gemeinsamkeit besteht dabei in der Grundstruktur eines Aminoalkohols, der als Sphingobase oder *long-chain base* (LCB) bezeichnet wird. Natürlicherweise in Pflanzen vorkommende Sphingobasen bestehen in der Regel aus 18 C-Atomen und können an der C4- oder C8-Position eine Doppelbindung aufweisen, die sich an der zweiten Stelle hinsichtlich der (*Z*)-(*E*)-Isomerie unterscheiden kann (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Struktur und Bestandteile von Sphingolipiden in Pflanzen.** Komplexe Sphingolipide setzen sich aus der Grundstruktur einer Sphingobase, die auch als *long-chain base* (LCB) bezeichnet wird, einer Fettsäure (FA, *fatty acid*) und einer Kopfgruppe zusammen. Dementsprechend bilden die vier Klassen der Sphingolipide in Pflanzen (I) die freien Sphingobasen (LCB/LCB-P), (II) die Ceramide (Cer/Cer-P), (III) die Glycosylceramide (GlcCer) und (IV) die Inositolphosphoceramide (IPC) beziehungsweise durch weitere Glycosylierung die Glycosylinositolphosphoceramide (GIPC). Die strukturelle Vielfalt ergibt sich zum einen durch die unterschiedliche Glycosylierung der Kopfgruppe und zum anderen durch Modifikationen der LCB oder FA, die in rot gekennzeichnet sind. So kann die FA hinsichtlich Länge, Sättigung und/oder Hydroxylierung variieren. Die Sphingobase mit 18 C-Atomen kann an der C4-Position hydroxyliert oder ungesättigt sein und auch an der C8-Position eine Doppelbindung aufweisen, die in unterschiedlicher (*Z*)-(*E*)-Isomerie (hier in (*E*)-Anordnung) resultieren kann. Abbildung nach Berkey *et al.* (2012); Pata *et al.* (2010).

In Tieren ist Sphingosin (4-Sphingenin) mit einer Doppelbindung an der C4-Position die häufigste LCB, die auch als erste isoliert wurde (Spiegel und Milstien, 2003). Dagegen bildet in Pflanzen und Pilzen Phytosphingosin (4-Hydroxysphinganin) mit einer Hydroxygruppe an der C4-Position die vorherrschende freie Sphingobase (Dickson, 1998; Markham und Jaworski, 2007; Shi *et al.*, 2007). Zur besseren Unterscheidung und Vereinfachung können Sphingobasen auch mit einer Abkürzung benannt werden, wobei ein

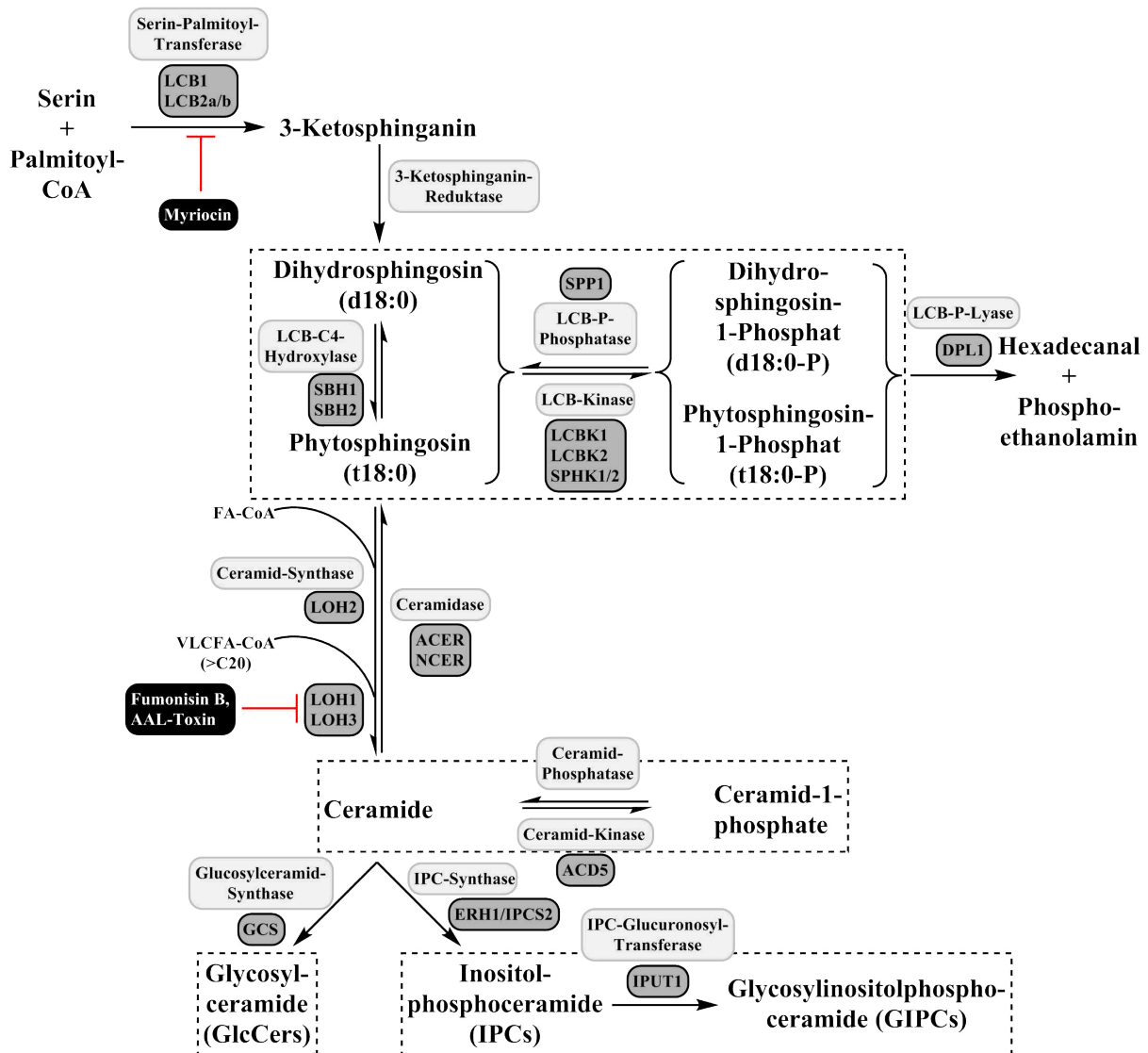
Buchstabe die Anzahl der Hydroxygruppen und zwei Zahlen, die durch einen Doppelpunkt getrennt werden, die Anzahl der C-Atome und Doppelbindungen angibt. Somit wird eine LCB ohne Modifikation an C4- oder C8-Position Dihydrosphingosin (Sphinganin) als d18:0 bezeichnet, während Phytosphingosin als t18:0 und Sphingosin als d18:1 (genauer d18:1<sup>Δ4E</sup>) bezeichnet werden. Diese Art der Benennung wird auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit angewendet.

Durch Acylierung der LCB an der Aminogruppe mit einer Fettsäure (FA, *fatty acid*) entsteht ein Ceramid. Die Fettsäure kann dabei in der Länge variieren und zusätzlich hydroxyliert (Hydroxyceramide) oder ungesättigt sein (Merrill, 2011). Besitzt die FA eine Länge von mehr als 20 Kohlenstoffatomen wird diese auch als VLCFA (*very long-chain fatty acid*) bezeichnet. Für Ceramide kann eine Abkürzung durch Angabe der LCB sowie der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäure verwendet werden (zum Beispiel t18:0-c16:0 als N-Palmitoyl-Phytosphingosin). Sowohl Ceramide als auch freie Sphingobasen können an der C1-Hydroxygruppe phosphoryliert sein (LCB-P oder Cer-P, Abbildung 1). Andere Modifikationen der Kopfgruppe an der C1-Position bei Ceramiden beinhalten die Glycosylierung mit zumeist Glucose oder Mannose (Glycosylceramid, GlcCer) und das Anfügen von (Glycosyl)inositolphosphat ([Glycosyl]inositolphosphoceramid, [G]IPC; Pata *et al.*, 2010; Lynch und Dunn, 2004; Michaelson *et al.*, 2016). (G)IPCs kommen ausschließlich bei Pflanzen und Pilzen vor, während bei Tieren andere komplexe Sphingolipide, wie beispielsweise Sphingomyelin, zu finden sind (Merrill, 2011; Pata *et al.*, 2010). Komplexe Ceramide bilden einen wichtigen Teil von eukaryotischen Membranen, wobei die große Vielfalt aus den Kombinationen der im jeweiligen Organismus vorhandenen LCBs, FAs/VLCFAs und Kopfgruppen resultiert. Die Sphingolipid-Spezies können auch zwischen den einzelnen phylogenetischen Gruppen der Pflanzen, besonders bezüglich des Sphingobasen-Bestandteils, stark variieren (Islam *et al.*, 2012; Pata *et al.*, 2010). GIPCs sowie GlcCers liegen in Pflanzenzellen im Vergleich zu freien LCBs und Ceramiden in weitaus höherer Konzentration (mindestens zehnfach) vor (Markham *et al.*, 2006; Markham und Jaworski, 2007) und machen dabei den größten Teil der unterschiedlichen Sphingolipid-Spezies aus. In nachfolgenden Teilen dieser Arbeit wurde der Begriff „Sphingolipide“ mit den vier Klassen in Pflanzen (LCBs, Cers, GlcCers und [G]IPCs) hingegen oft dazu verwendet, um besonders freie Sphingobasen und Ceramide zusammenzufassen, weil der Fokus hier nicht auf den komplexen Ceramiden (GlcCers, GIPCs) lag.

### 1.2.2 Biosynthese und Metabolismus

Die Bildung der Sphingolipid-Klassen und die weiteren Modifikationen der einzelnen Spezies hängen von einer Vielzahl unterschiedlicher Enzyme ab. Die Hauptschritte der Biosynthese und des Metabolismus von Sphingobasen sind zu einem großen Teil in Tieren, Hefen und Pflanzen konserviert. Daher konnten viele Erkenntnisse aus der grundlegenden Forschung zum Sphingolipid-Metabolismus aus Tieren und Hefe auf Pflanzen übertragen

werden (Dickson, 1998; Dunn *et al.*, 2004; Michaelson *et al.*, 2016). Inzwischen wurden viele der Enzyme, die an Biosynthese und Metabolismus in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind, auch funktionell charakterisiert (Berkey *et al.*, 2012; Michaelson *et al.*, 2016). Die ersten Schritte der *de-novo*-Biosynthese von Sphingolipiden finden im endoplasmatischen Retikulum statt, während die Modifikation der Ceramide zu komplexen Ceramiden im Golgi-Apparat fortgesetzt wird (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Wichtige Schritte des Sphingolipid-Metabolismus in Pflanzen.** Die *de-novo*-Biosynthese von freien Sphingobasen (LCBs) erfolgt durch Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA und nachfolgende weitere Metabolisierung über Dihydrospingosin (d18:0). LCBs können durch vorherige Phosphorylierung an der C1-Position (LCB-Ps) zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin gespalten werden oder durch N-Acylierung mit einer Fettsäure (FA/VLCFA) zu Ceramiden umgesetzt werden. Ceramide können durch Modifikation der C1-Kopfgruppe zu komplexen Ceramiden (GlcCers, [G]IPCs) metabolisiert werden. Die vier Klassen der Sphingolipide sind von gestrichelten Linien umgeben. Die Namen der Enzyme, welche die jeweiligen Reaktionen katalysieren, sind in hellgrauen Boxen, genetisch charakterisierte Enzyme von *Arabidopsis thaliana* in dunkelgrauen Boxen, dargestellt. Mykotoxine, die bestimmte Enzyme des Sphingolipid-Metabolismus inhibieren, sind in schwarzen Boxen angegeben. Abbildung nach Berkey *et al.* (2012); Michaelson *et al.* (2016); Pata *et al.* (2010).

## LCB-Synthese und Metabolisierung

Der erste Schritt der Biosynthese von Sphingolipiden besteht in der Bildung des Grundgerüsts der Sphingobasen (3-Ketosphinganin) durch Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA, die durch das Enzym Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysiert wird (Abbildung 2). Die Bedeutung des Heterodimers SPT als essentielles Enzym und damit auch die Wichtigkeit der Bildung von Sphingolipiden für die Lebensfähigkeit von Zellen wurden durch *knockout*- oder *knockdown*-Mutanten der Untereinheiten LCB1 und LCB2 demonstriert, die zum Absterben des Embryos und des männlichen Gametophyten führen (Chen *et al.*, 2006; Dietrich *et al.*, 2008; Kimberlin *et al.*, 2013; Teng *et al.*, 2008). Außerdem wurden die Proteine ORM1 und ORM2 als Bindepartner und Regulatoren der SPT-Aktivität nicht nur in Hefe, sondern auch in *Arabidopsis*, identifiziert (Kimberlin *et al.*, 2016).

3-Ketosphinganin wird im zweiten Schritt durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Dihydrosphingosin umgesetzt, welches die einfachste LCB in Pflanzen darstellt. Die Modifikation zu verschiedenen LCBs erfolgt ausgehend von Dihydrosphingosin über LCB-C4-Hydroxylasen und Desaturasen. Die exakte Abfolge der Modifikation von freien LCBs oder des Sphingobasen-Bestandteils in Ceramiden ist nicht genau bekannt. Während die Hydroxylierung von Dihydrosphingosin zu Phytosphingosin über LCB-C4-Hydroxylasen vermutlich zum größten Teil direkt bei den freien LCBs erfolgt (Sperling *et al.*, 2001; Peer *et al.*, 2010), modifizieren Desaturasen durch Einfügen von Doppelbindungen an C4- oder C8-Position vermutlich erst den Sphingobasen-Bestandteil von Ceramiden oder komplexen Ceramiden (Michaelson *et al.*, 2009, 2016; Pata *et al.*, 2010). Als LCB-C4-Hydroxylasen wurden in *Arabidopsis* SBH1 und SBH2 (Sphingobasen-Hydroxylase) beschrieben, deren Doppelmutante kein t18:0 bildet und ein stark reduziertes Wachstum und gesteigerte Expression von PCD-assoziierten Genen aufweist (Chen *et al.*, 2008). Außerdem hat der kombinierte *knockout/knockdown* beider Hydroxylasen einen großen Einfluss auf die Ceramid-Zusammensetzung mit einem starken Anstieg von Ceramiden mit d18:0 als LCB und kurzkettigen Fettsäuren (C16), wohingegen die Gehalte von Ceramiden mit VLCFAs abnehmen (Chen *et al.*, 2008). Freie Sphingobasen können an der C1-Hydroxygruppe phosphoryliert werden. Hierfür sind in *Arabidopsis* vier LCB-Kinasen identifiziert (Abbildung 2). Dies sind die Kinasen LCBK1 und LCBK2 (LCB-Kinase) und die Kinasen SPHK1 und SPHK2 (Sphingosin-Kinase), wobei die unterschiedliche Benennung zum Teil aufgrund der homologen Enzyme aus Tieren erfolgte und nicht in Zusammenhang mit der umgesetzten Sphingobase steht. So wurde für LCBK1, SPHK1 und SPHK2 *in vitro* die Phosphorylierung der meisten der in Pflanzen natürlich vorkommenden Sphingobasen (insbesondere d18:0 und t18:0) nachgewiesen (Coursol *et al.*, 2003, 2005; Dutilleul *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2011; Imai und Nishiura, 2005). Bei *SPHK2* handelt es sich außerdem um ein direkt benachbartes Gen von *SPHK1* mit hoher Sequenzähnlichkeit. Die Enzyme werden in unterschiedlichen Geweben der Pflanze exprimiert (Guo *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2017; Worrall *et al.*, 2008). Eine *knockdown*-Mutante von *SPHK1* weist einen reduzierten, eine Überexpressionsmutante einen erhöhten Abscisinsäure-induzierten Sto-

mataschluss auf (Coursol *et al.*, 2003, 2005; Worrall *et al.*, 2008). Für *knockout*-Mutanten von *LCBK2* wurde darüber hinaus von Dutilleul *et al.* (2012) ein abweichendes Verhalten bezüglich der Phosphorylierung von Phytosphingosin und der Aktivierung von MPK6 bei der Antwort von Pflanzen auf niedrige Temperaturen beschrieben.

Die Dephosphorylierung von Sphingobasen kann durch eine LCB-P-Phosphatase erfolgen. Bei Mutanten mit einem *knockout* von *SPP1* (Sphingosin-1-Phosphat-Phosphohydrolase 1) wurden erhöhte Gehalte von Dihydrosphingosin und ein erhöhter Abscisinsäure-induzierter Stomataschluss beobachtet (Nakagawa *et al.*, 2012). Eine Phosphorylierung von LCBs ermöglicht außerdem einen Abbau durch die LCB-P-Lyase DPL1 (Niu *et al.*, 2007; Tsegaye *et al.*, 2007). Obwohl die Gehalte von Sphingobasen in *knockout*-Mutanten dieses Enzyms keine großen Unterschiede zum Wildtyp unter normalen Bedingungen aufweisen (Magnin-Robert *et al.*, 2015; Tsegaye *et al.*, 2007), nimmt das Frischgewicht von Blättern nach Abtrennung von der Pflanze im Vergleich zum Wildtyp, genau wie in *knockout*-Mutanten von *SPP1*, langsamer ab (Nakagawa *et al.*, 2012; Nishikawa *et al.*, 2008). Darüber hinaus reagiert der kombinierte *knockdown* von *SPP1* und *DPL1* mit reduziertem Stomataschluss nach Behandlung mit Abscisinsäure (Worrall *et al.*, 2008). Von Magnin-Robert *et al.* (2015) wurden *knockout*-Mutanten von *DPL1* als resistenter gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*, aber sensitiver gegenüber dem hemibiotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* beschrieben.

## Ceramid-Synthese und Metabolisierung

Ceramide werden über eine Kondensationsreaktion der Aminogruppe einer LCB mit einer Fettsäure gebildet (Abbildung 2). Diese Reaktion wird durch Ceramid-Synthasen katalysiert und ist zumeist Fettsäure-CoA-abhängig, während das Anfügen von freien Fettsäuren in Pflanzen seltener vorkommt (Pata *et al.*, 2010). Ceramide können durch Modifikation des LCB-Bestandteils oder des Fettsäure-Bestandteils abgewandelt werden. Neben der Veränderung des Sphingobasen-Grundgerüsts, die bereits für freie LCBs beschrieben wurde, beinhaltet die Modifikation des FA-Bestandteils häufig eine  $\alpha$ -Hydroxylierung, die in der Bildung von Hydroxyceramiden resultiert (siehe auch Abbildung 1). In *Arabidopsis* sind drei Ceramid-Synthasen bekannt, die als Homologe der entsprechenden Ceramid-Synthase LAG1 (*Longevity Assurance Gene 1*) aus Hefe als LOH1/2/3 (*LAG One Homolog*) bezeichnet werden (Markham *et al.*, 2011). LOH1 und LOH3 führen zur Bildung von Ceramiden mit VLCFAs (C20–C26), wohingegen LOH2 spezifisch die Synthese von Ceramiden mit C16-FAs katalysiert. Dementsprechend ist die *knockout*-Doppelmutante *loh1/loh3* durch einen kleinwüchsigen, letalen Phänotyp mit einem starken Mangel an Ceramiden mit VLCFAs und einer Akkumulation von freien LCBs (d18:0 und t18:0) gekennzeichnet (Markham *et al.*, 2011). Der alleinige *knockout* von *LOH1* zeigt spontanen Zelltod bei späten Entwicklungszeitpunkten von adulten Pflanzen, was auch mit verstärkter Expression von Pathogen-assoziierten Abwehrgenen einhergeht (Ternes *et al.*, 2011). Auf der anderen Seite hat die Überexpression von *LOH1* und *LOH3* größere Pflanzen

mit erhöhter Zellteilungsrate aufgrund einer stärkeren Akkumulation von Ceramiden aus VLCFAs und t18:0/t18:1 zur Folge. Eine *LOH2*-Überexpression führt dagegen zu kleinwüchsigen Pflanzen mit einer Akkumulation von Ceramiden mit C16-FAs (Luttgeharm *et al.*, 2015). Der Effekt von *knockout*-Mutanten der Ceramid-Synthasen auf die Gehalte von Ceramiden und Sphingobasen ähnelt dem Effekt einer Behandlung mit Fumonisin B<sub>1</sub> bei Wildtyp-Pflanzen. Viele Untersuchungen zur Funktion von Sphingolipiden wurden mit Inhibitoren des Metabolismus durchgeführt. Als solche sind Mykotoxine für die Inhibierung von Ceramid-Synthasen aus der Gruppe der Fumonisine aus Pilzen der Gattung *Fusarium* und AAL-Toxine (Toxine aus *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*) bekannt (Pruett *et al.*, 2008). Außerdem sind andere Toxine als Inhibitoren (beispielsweise Myriocin) der Serin-Palmitoyl-Transferase beschrieben. In Studien am häufigsten verwendet wird Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), da es das natürlicherweise mit Abstand abundanteste Mykotoxin aus dieser Gruppe darstellt. FB<sub>1</sub> wirkt in Tieren neurotoxisch, hepatotoxisch und nephrotoxisch und wird beim Menschen als karzinogen eingestuft (Stockmann-Juvala und Savolainen, 2008). Aufgrund des gesundheitsschädlichen Effekts von FB<sub>1</sub> und der agrarwirtschaftlichen Bedeutung durch Kontamination von Mais und anderen Nutzpflanzen mit Pilzen der Gattung *Fusarium* ist der Wirkmechanismus des Mykotoxins im tierischen System umfangreich untersucht (Merrill *et al.*, 2001). FB<sub>1</sub> besitzt eine ähnliche Grundstruktur wie Sphingobasen, ist jedoch aufgrund weiterer Hydroxygruppen und Tricarbonsäuren als Nebengruppen polarer und inhibiert Ceramid-Synthasen durch Interaktion mit der Sphingobasen- und FA-CoA-Bindestelle des Enzyms. Obwohl das Toxin dabei zunächst nicht N-acyliert wird, kann die Entfernung der Tricarbonsäure-Nebengruppen die Aminogruppe für das Anfügen einer FA zugänglich machen. Das Produkt dieser Metabolisierung von FB<sub>1</sub> scheint hingegen ein noch stärkerer Inhibitor der Ceramid-Synthasen zu sein (Merrill *et al.*, 2001). Die Hemmung der Ceramid-Synthase-Aktivität führt zu einem starken Anstieg von freien LCBs und deren Metaboliten.

In Pflanzen löst FB<sub>1</sub> programmierten Zelltod mit Ähnlichkeit zur hypersensitiven Antwort aus, der mit modifizierter Expression von Pathogen-assoziierten Abwehrgenen einhergeht und von der Jasmonat-, Ethylen- und Salicylsäure-Signalleitung abhängig ist (Asai *et al.*, 2000). Die Behandlung mit FB<sub>1</sub> führt zu einem Anstieg der freien LCBs und Ceramide mit kurzkettigen Fettsäuren (C16), während die Gehalte von Ceramiden mit VLCFAs (C24-C26) leicht abnehmen (Abbas *et al.*, 1994; Markham *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* lässt dies auf eine Inhibierung besonders von LOH1, LOH3 und weniger von LOH2 durch FB<sub>1</sub> schließen, da dies dem Effekt der beschriebenen *knockout*-Mutanten dieser Enzyme ähnelt (Markham *et al.*, 2011). Überexpressionsmutanten von *LOH2* und *LOH3* zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber FB<sub>1</sub>, die mit einer verringerten Akkumulation von freien LCBs einhergeht, wohingegen die Überexpression von *LOH1* keinen veränderten Phänotyp aufweist und LOH1 deswegen am stärksten durch das Mykotoxin gehemmt wird (Luttgeharm *et al.*, 2015).

Ceramide können genau wie freie LCBs an der C1-Position phosphoryliert werden (Abbil-



dung 2). In *Arabidopsis* wurde dafür die Ceramid-Kinase ACD5 (*Accelerated Cell Death 5*) beschrieben, deren *knockout*-Mutante Ceramide akkumuliert, spontanen Zelltod bei späten Entwicklungszeitpunkten aufweist, suszeptibler gegenüber *Pseudomonas syringae* und *Botrytis cinerea*, aber resistenter gegenüber Echtem Mehltau (*Golovinomyces cichoracearum*) ist als der Wildtyp (Bi *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Außerdem wurde von Dutilleul *et al.* (2015) für *acd5* eine stark verminderte Keimungsrate von Samen bei niedriger Temperatur oder Abscisinsäure-Behandlung nachgewiesen. Über eine weitere Metabolisierung von Ceramid-1-Phosphat, in Bezug auf einen Abbau wie im Fall von freien LCBs oder eine Veränderung (zum Beispiel eine Spaltung des Ceramid-Grundgerüsts) ohne vorige Dephosphorylierung, ist wenig bekannt. Auch wurde in Pflanzen bisher keine Ceramid-Phosphorylase charakterisiert. Für eine Spaltung von nicht-phosphorylierten Ceramiden wurden Ceramidasen beschrieben, die nach ihrem jeweiligen pH-Optimum in die drei Kategorien der alkalischen, neutralen und sauren Ceramidasen eingeordnet werden (Michaelson *et al.*, 2016). In *Arabidopsis* wurde bisher eine alkalische (ACER) und eine neutrale Ceramidase (NCER1) durch Mutanten charakterisiert (Li *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Eine *knockout*- und eine *knockdown*-Mutante von ACER akkumulieren Ceramide mit einer leichten Reduktion der Gehalte von freien LCBs, während *ncer1* lediglich eine Akkumulation von Hydroxyceramiden aufweist, sodass von einer unterschiedlichen Substratspezifität der beiden Enzyme ausgegangen werden kann. Außerdem besitzen die *knockout/knockdown*-Mutanten im Fall von ACER eine erhöhte Sensitivität gegenüber Salzstress, FB<sub>1</sub> und *P. syringae* und im Fall von NCER1 eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress durch Methylviologen (Paraquat), wohingegen die entsprechenden Überexpressionsmutanten jeweils eine erhöhte Resistenz zeigen (Li *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).

### Komplexe Ceramid-Synthese

Die Synthese von komplexen Ceramiden (GlcCers, [G]IPCs) durch Modifikation von Ceramiden an der C1-Position erfolgt nicht mehr, wie die zuvor beschriebenen Schritte, ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum, sondern am Beginn des Sekretionssystems in Pflanzen bis zum Golgi-Apparat (Melser *et al.*, 2010). Im Genom von *Arabidopsis* ist nur eine potenzielle Glucosylceramid-Synthase (GCS) bekannt, deren *knockout*-Mutante allerdings nur im frühen Keimlingsstadium lebensfähig ist, was die Wichtigkeit von GlcCers für die Entwicklung von Pflanzenorganen und die Zelldifferenzierung betont (Msanne *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu sind in *Arabidopsis* drei Inositolphosphorylceramid-Synthasen (IPCS1/2/3) beschrieben (Mina *et al.*, 2010), wovon allerdings nur eine, nämlich IPCS2 (auch ERH1, *Enhancing RPW8-mediated HR-like cell death*), mittels Mutanten charakterisiert wurde (Wang *et al.*, 2008). Die *knockout*-Mutante *erh1* akkumuliert Salicylsäure und zeigt verstärkte Transkription des R-Gens *RPW8*, das in *Arabidopsis* Resistenz gegenüber Echtem Mehltau vermittelt. Dementsprechend weist die Mutante einen verstärkten *RPW8*-abhängigen, spontanen HR-ähnlichen Zelltod auf, der mit einem Anstieg der Ge-

halte von Ceramiden einhergeht (Wang *et al.*, 2008).

Die weitere Glycosylierung von IPCs kann unterschiedlich erfolgen, da GIPCs bezüglich der Kopfgruppe zwischen verschiedenen Pflanzenspezies und Gewebearten stark variieren können (Cacas *et al.*, 2013). In *Arabidopsis* wurde von Rennie *et al.* (2014) die Inositolphosphorylceramid-Glucuronosyl-Transferase *IPUT1* beschrieben, die Glucuronsäure mit IPC verknüpft und von der keine homozygoten *knockout*-Mutanten erhalten wurden, da das mutierte Allel, trotz scheinbar normaler Entwicklung des Pollens, nicht durch diesen übertragen werden kann. Selbst der Mangel an einem einzelnen GIPC (Glucuronosyl-IPC) hat in diesem Fall also ernste Auswirkungen auf die Entwicklung von Pflanzen. Der *knockdown* von *IPUT1* führt darüber hinaus zu einer Akkumulation von IPCs, Ceramiden und GlcCers (Rennie *et al.*, 2014).

Zusätzlich zu den hier aufgeführten und beschriebenen Enzymen des Metabolismus von Sphingolipiden aus *A. thaliana* (Abbildung 2) sind auch vereinzelt manche der homologen Enzyme in anderen Pflanzen funktionell charakterisiert (Berkey *et al.*, 2012; Michaelson *et al.*, 2016). Da die Gehalte und besonders die einzelnen Spezies von Ceramiden und komplexen Ceramiden bezüglich des LCB- oder Fettsäure-Bestandteils sowie bezüglich der Kopfgruppe in verschiedenen Pflanzen stark variieren, können sich auch die jeweiligen Enzyme, hinsichtlich beispielsweise der Anzahl oder der Substratspezifität, voneinander unterscheiden. Die hier beschriebene Biosynthese bietet einen möglichst vollständigen und grundlegenden Überblick über den Sphingolipid-Metabolismus in Pflanzen.

### 1.2.3 Funktionen

Aus der großen strukturellen Vielfalt der einzelnen Sphingolipid-Klassen ergibt sich eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in Pflanzen. Einige dieser Funktionen lassen sich durch die bereits im vorherigen Abschnitt (1.2.2) beschriebenen Phänotypen von Mutanten der Enzyme des Sphingolipid-Metabolismus, welche die Homöostase stören und abweichende *in-vivo*-Gehalte von Substraten oder Produkten der Enzyme zur Folge haben, ableiten. Andere ergeben sich aus Studien mit heterologer Expression der rekombinanten pflanzlichen Proteine (zum Beispiel in Hefe) oder aus *in-vitro*-Experimenten mit den Sphingolipiden. Nicht zuletzt aufgrund der großen Unterschiede im Verhältnis der einzelnen Sphingolipid-Klassen zueinander mit einem über zehnfach höheren Vorkommen der komplexen Sphingolipide (GlcCers, GIPCs) gegenüber einfachen Ceramiden und freien Sphingobasen in Pflanzenzellen (Markham *et al.*, 2006; Markham und Jaworski, 2007), werden erstere allgemein als wichtige Strukturelemente von Membranen betrachtet, während letztere als Ausgangsbausteine und Signalmoleküle diskutiert werden. Im folgenden werden die Funktionen der Sphingolipid-Klassen in Pflanzen zusammengefasst.

#### **Glycosylceramide (GlcCers)**

GlcCers sind wichtige Membranlipide bei Eukaryoten. In Pflanzen kommt diese Lipidklasse in der Plasmamembran, im Tonoplast und in Vesikeln vor und macht zwischen 6 und

27% der gesamten Lipidmolekülzahl aus (Warnecke und Heinz, 2003). Die Struktur der GlcCers kann sich vor allem hinsichtlich der Doppelbindungen beim Sphingobasen- und der Hydroxylierung beim Fettsäure-Bestandteil unterscheiden. Die Kopfgruppe besteht zumeist aus Glucose (Pata *et al.*, 2010). In zahlreichen Studien wurden Variationen in der GlcCer-Zusammensetzung mit Auswirkungen auf die Membranstabilität bei verschiedenen Pflanzen hinsichtlich Unterschieden in der Kälteadaption, Frosttoleranz, Trockenadaption oder Toxizität gegenüber Metallionen in Verbindung gebracht (Warnecke und Heinz, 2003). Solche vergleichenden Untersuchungen zur Membranzusammensetzung, in Bezug auf Lipidverhältnisse oder die genaue Zusammensetzung der vorhandenen Lipidspezies, mit der Adaption von Pflanzen gegenüber abiotischem Stress zu verknüpfen, ist allerdings schwierig und bietet keine direkten Belege für die Funktion von GlcCers.

Aus Experimenten mit einer *knockout*- und einer *knockdown*-Mutante der Glucosylceramid-Synthase (GCS) in *Arabidopsis* ist bekannt, dass eine Reduktion von GlcCers nicht direkt die Lebensfähigkeit von Zellen beeinflusst, jedoch die Zelldifferenzierung und die Organogenese verhindert (Msanne *et al.*, 2015). Von Melser *et al.* (2010) wurde durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Hemmung des Enzyms von *Nicotiana tabacum* mittels Inhibitoren gezeigt, dass der Mangel von GlcCers die Morphologie von Golgi-Vesikeln verändert und so den Transport von sekretorischen Membranproteinen zur Zelloberfläche stört.

### Glycosylinositolphosphoceramide (GIPCs)

Die Sphingolipid-Klasse der GIPCs kommt ausschließlich in Pflanzen und Pilzen, nicht jedoch in Tieren, vor. Während das Ceramid-Grundgerüst in GIPCs zumeist aus t18:0 oder t18:1 als LCB und einer VLCFA aufgebaut ist, kann sich die Art der Glycosylierung bei verschiedenen Pflanzen, mit bis zu sieben an IPC gebundenen Zuckerresten, stark unterscheiden (Cacas *et al.*, 2013). In *Arabidopsis* besteht der überwiegende Anteil der GIPCs aus einer über Hexuronsäure an IPC gebundenen Hexose (Buré *et al.*, 2011). Durch die große polare Kopfgruppe finden sich GIPCs in der äußeren Schicht der Plasmamembran. Dort sind sie besonders in gegenüber Detergenzien resistenten Membranbereichen, den *lipid rafts*, angereichert und spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Verankerung von Membranproteinen (Borner *et al.*, 2005). Der VLCFA-Bestandteil der GIPCs könnte dabei auch zur Interaktion mit anderen Lipiden (besonders Sterole) zwischen den beiden Schichten der Membran in *lipid rafts* beitragen (Cacas *et al.*, 2016). So ist aus Tabak-Zellkulturen (*Nicotiana tabacum* cv. BY-2) bekannt, dass GIPCs bis zu 40% der gesamten Lipidmolekülzahl in der Plasmamembran ausmachen und im Vergleich zur restlichen Membran fünffach höher in den Detergenzien-resistenten Membranbereichen angereichert sind (Cacas *et al.*, 2016).

*Arabidopsis*-Mutanten mit einem Defekt des Enzyms GONST1 (*Golgi-Localized Nucleotide Sugar Transporter 1*), welches Zuckersubstrate in das Golgi-Lumen für die GIPC-Synthese transportiert, zeigen einen kleinwüchsigen Phänotyp und eine HR-Reaktion, die mit erhöhten Gehalten von Salicylsäure einhergeht (Mortimer *et al.*, 2013). Zusammen

mit den Phänotypen der bereits erwähnten Mutanten der Inositolphosphorylceramid-Synthase IPCS2 (ERH1) und der Inositolphosphorylceramid-Glucuronosyl-Transferase IPUT1 (Rennie *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008) ergibt sich für GIPCs nicht nur eine essentielle Rolle als Strukturelement in der Entwicklung, sondern möglicherweise auch eine Funktion in der Pathogenabwehr von Pflanzen (Michaelson *et al.*, 2016).

### Ceramide (Cers/Cer-Ps)

An der Kopfgruppe unmodifizierte Ceramide bilden das Grundgerüst für komplexe Ceramide in der Membran und kommen im Vergleich zu diesen in niedrigeren Konzentrationen vor. Die häufigsten LCB-Bestandteile der Ceramide in *A. thaliana* sind t18:0 und t18:1, während der Fettsäure-Bestandteil sehr variabel ist (Markham *et al.*, 2006; Markham und Jaworski, 2007). Bei der Beurteilung einer Funktion von Ceramiden muss immer auch die Funktion anderer Sphingolipid-Klassen, wie besonders die der freien LCBs, berücksichtigt werden, da Veränderungen in den Gehalten der Ceramide oft eine Störung der gesamten Sphingolipid-Homöostase zur Folge haben. Dies gilt besonders für die in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Phänotypen von Mutanten der Ceramid-Synthasen (LOH1/2/3) und der Ceramidasen ACER und NCER1. Aus Untersuchungen mit letzteren kann möglicherweise dennoch eine Funktion der Ceramide in der Antwort auf Salzstress und oxidativen Stress abgeleitet werden, da hierbei besonders die Spiegel der Ceramide/Hydroxyceramide verändert sind und nur in geringerem Maße die der freien Sphingobasen (Li *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Von Xie *et al.* (2015) wurde außerdem eine Rolle von Ceramiden mit ungesättigten VLCFA-Bestandteilen in der Hypoxie-Toleranz von *Arabidopsis* beschrieben. Dabei nehmen die Gehalte von Ceramiden/Hydroxyceramiden bei untergetauchten Pflanzen zu, jedoch ist in *knockout*-Mutanten der Ceramid-Synthasen (LOH1/2/3) eine Abnahme von Ceramiden mit ungesättigten VLCFAs zu beobachten, die mit einer erhöhten Sensitivität von im Dunkeln, in Wasser untergetauchten Pflanzen einhergeht (Xie *et al.*, 2015).

Hinweise auf eine Funktion von Ceramiden in der Regulation von programmiertem Zelltod stammen aus dem Tierreich, wo ein Zusammenhang zwischen der Produktion dieser Lipidspezies und dem Einsetzen des PCD hergestellt wurde (Hannun und Obeid, 2018). In Pflanzen ist bekannt, dass die exogene Zufuhr von Ceramiden mit kurzem FA-Bestandteil (C2) bei *Arabidopsis*-Zellkulturen und Protoplasten Zelltod induziert, dem ein transienter Anstieg von Calcium und eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vorausgeht (Liang *et al.*, 2003; Townley *et al.*, 2005). Dabei verhindert eine Unterdrückung des Calcium-Anstiegs auch das Auftreten des Zelltods, während gleiches nicht für reaktive Sauerstoffspezies gilt. Auch ist es möglich den durch Ceramide ausgelösten Zelltod teilweise durch Zugabe der phosphorylierten Form der Ceramide (Cer-Ps) zu verhindern (Liang *et al.*, 2003). Weitere Belege für eine Beteiligung von Cers/Cer-Ps an der Regulation des PCD in Pflanzen finden sich durch die Charakterisierung der Ceramid-Kinase ACD5 und des Sphingolipid-Transferproteins ACD11 (*Accelerated Cell Death*), die beide in Tests mit *Arabidopsis*-Mutanten auf spontanen PCD identifiziert wurden (Brodersen *et al.*, 2002; Liang *et al.*,

2003). Der Verlust der ACD5-Funktion führt zur Akkumulation von Ceramiden, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, zum Zelltod und zu einer beeinträchtigten Abwehr von Pathogenen (Bi *et al.*, 2014). Für ACD11 wurde von Simanshu *et al.* (2014) *in vitro* eine Transportaktivität von Ceramid-1-Phosphaten über Membranen gezeigt, während andere Sphingolipid-Klassen (LCBs, GlcCers, GIPCs) nicht oder nur in geringem Maße transportiert wurden. Außerdem weist eine *knockout*-Mutante von *ACD11* eine besonders hohe Akkumulation von Ceramiden auf, die mit dem spontanen Zelltod korreliert, welcher wiederum abhängig von Salicylsäure ist (Simanshu *et al.*, 2014). Einen weiteren Beleg für die Funktion von Ceramiden im programmierten Zelltod liefert die Mutante *erh1* der Inositolphosphorylceramid-Synthase IPCS2, die eine besonders starke Ceramid-Akkumulation bei *RPW8*-abhängigem, spontanem HR-ähnlichem Zelltod aufweist (Wang *et al.*, 2008).

### Sphingobasen (LCBs/LCB-Ps)

Sphingobasen werden von den vier Klassen der Sphingolipide am eingehendsten auf eine Funktion als Signalmoleküle in Pflanzen untersucht. Dies liegt nicht zuletzt an einer hohen Relevanz der Sphingobasen als Regulatoren von zellulären Prozessen, die aus Tieren bekannt ist. Dort sind die Zusammenhänge der Sphingolipid-Homöostase, insbesondere mit Sphingosin (d18:1) als vorherrschender Sphingobase und deren Metabolisierung zu Sphingosin-1-Phosphat, mit den beteiligten Signalwegen genau untersucht (Hannun und Obeid, 2018). Für Sphingosin sind dabei Wirkungen wie Apoptose, Stillstand des Zellzyklus und Zelldifferenzierung beschrieben, während Sphingosin-1-Phosphat zum Teil hierzu antagonistische Wirkungen wie Zellstabilität, Entzündung, Zellmigration und Zellinvasion aufweist. Für diese Funktionen sind fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von Sphingosin-1-Phosphat mit der darauffolgenden Signalleitung bekannt (Siehler und Manning, 2002). Das tiefgreifende Verständnis der Funktion von Sphingobasen und deren Bedeutung in Tieren kann an der Entwicklung von Therapeutika demonstriert werden. Als Beispiel dient hierbei der Wirkstoff Fingolimod, der zur Behandlung der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose eingesetzt wird. Fingolimod, als Sphingosin-Analogon, wird nach der Applikation in den Zellen durch Sphingosin-Kinasen phosphoryliert und bindet als solches an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 auf T-Lymphozyten. Dieser wird dadurch unterdrückt, was den Verbleib der T-Lymphozyten in den Lymphknoten bewirkt. So wird der Angriff der T-Lymphozyten auf die Nervenzellen des zentralen Nervensystems im Verlauf der Multiplen Sklerose gemildert (Brinkmann *et al.*, 2010).

In Pflanzen sind ebenfalls mehrere Funktionen der Sphingobasen als Signalmoleküle bekannt, auch wenn durch das Fehlen von identifizierten Rezeptoren die mögliche Signalweiterleitung nicht oder nur in sehr geringem Maße aufgeklärt ist. Genau wie bei Tieren sind für Pflanzen meist antagonistische Funktionen der nicht-phosphorylierten Sphingobase (LCB) und der phosphorylierten Sphingobase (LCB-P) beschrieben. Diese ergeben sich zum Teil durch die in Abschnitt 1.2.2 erwähnten Phänotypen der Mutanten von En-

zymen des Sphingobasen-Metabolismus (SPHK1 und LCBK2). So sind LCB-Ps für die Abscisinsäure-abhängige Schließung der Stomata und für die Antwort auf Trockenheit notwendig, da *knockout*- oder Überexpressionslinien von *SPHK1* die Sensitivität von Stomata gegenüber Abscisinsäure reduzieren beziehungsweise steigern (Worrall *et al.*, 2008) und die direkte Behandlung mit LCB-Ps zur Stomataschließung führt (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2005). Die Schließung der Stomata durch LCB-Ps in *Arabidopsis* scheint dabei die einzige prototypische G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit GPA1 zu erfordern, da die *knockout*-Mutante des Gens, das für dieses Protein kodiert, in Bezug auf die Stomata insensitiv gegenüber d18:1-P oder t18:0-P ist (Coursol *et al.*, 2003, 2005). Ein Einfluss von LCB-Ps bei der Antwort von Pflanzen auf Kälte kann sowohl durch die transiente, verstärkte Bildung von t18:0-P bei Kältestress als auch durch eine schwächere Abnahme des Wurzelwachstums bei moderat niedrigen Temperaturen in Mutanten mit einem Defekt von LCBK2 abgeleitet werden (Dutilleul *et al.*, 2012).

Die meisten Untersuchungen zur Funktion von Sphingobasen in Pflanzen existieren mit Bezug zur Regulation des programmierten Zelltods. Hinweise hierzu stützen sich auch auf die exogene Zugabe der Sphingobasen. So ist bekannt, dass die direkte Behandlung mit LCBs Zelltod in Blättern und Zellkulturen (*A. thaliana* und *N. tabacum*) verursacht (Lachaud *et al.*, 2010; Peer *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2007), während LCB-Ps nicht nur in der Lage scheinen diesen (Shi *et al.*, 2007), sondern auch den durch andere Auslöser auftretenden PCD zu inhibieren oder zu reduzieren. Ein inhibierender Effekt durch Behandlung mit LCB-Ps ist für Hitze-induzierten, Ceramid-induzierten (C2-Fettsäure-Bestandteil), für den nach unzureichender Verdünnung von Kulturzellen auftretenden (Alden *et al.*, 2011) und durch *P. syringae* oder *B. cinerea* induzierten Zelltod beschrieben (Magnin-Robert *et al.*, 2015). Von Coursol *et al.* (2015) wurde dagegen ein fördernder Effekt von LCB-Ps beim durch den Elicitor Cryptogein induzierten PCD beobachtet mit wiederum antagonistischem (Zelltod-hemmendem) Effekt durch LCB-Behandlung. Ein besonders stark hemmender Effekt von LCBs (d18:0) wurde außerdem von Magnin-Robert *et al.* (2015) für den durch *P. syringae* induzierten Zelltod festgestellt. Eine besondere Rolle von Sphingobasen in der Regulation von programmiertem Zelltod wurde von Peer *et al.* (2010) für die hypersensitive Antwort vorgeschlagen. Dort wurde festgestellt, dass die Gehalte von Phytosphingosin (t18:0) in *Arabidopsis*, im Zuge der HR, bei Erkennung von *P. syringae* mit dem Avirulenzfaktor AvrRpm1 durch die Pflanze langanhaltender erhöht sind als nach Infektion mit dem Bakterium ohne Avirulenzfaktor. Der Anstieg von t18:0 resultiert dabei vermutlich aus einer *de-novo*-Synthese aus Dihydrosphingosin (d18:0), der nach t18:0 zweithäufigsten LCB in Pflanzen, da sich in einer *knockout*-Mutante der Sphingobasen-Hydroxylase SBH1 nur ein Anstieg der Gehalte von d18:0 nach *Pseudomonas*-Infektion feststellen lässt, diese jedoch im Wildtyp gar nicht ansteigen (Peer *et al.*, 2010). Dieser fehlende Anstieg von d18:0 im Wildtyp könnte bedeuten, dass t18:0 in Pflanzen die relevanteste LCB bei der Regulation der hypersensitiven Antwort darstellt. Weitere wichtige Erkenntnisse zu einer Funktion von Sphingobasen in der Regulation

des programmierten Zelltods in Pflanzen liefern Untersuchungen mit den Inhibitoren der Ceramid-Synthese, Fumonisin B<sub>1</sub> und AAL-Toxin. Der durch diese Toxine in Pflanzen ausgelöste Zelltod ähnelt dem der hypersensitiven Antwort (Asai *et al.*, 2000). So wurde die Hemmung der verschiedenen Ceramid-Synthasen von *Arabidopsis* durch FB<sub>1</sub> bereits in Abschnitt 1.2.2 erwähnt. Dass der Zelltod durch FB<sub>1</sub> oder AAL-Toxin direkt mit den Gehalten von Sphingobasen zusammenhängt, die durch *de-novo*-Biosynthese ansteigen, lässt sich darüber hinaus an einer erhöhten Resistenz von *knockout/knockdown*-Mutanten der Untereinheiten der Serin-Palmitoyl-Transferase erkennen (Kimberlin *et al.*, 2013; Saucedo-García *et al.*, 2011b; Shi *et al.*, 2007). Außerdem verringert eine Hemmung der Aktivität dieses Enzyms durch Myriocin den Zelltodphänotyp durch AAL-Toxin (Spasieva *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind mehrere Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus mit veränderter Sensitivität gegenüber FB<sub>1</sub> beschrieben, wie beispielsweise Mutanten der LCB-P-Lyase DPL1, die eine starke Suszeptibilität aufweisen (Tsegaye *et al.*, 2007). Es kann so darauf geschlossen werden, dass Veränderungen des Sphingobasen-Metabolismus essentiell für eine regulatorische Rolle des programmierten Zelltods sind. Durch Studien mit Fumonisin B<sub>1</sub> sind mehrere mögliche Komponenten der Signalleitung bekannt, die mit einem durch Sphingobasen ausgelösten Zelltod in Verbindung stehen könnten. Der Effekt von FB<sub>1</sub> ist dabei nicht nur von Jasmonat, Salicylsäure und Ethylen abhängig (Asai *et al.*, 2000), sondern erfordert die Aktivierung von MAPK-Kaskaden. Dieser Signalweg, der eine Phosphorylierung von MPK6 einschließt, kann mittels PTI, die durch *flg22* ausgelöst wird, unterdrückt werden (Igarashi *et al.*, 2013). Der durch FB<sub>1</sub> ausgelöste PCD wird außerdem über die Cystein-Proteasen  $\alpha\beta\gamma\delta$ VPE und den Serin-Protease-Inhibitor KTI1 (Kunitz-Trypsin-Inhibitor) reguliert, da entsprechende Mutanten von *Arabidopsis* eine veränderte Sensitivität gegenüber dem Mykotoxin aufweisen (Kuroyanagi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Außerdem interagieren in *Arabidopsis* die Orosomucoid-ähnlichen Proteine ORM1 und ORM2 direkt mit den Untereinheiten der SPT und unterdrücken deren Aktivität. Da Mutanten von *ORM1* und *ORM2* auch veränderte FB<sub>1</sub>-Sensitivität zeigen, spielen diese Proteine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sphingolipid-Homöostase und des programmierten Zelltods (Kimberlin *et al.*, 2016).

Neben den Hinweisen zur Signalleitung des Sphingobasen-vermittelten Zelltods, die sich aus Untersuchungen mit FB<sub>1</sub> ergeben, sind auch direkte Folgen eines Anstiegs von LCBs bekannt. So kommt es nach externer Zugabe von LCBs zu einem raschen Anstieg der Konzentration von Calcium-Ionen im Zytosol und etwas später auch im Nukleus. In Tabak-Zellkulturen kann der durch d18:0 ausgelöste Zelltod mittels selektiver Inhibitoren des Calcium-Einstroms verhindert werden, woraus wiederum geschlossen werden kann, dass besonders der Anstieg von Calcium im Nukleus notwendig für den PCD ist (Lachaud *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde von Lachaud *et al.* (2013) in *Arabidopsis*-Zellkulturen gezeigt, dass LCBs (t18:0) die Calcium-abhängige Proteinkinase CPK3 aktivieren, die wiederum ihre Bindepartner, 14-3-3-Proteine, phosphoryliert und somit PCD auslöst. Ne-

ben dem Einstrom von Calcium induziert der LCB-vermittelte Zelltod auch einen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (Da Silva *et al.*, 2011; Lachaud *et al.*, 2011; Peer *et al.*, 2011; Saucedo-García *et al.*, 2011a; Shi *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Calcium finden diese Anstiege aber später statt und sind nicht notwendig für den Zelltod (Da Silva *et al.*, 2011; Lachaud *et al.*, 2011; Peer *et al.*, 2011). So kann zum Beispiel eine verstärkte Expression von Abwehrgenen nach LCB-Behandlung durch Inhibierung sowohl des Calcium- als auch des reaktiven Sauerstoffspezies-Anstiegs (Wasserstoffperoxid) verhindert werden. Aber nur die Inhibierung des Einstroms von Calcium-Ionen vermeidet auch das Auftreten des Zelltods, was die Bildung von Wasserstoffperoxid durch LCBs eher mit basalen Abwehrmechanismen als mit PCD in Verbindung bringt (Lachaud *et al.*, 2011). Von Dutilleul *et al.* (2012) und Saucedo-García *et al.* (2011b) wurde auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MPK6 als wichtige Signalkomponente der Funktion von Sphingobasen identifiziert. Eine Aktivierung des Proteins MPK6 *in vitro* wurde dabei entweder durch LCB-Ps (Dutilleul *et al.*, 2012) oder LCBs beschrieben und für Mutanten mit einem Defekt des Enzyms wurde ein verminderter LCB- und FB<sub>1</sub>-induzierter Zelltod nachgewiesen (Saucedo-García *et al.*, 2011b). Diese zusammengefassten Erkenntnisse in Verbindung mit den bereits genannten Phänotypen der Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus (Abschnitt 1.2.2) beschreiben die vermutete, wichtige regulatorische Funktion von LCBs/LCB-Ps beim programmierten Zelltod und bei der hypersensitiven Antwort nach Pathogeninfektion.

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Unter den verschiedenen Sphingolipid-Klassen werden insbesondere die freien Sphingobasen mit einer Funktion als Signalmoleküle in Verbindung gebracht. Der Fokus liegt dabei auf einer regulatorischen Funktion beim programmierten Zelltod in Pflanzen. Hierfür gibt es verschiedene Hinweise (vergleiche Abschnitt 1.2.3): (I) Mutationen von *A. thaliana*, die Enzyme des Sphingobasen-Metabolismus betreffen, weisen zum Teil veränderte Zelltodreaktionen bei unterschiedlichen Auslösern, wie beispielsweise Pathogeninfektion oder Behandlung mit Fumonisin B<sub>1</sub>, auf (Berkey *et al.*, 2012; Bruggeman *et al.*, 2015). (II) Die hypersensitive Antwort, welche durch Erkennung von Avirulenzfaktoren aus *P. syringae* durch die Pflanze ausgelöst wird, korreliert mit erhöhten Gehalten von LCBs (t18:0) in *Arabidopsis*-Blättern (Peer *et al.*, 2010). (III) Nekrotrophe Pathogene produzieren Toxine, wie Fumonisin B<sub>1</sub> aus Pilzen der Gattung *Fusarium*, die mit dem Sphingolipid-Metabolismus interferieren, was wiederum die Ursache für den dadurch ausgelösten PCD darstellt (Abbas *et al.*, 1994; Pruett *et al.*, 2008). (IV) Die Behandlung von Blättern und Zellkulturen mit LCBs, nicht aber mit LCB-Ps, führt zu Zelltod (Lachaud *et al.*, 2010; Saucedo-García *et al.*, 2011b; Shi *et al.*, 2007).

Obwohl verschiedene Elemente einer Signaltransduktion des Sphingobasen-vermittelten Zelltods in Pflanzen existieren und beschrieben wurden, ist wenig über den genauen Me-



chanismus und die Notwendigkeit der damit einhergehenden zellulären Veränderungen bekannt. Besonders die Rolle von phosphorylierten Sphingobasen (LCB-Ps) bei einer Regulation von PCD in Pflanzen erscheint unklar. Hinweise auf einen antagonistischen Effekt von LCBs und LCB-Ps stammen zum einen aus Studien im tierischen System, in dem die Signalleitung dank der bekannten Rezeptoren für Sphingosin-1-Phosphat ausführlich untersucht ist. Zum anderen deuten in Pflanzen Experimente mit Behandlung von LCB-Ps auf einen Zelltod-hemmenden Effekt bei verschiedenen Auslösern, wie LCBs, Hitze, Pathogene oder FB<sub>1</sub>, hin (Alden *et al.*, 2011; Magnin-Robert *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2007). Somit stellt ein Antagonismus von LCBs und LCB-Ps bei Zelltodprozessen eine der wichtigsten Hypothesen im Bereich der Sphingobasen-Forschung in Pflanzen dar.

Trotz der Hinweise zur Stützung dieser Hypothese wurden bei den meisten bisher durchgeführten Studien in Pflanzen die genauen Gehalte von phosphorylierten Sphingobasen, bei den genannten Auslösern von PCD, nicht immer detailliert bestimmt. Dies liegt sowohl an einer äußerst geringen Konzentration von LCB-Ps im Vergleich zu anderen Sphingolipiden als auch an der anspruchsvollen Quantifizierung dieser Spezies mit analytischen Methoden, obwohl verbesserte Massenspektrometriemethoden es inzwischen erlauben die genauen Gehalte von LCBs und LCB-Ps umfassend zu untersuchen (Markham *et al.*, 2006; Markham und Jaworski, 2007).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die kritische Überprüfung der Hypothese des antagonistischen Effekts von LCBs und LCB-Ps in Bezug auf den Zelltod in Pflanzen. Dazu wurde auf eine zuvor etablierte analytische Methodik der HPLC-MS/MS zurückgegriffen (Peer, 2010), um die Gehalte von LCBs und LCB-Ps im Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung zu bestimmen. Durch Messungen der Leitfähigkeit bei in Lösung schwimmenden Blattscheiben und Verknüpfung mit den dabei induzierten Gehalten von Sphingobasen sollte auf detaillierte Art und Weise die zeitliche Entwicklung des Zelltods charakterisiert werden. So wurde der Einfluss bei exogener Applikation von LCBs/LCB-Ps auf den durch LCB-Zugabe, Bakterieninfektion oder durch Erkennung des Avirulenzfaktors AvrRpm1 aus *P. syringae* ausgelösten Zelltod bestimmt. Auch ein direkter Effekt von Sphingobasen auf Bakterien wurde untersucht. Durch Einsatz und Erzeugung von transgenen *Arabidopsis*-Linien mit Mutationen in Genen, die Enzyme des Sphingobasen-Metabolismus kodieren, wurde versucht, die Gehalte von LCBs und LCB-Ps *in vivo* zu verändern und diese mit unterschiedlichen Phänotypen gegenüber Fumonisin B<sub>1</sub> zu verbinden. Dies sollte nicht nur die Bewertung der Hypothese des antagonistischen Effekts von LCB-Ps auf die Zelltodinduktion ermöglichen, sondern außerdem wichtige Erkenntnisse zu den Gehalten der LCBs und zur Sphingobasen-Homöostase sowie deren Einfluss auf die Regulation von Zelltod in Pflanzen liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Wasser

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und AppliChem (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Enzyme stammten von Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) oder Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Reinstwasseranlage, bestehend aus einem RiOs™ Essential 5 und einem Milli-Q® Gradient Wasserreinigungssystem (Merck KGaA) erstellt. Für molekularbiologische Methoden wurde Wasser von der Firma AppliChem GmbH genutzt. Im Falle von Arbeiten mit RNA wurde DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O verwendet. Dazu wurde Reinstwasser bis zu einer Konzentration von 0,1% (v/v) mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und über Nacht gelagert. Anschließend wurde das Wasser vor Gebrauch zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

#### 2.1.2 Medien

Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt und anschließend für 20 min bei 121°C in einem Tuttnauer 5075 ELV Autoklav (Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande) autoklaviert. Für Festmedien wurde zuvor die entsprechende Menge Agar zugegeben (Tabelle 1). Zur Selektion wurden den autoklavierten Medien nach Abkühlen auf etwa 50°C, je nach Resistenz, Antibiotika beigefügt (Tabelle 2). Diese wurden vorab in der tausendfachen Endkonzentration in Reinstwasser (DMSO für Rifampicin) gelöst und sterilfiltriert.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien**

Komponente	Konzentration
Murashige und Skoog (MS) Medium (0,5fach)	
Murashige & Skoog Medium Mod. Nr. 1 B <sup>1</sup>	2,29 g/l
Phyto Agar <sup>1</sup> (für Festmedium)	8 g/l
	pH 5,7 (mit KOH)
King's B (KB) Medium	
Bacto™ Proteose Pepton Nr. 3 <sup>2</sup>	20 g/l
Glycerin	10 ml/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	1,5 g/l
Agar (für Festmedium)	15 g/l
	pH 7,2

Komponente	Konzentration
<i>Lysogeny broth</i> (LB) Medium	
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar (für Festmedium)	15 g/l
	pH 7,0 (mit NaOH)
<i>Super optimal broth</i> (SOC) Medium	
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,58 g/l
KCl	0,19 g/l
MgCl <sub>2</sub>	2,03 g/l
MgSO <sub>4</sub>	2,46 g/l
Glucose	3,6 g/l
	pH 7,0 (mit NaOH)
<i>Yeast extract broth</i> (YEB) Medium	
Pepton	5 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Fleischextrakt	5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,49 g/l
Saccharose	5 g/l
Agar (für Festmedium)	15 g/l
	pH 7,2

<sup>1</sup>(Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)

<sup>2</sup>(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

**Tabelle 2: Antibiotika.** Aufgeführt sind die den Medien zugegebenen Antibiotika zur Selektion der verschiedenen Bakterienstämme und *A. thaliana*-Transformanten.

Antibiotikum	Endkonzentration für Selektion von:			
	<i>A. thaliana</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. syringae</i>
Ampicillin			100 µg/ml	
Gentamicin		15 µg/ml		
Hygromycin B	40 µg/ml			
Kanamycin			50 µg/ml	
Rifampicin		50 µg/ml		50 µg/ml
Spectinomycin		100 µg/ml	100 µg/ml	
Tetracyclin				5 µg/ml

### 2.1.3 Organismen

In dieser Arbeit wurde der Ökotyp von *Arabidopsis thaliana* Columbia0 (Col-0) verwendet. Alle untersuchten Mutantenlinien basierten auf diesem Hintergrund und wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC; <http://arabidopsis.info>; Tabelle 3) bezogen. Daneben wurde im Laufe dieser Arbeit eine  $\beta$ -Estradiol-induzierbare *DPL1* Überexpressionslinie *XVE-HA-DPL1* erstellt. Außerdem wurde die Linie *Dex:AvrRpm1-HA* zur Dexamethason-induzierbaren Expression des bakteriellen Typ-III-Effektorproteins AvrRpm1 aus Geng und Mackey (2011) genutzt.

**Tabelle 3: Bezogene Mutanten von *Arabidopsis thaliana*.** Angegeben sind die von der jeweiligen Referenz vergebenen Namen der T-DNA-Insertionsmutanten zusammen mit einer Bezeichnung der betroffenen Genloci nach der Arabidopsis Genome Initiative (2000) und einer ursprünglichen Bezeichnung der T-DNA-Insertion (Alonso *et al.*, 2003; McElver *et al.*, 2001; Kleinboelting *et al.*, 2012).

Name	Genlocus (AGI)	T-DNA-Insertion	Referenz
<i>dpl1-1</i>	At1g27980	SALK_020151	Tsegaye <i>et al.</i> , 2007
<i>dpl1-2</i>	At1g27980	SALK_093662	Tsegaye <i>et al.</i> , 2007
<i>SPHK1</i> -KD	At4g21540	SAIL_794_B01	Worrall <i>et al.</i> , 2008
<i>SPHK1</i> -OE	At4g21540	GK-288D07	Worrall <i>et al.</i> , 2008
<i>spp1-1</i>	At3g58490	SALK_035202	Nakagawa <i>et al.</i> , 2012
<i>spp1-2</i>	At3g58490	SALK_027084	Nakagawa <i>et al.</i> , 2012
<i>SPP1</i> -OE	At3g58490	GK-126D07	diese Arbeit

Die für Experimente oder Klonierungen und Transformation von Pflanzen kultivierten Bakterienstämme sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Bakterienstämme.** Aufgeführt sind die verwendeten Bakterienstämme mit der jeweiligen Resistenz gegenüber den genannten Antibiotika sowie der Bezugsquelle.

Stamm	Resistenz	Quelle
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 (pMP90RK)	Gentamicin, Kanamycin, Rifampicin	Koncz <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	—	Thermo Fisher
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Rifampicin	Mishina und Zeier, 2007
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 ( <i>AvrRpm1</i> )	Rifampicin, Tetracyclin	Mishina und Zeier, 2007

### 2.1.4 Primer

Primer für Standard-PCRs wurden von Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit dem Reinheitsgrad „entsalzt“ synthetisiert, während qPCR-Primer bei der Firma TIB Molbiol (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland) bestellt wurden. Primersequenzen für die Überprüfung von T-DNA-Mutanten wurden mit der Online-Software SI-GnAL T-DNA Express (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla, CA, USA;

<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) erhalten. Für qPCRs (Abschnitt 2.4.6) wurden Primer mit Hilfe der Online-Software NCBI Primer *designing tool* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; <https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) entworfen. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Primer mit Sequenzangaben findet sich im Anhang (Tabellen A1 und A2).

### 2.1.5 Plasmide

Die zur Erzeugung der in Abschnitt 2.1.3 genannten  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren Linie *XVE-HA-DPL1* genutzten Plasmide und die zu diesem Zweck erstellten Klonierungsvektoren sind in Tabelle 5 angegeben.

**Tabelle 5: Plasmide.** Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten oder klonierten Plasmide mit der vermittelten Antibiotikaresistenz im Bakterium oder der Pflanze sowie die Bezugsquelle.

Name	Resistenz (Bakterium)	Resistenz (Pflanze)	Quelle
Klonierungsvektoren			
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Ampicillin	—	Promega
pGEMdpl1GW	Ampicillin	—	diese Arbeit
Gateway <sup>®</sup> -Vektoren			
pDONR <sup>™</sup> 201	Kanamycin, Chloramphenicol	—	Thermo Fisher
pENTRdpl1	Kanamycin	—	diese Arbeit
pMDC7ha	Spectinomycin, Chloramphenicol	Hygromycin B	Curtis und Grossniklaus, 2003
pMDC7ha-dpl1	Spectinomycin	Hygromycin B	diese Arbeit

### 2.1.6 Sphingolipide

Sphingolipide und Fumonisin B<sub>1</sub> wurden von den Firmen Avanti (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) oder Cayman (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) bezogen. Stammlösungen wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Methanol mit 0,5 % (v/v) Diethylamin angesetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für Behandlungslösungen wurden Teile der Stammlösungen unter Vakuum getrocknet, in Methanol oder DMSO (für Koinfiltration mit *P. syringae*, Abschnitt 2.2.4) durch Ultraschall wieder gelöst und auf die gewünschte Konzentration mit Reinstwasser, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (für Koinfiltration mit *P. syringae*, Abschnitt 2.2.4), 100 mM Tris-HCl (pH 7,2) oder KB-Medium (für Wachstumsassays von *P. syringae*, Abschnitt 2.3.2) verdünnt. In keinem Fall wurden Behandlungslösungen mit mehr als 2 % (v/v) Methanol (beziehungsweise DMSO) für Sphingobasen und 1 % (v/v) Methanol für FB<sub>1</sub> angesetzt. Der pH-Wert der Behandlungslösungen wurde vor der Verwendung mit einem Seven2Go<sup>™</sup> S2-Standard pH/mV-Meter mit InLab<sup>®</sup> Expert Pro-ISM Elektrode (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, OH, USA) gemessen.

**Tabelle 6: Sphingolipide und FB<sub>1</sub>.** Aufgeführt sind die in dieser Arbeit genutzten Sphingolipide und FB<sub>1</sub>, mit der geläufigen Abkürzung (Bezeichnung) des Namens, dem Molekulargewicht (MW, *molecular weight*) und der jeweiligen CAS-Nummer (Chemical Abstracts Service, Columbus, OH, USA).

Substanz	Bezeichnung	MW	CAS-Nummer
C17-D- <i>erythro</i> -Sphingosin	d17:1	285,47	6918-48-5
D- <i>erythro</i> -Sphingosin	d18:1	299,49	123-78-4
D- <i>erythro</i> -Sphinganin	d18:0	301,51	764-22-7
D-ribo-Phytosphingosin	t18:0	317,51	554-62-1
C20-D- <i>erythro</i> -Sphingosin	d20:1	327,55	6918-49-6
C17-D- <i>erythro</i> -Sphingosin-1-Phosphat	d17:1-P	365,45	474923-27-8
D- <i>erythro</i> -Sphingosin-1-Phosphat	d18:1-P	379,47	26993-30-6
D- <i>erythro</i> -Sphinganin-1-Phosphat	d18:0-P	381,49	19794-97-9
D-ribo-Phytosphingosin-1-Phosphat	t18:0-P	397,49	383908-62-1
N-Decanoyl-D- <i>erythro</i> -Sphingosin	d18:1-c10:0	453,74	111122-57-7
Fumonisin B <sub>1</sub> aus <i>Fusarium moniliforme</i>	FB <sub>1</sub>	721,83	116355-83-0

## 2.2 Methoden für die Arbeit mit *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.1 Pflanzenanzucht

#### Erdanzucht

Für die überwiegende Anzahl der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde Blattmaterial von sechs Wochen alten, in Erde angezogenen, *A. thaliana*-Pflanzen verwendet. Vor der Aussaat wurden die Samen üblicherweise in einem Exsikkator mit Chlorgas oberflächensterilisiert. Dazu wurde ein Becherglas mit 100 ml einer stabilisierten 2,8 %igen Natriumhypochlorit-Lösung direkt vor dem Verschluss des Exsikkators mit 5 ml 37 %iger Salzsäure versetzt. Nach etwa zweistündiger Inkubation der Samen im Exsikkator wurden diese auf Erds substrat (Einheits Erde<sup>®</sup> Spezial, Einheitserde Werkverband e. V., Sinntal, Deutschland) ausgebracht und für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen in Wachstumsschränken BINDER KBWF 720 (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei einem Tag/Nacht-Rhythmus mit 9 h Licht (100–150  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bei 22 °C und 15 h Dunkelheit bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 %. Nach etwa zwei Wochen wurden die einzelnen Pflanzen in separate Töpfe transferiert.

Die Induktion der Blütenbildung zur Ernte von Samen erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht; 8 h Dunkelheit). Die Samen wurden nach Reifung der Schoten in Papiertüten aufgefangen, von anderen Pflanzenteilen getrennt und in Reaktionsgefäßen bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

#### Anzucht unter sterilen Bedingungen

Neben der Anzucht auf Erde wurden Pflanzen zur Selektion von Transformanten (Abschnitt 2.2.3) oder für Fumonisin B<sub>1</sub>-Experimente auf 0,5fachem MS-Agar (Abschnitt

2.1.2, Tabelle 1) angezogen. Bei Bedarf wurde dem Medium dafür nach dem Autoklavieren, aber vor dem Verfestigen die entsprechende Menge FB<sub>1</sub>-,  $\beta$ -Estradiol- oder Hygromycin-B-Stammlösung beigemischt. Die Samen wurden vor der Aussaat durch Flüssigbehandlung oberflächensterilisiert. Hierfür wurden sie für 30 s mit 70 %igem Ethanol versetzt, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und für 5 min in 5 %iger Natriumhypochlorit-Lösung (1% [v/v] Polysorbat 20) inkubiert. Nachfolgend wurde erneut viermal mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und die Samen nach Aufnahme in 0,1 %iger (w/v) Agarose-Lösung auf den Agarplatten vereinzelt. Nach zweitägiger Kältestratifikation bei 4 °C wurden die Pflanzen, wie für das Wachstum auf Erds substrat beschrieben, angezogen.

### 2.2.2 Kreuzung von *A. thaliana*

Zur Kreuzung wurden etwa vier Wochen alte Pflanzen unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach der Blütenbildung wurden bei der Pflanze, die als Empfänger des Pollens dienen sollte, bereits vorhandene Schoten, geöffnete Blüten oder zu junge Knospen abgetrennt. Mit Hilfe einer spitzen Pinzette wurden bei einigen der noch vorhandenen geschlossenen Knospen Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt, um den Fruchtknoten freizulegen. Auf die Narbe des Fruchtknotens wurden dann Pollen von den Staubblättern einer geöffneten Blüte der anderen zu kreuzenden Pflanze abgestreift. Die so behandelten Fruchtknoten wurden an ihren Blütenstielen mit einem Band markiert und die Pflanzen bis zur Samenreife weiter unter Langtagbedingungen kultiviert. Dabei wurden neue Triebe der Pflanze zurückgeschnitten. Nach etwa zwei Wochen wurden die gereiften Samen aus den markierten Schoten geerntet.

### 2.2.3 Transformation von *A. thaliana*

Die durch Agrobakterium vermittelte stabile Transformation von *A. thaliana* wurde nach der „Floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998) durchgeführt. Hierfür wurde eine Hauptkultur (Abschnitt 2.3.1) von *A. tumefaciens* (300 ml) bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min; 5000  $\times$  g) und die Zellen mit 5 %iger (w/v) Saccharose-Lösung auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 resuspendiert. Die Lösung wurde mit 0,2 ml/l Silwet<sup>®</sup> L-77 versetzt und Sprosse von zu transformierenden Pflanzen (Ökotyp Col-0) bis zur Rosette für etwa 30 s in die Lösung getaucht. Bei den Pflanzen wurden zuvor bereits vorhandene Schoten und geöffnete Blüten entfernt. Anschließend wurden die Pflanzen für zwei Tage mit einer Haube bedeckt und weiter unter Langtagbedingungen zur Samenreife gelagert.

### 2.2.4 Zelltodmessungen in Blattscheiben

Der nach Behandlung mit Sphingobasen, Fumonisin B<sub>1</sub> oder *Pseudomonas syringae* ausgelöste Zelltod in *A. thaliana* wurde mit in Lösung schwimmenden Blattscheiben durch Messung der Leitfähigkeit bestimmt. Pro Blatt wurden je vier Blattscheiben mit einem

Durchmesser von 5 mm links und rechts der Mittelrippe mittels Biopsiestanzer (Mediware, Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland) gestochen. Hierfür wurden Blätter der gleichen Größe von sechs Wochen alten Pflanzen genommen.

Im Falle der Behandlung mit Sphingobasen oder Fumonisin B<sub>1</sub> wurden die Blattscheiben zunächst über Nacht in Reinstwasser gelagert. Anschließend wurden je fünf Blattscheiben pro Probe für eine Stunde in 300 µl Reinstwasser äquilibriert, bevor das Wasser durch Behandlungslösung (Abschnitt 2.1.6) ersetzt wurde und die Leitfähigkeitsmessung startete. Im Gegensatz dazu erfolgte die Behandlung mit *Pseudomonas syringae* direkt durch Infiltration der Blätter von der Blattunterseite mit Bakteriensuspension (Abschnitt 2.3.1). Die Blattscheiben wurden gestochen und für 30 min in Reinstwasser gewaschen, bevor je fünf Blattscheiben pro Probe in 600 µl Reinstwasser transferiert und die Leitfähigkeitsmessung begonnen wurde.

Die Leitfähigkeit der Lösungen wurde mit einem LAQUAtwin EC-11 (HORIBA Ltd., Kyoto, Japan) Leitfähigkeitsmessgerät gemessen. Die Proben wurden zwischen den Messungen im Dunkeln gelagert. Nach der letzten Messung wurden die Blattscheiben in der Lösung in fest verschlossenen Reaktionsgefäßen für eine Stunde bei 100 °C erhitzt und die 100 % Zelltod-repräsentierende Leitfähigkeit nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur bestimmt.

Für die Induktion der Genexpression in Blattscheiben der Linien *Dex:AvrRpm1-HA* und *XVE-HA-DPL1* durch Dexamethason beziehungsweise β-Estradiol und die anschließende Messung der Leitfähigkeit, erfolgte die Behandlung wie für Sphingobasen und FB<sub>1</sub> beschrieben. Behandlungslösungen wurden, ausgehend von Methanol-Lösungen von Dexamethason und β-Estradiol mit Reinstwasser, gegebenenfalls zusammen mit Sphingobasen oder FB<sub>1</sub>, auf die benötigte Konzentration und auf maximal 2 % (v/v) Methanol verdünnt.

### 2.2.5 Trypanblau-Färbung von Blättern

Mit Sphingobasen infiltrierte Blätter wurden mit Trypanblau zur Sichtbarmachung des Zelltods gefärbt. 48 h nach der Infiltration wurden behandelte Blätter von der Pflanze abgetrennt, in 200 µg/ml Trypanblau-Lösung (Glycerin:H<sub>2</sub>O:Milchsäure:Phenol:Ethanol [1:2:1:1:8 v/v/v/w/v]) für eine Minute gekocht und über Nacht in der Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung der Blätter wurde durch mehrmaliges Waschen mit 1 g/ml Chloralhydrat-Lösung und Lagerung in H<sub>2</sub>O erreicht.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Bakterienkultur

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Medien mit Antibiotika (Abschnitt 2.1.2) zur Kultivierung der verschiedenen Bakterienstämme (Abschnitt 2.1.3, Tabelle 4) verwendet. *E. coli* wurde in LB-Medium bei 37 °C, *A. tumefaciens* in YEB- und *P. syringae* in KB-



Medium bei 28 °C in einem Inkubator Multitron (Infors HT AG, Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Die Bakterien wurden als Erhaltungen durch Glycerinkulturen im entsprechenden Medium (20 % [v/v] Glycerin) bei –80 °C gelagert. Aus Erhaltungen wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen und für einen Tag (*E. coli*) beziehungsweise zwei Tage (*A. tumefaciens* und *P. syringae*) inkubiert. Für *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden danach üblicherweise Flüssigvorkulturen aus Einzelkolonien angeimpft, die wiederum für den gleichen Zeitraum angezogen wurden. Hauptkulturen für Plasmid-Präparationen (Abschnitt 2.4.9) oder die Transformation von *A. thaliana* (Abschnitt 2.2.3) wurden mit einem hundertstel Volumen aus den gewachsenen Vorkulturen inokuliert und über Nacht kultiviert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) mit einem UV-1600PC Spektralphotometer (VWR International LLC, Radnor, PA, USA) bestimmt.

*P. syringae* wurde für die Infektion von Pflanzen (Abschnitt 2.2.4) auf KB-Agarplatten ausgestrichen und nach zweitägigem Wachstum bei 28 °C mit Hilfe eines Spatels von den Platten gelöst. Eine Suspension der Zellen in 10 mM MgCl<sub>2</sub> wurde nach zweimaligem Waschen durch Zentrifugieren (15 min; 5000 × *g*), Resuspendieren und Verdünnen für die Infiltration von Blättern verwendet (Abschnitt 2.2.4).

### 2.3.2 Wachstumsassays

Ein Einfluss von Sphingobasen auf Bakterien wurde auf zwei verschiedene Weisen untersucht. Zum einen wurden 200 µl mit Sphingobasen versetztes KB-Medium (2 % [v/v] DMSO) in Mikrotiterplatten mit *P. syringae* auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 angeimpft. Während des Wachstums bei 28 °C unter Schütteln (20 Hz; Amplitude 1 mm) in einem Multiskan FC™ Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde dabei stündlich die optische Dichte bei 595 nm gemessen.

Zum anderen wurde *P. syringae*-Suspension (10 mM MgCl<sub>2</sub>; OD<sub>600</sub> 0,1) mit Sphingobasen (Endkonzentration 2 % [v/v] DMSO) für 15 min inkubiert und anschließend jeweils 10 µl einer Verdünnungsreihe auf KB-Agarplatten ausplattiert. Nach zweitägigem Wachstum bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

Die Extraktion von RNA erfolgte mit peqGOLD TriFast™ (VWR International LLC) nach dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll. Etwa 100 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in 2 ml Reaktionsgefäßen mit jeweils einer Zirkonoxid-Mahlkugel (Durchmesser 3 mm) in einer Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) für 30 s bei 24 Hz zerkleinert. Das zerkleinerte Blattmaterial wurde mit 1 ml peqGOLD TriFast™ versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wur-

den 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben, die Proben für 15 s geschüttelt und wiederum für 10 min stehen gelassen. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugieren (5 min;  $12.000 \times g$ ) getrennt, die wässrige Phase abgenommen und die darin befindliche RNA durch Zusatz des gleichen Volumens Isopropanol gefällt (10 min Inkubation;  $4^\circ\text{C}$ ). Die Proben wurden zentrifugiert (10 min;  $12.000 \times g$ ;  $4^\circ\text{C}$ ) und das Pellet nach Abnahme des Überstandes zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min;  $12.000 \times g$ ;  $4^\circ\text{C}$ ). Nachfolgend wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet, bevor die RNA in DEPC-behandeltem Wasser gelöst wurde.

Eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA wurden durch einen DNase I-Verdau der Proben beseitigt. Dazu wurde zunächst die Konzentration der Nukleinsäuren mittels NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt. Der DNase I-Verdau (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit etwa  $1,5 \mu\text{g}$  RNA wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Schließlich wurde die RNA nach Zugabe von 10 % (v/v) Ammoniumacetat-Lösung (5 M) und  $20 \mu\text{g}$  Glykogen (Thermo Fisher Scientific Inc.) erneut, wie zuvor beschrieben, mit Isopropanol gefällt, zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in  $10 \mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von mRNA aus der extrahierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus (Promega Corporation) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden  $1 \mu\text{g}$  RNA und Oligo(dT)<sub>27</sub>-Primer eingesetzt und die Reaktionen nach erfolgter cDNA-Synthese für die qPCR (Abschnitt 2.4.6) verdünnt.

#### 2.4.3 DNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

Für die Extraktion von genomischer DNA wurden Blattstücke in  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäßen mittels eines Pistills zerrieben. Anschließend wurden  $400 \mu\text{l}$  Cetyltrimethylammoniumbromid-Extraktionspuffer (220 mM Tris-HCl; 22 mM EDTA; 800 mM NaCl; 140 mM Manitol; 1 % [w/v] N-Lauroylsarcosin; 0,8 % [w/v] CTAB; 1,4 ml/l  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 7,8) und  $400 \mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben und die Proben für 1 h bei  $65^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei  $7.500 \times g$  getrennt und die obere Phase mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Das nach Zentrifugation (10 min;  $12.000 \times g$ ;  $4^\circ\text{C}$ ) entstandene Pellet wurde wiederum zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in  $50 \mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden typischerweise nach einem von zwei Protokollen angesetzt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Genotypisierung der T-DNA-

Insertionsmutanten (Abschnitt 2.1.3, Tabelle 3) wurden analytische PCRs mit den Primern aus Tabelle A1 (Anhang) pipettiert, während zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen (Abschnitt 2.4.7) präparative PCRs mit Primern aus Tabelle A2 (Anhang) durchgeführt wurden. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze lässt sich den Tabellen 7 und 8 entnehmen.

**Tabelle 7: Analytischer PCR-Ansatz (25  $\mu$ l) für Genotypisierungen**

Komponente	Volumen
<i>template</i> (gDNA 25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ DreamTaq™ Puffer	2,5 $\mu$ l
dNTP Mix (je 2,5 mM)	2 $\mu$ l
LP/LB-Primer (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
RP-Primer (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
DreamTaq™ DNA-Polymerase <sup>1</sup> (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16,75 $\mu$ l

<sup>1</sup>(Thermo Fisher Scientific Inc.)

**Tabelle 8: Präparativer PCR-Ansatz (50  $\mu$ l) für Klonierungen**

Komponente	Volumen
<i>template</i> (cDNA 5 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
5 $\times$ Phusion™ HF Puffer	10 $\mu$ l
dNTP Mix (je 2,5 mM)	4 $\mu$ l
<i>Forward</i> -Primer (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
<i>Reverse</i> -Primer (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
Phusion™ HF DNA-Polymerase <sup>1</sup> (2 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	31 $\mu$ l

<sup>1</sup>(Thermo Fisher Scientific Inc.)

Für die PCRs wurde ein Mastercycler® ep Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die verschiedenen Temperaturen und Zeiten der einzelnen PCR-Schritte (Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation) richteten sich nach den Angaben des Herstellers der Polymerasen. Die Hybridisierungstemperatur wurde anhand der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer (Abschnitt 2.1.4) nach der Formel  $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$  bestimmt, wobei die Buchstaben die Anzahl der jeweiligen Base angeben. Die optimale Hybridisierungstemperatur für jedes Primerpaar wurde, falls erforderlich, mittels eines Temperaturgradienten getestet.

#### 2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die zur Auftrennung, Größen- und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten eingesetzte Gelelektrophorese erfolgte nach Zugabe von 20 % (v/v) 6  $\times$  Ladepuffer (10 mM Tris-HCl; 0,05 % [w/v] Bromphenolblau, 60 % [v/v] Glycerin; 60 mM EDTA; pH 7,6) zu

den Proben in 1–2 %igen Agarose-Gelen (1–2 % [w/v] Agarose in  $1 \times$  TAE-Puffer [ $50 \times$  stock: 2 M Tris-Acetat; 50 mM EDTA; pH 8,3]) mit 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid. Als Größenmarker dienten GeneRuler™ 1 kb oder 100 bp DNA Ladder der Firma Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Die Banden wurden nach dem Lauf der Gele bei 100 V durch Anregung des Ethidiumbromids mit einem UV-Transilluminator in einer Geldokumentationskammer (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### 2.4.6 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression der in dieser Arbeit verwendeten Mutantenlinien (Abschnitt 2.1.3) wurden quantitative Reverse-Transkriptase-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden Reaktionen mit dem Absolute qPCR SYBR® Green Capillary Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit 10 ng cDNA (Abschnitt 2.4.2) als *template* entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und in einem CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) analysiert. Die Amplifikation der cDNA fand nach einer Anfangsdenaturierung für 15 min bei 95°C in 40 Zyklen mit Denaturierung für 15 s bei 95°C, Primerhybridisierung für 30 s bei 57°C und Elongation für 20 s bei 72°C statt. Die Qualität der PCR-Produkte wurde über das Aufzeichnen einer Schmelzkurve von 60 bis 95°C in 1°C Schritten bestimmt.

Primer (Abschnitt 2.1.4, Anhang, Tabelle A2) wurden für eine Amplikongröße von 70 bp–150 bp und mit einer Schmelztemperatur von etwa 57°C entworfen. Zudem wurde, soweit möglich, darauf geachtet, dass die Primer-Paare den Bereich eines Introns in der genomischen DNA überspannen oder dass einer der Primer auf einem Exon/Exon-Übergang der cDNA bindet, um die Amplifikation von gDNA-Sequenzen auszuschließen. Jedes Primer-Paar wurde durch Anfertigung einer Standardkurve auf Amplifikationseffizienz getestet. Hierfür wurde ein cDNA-Mix aller Proben eines Experiments und ausgehend davon eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  erstellt. Aus der Steigung (b) der Regressionsgeraden der Standardkurve wurde dann die Effizienz (E) der Amplifikation mit dem entsprechenden Primerpaar nach der von Pfaffl (2001) beschriebenen Methode anhand der Formel  $E = 10^{\left(\frac{-1}{b}\right)}$  berechnet.

Nach der Durchführung der qPCR mit den jeweiligen Proben wurde die relative Quantifizierung der Transkriptmenge der Zielgene durch Normalisierung auf das Haushaltsgen *ACT2/8* (Ivashikina *et al.*, 2003) anhand folgender Formel vorgenommen:

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct_{goi}}}{E_{ref}^{\Delta Ct_{ref}}}$$

Dabei steht NRQ für die normalisierte relative Quantität, E für die zuvor berechnete Effizienz, goi für das Zielgen (*gene of interest*) und ref für das Haushaltsgen (Referenzgen). Der

$\Delta$ Ct-Wert wurde mittels Subtraktion des Ct-Werts (*cycle threshold*) eines Kalibrators mit dem Ct-Wert der entsprechenden Probe erhalten. Der Kalibrator wurde bei jedem qPCR-Durchlauf aus der vereinigten cDNA aller Proben angesetzt. Der Grenzwert (*threshold*) für die Bestimmung der Ct-Werte, also der Werte bei denen die nach jedem Zyklus der qPCR gemessene Fluoreszenzintensität den Grenzwert überschreitet, wurde am Beginn der exponentiellen Phase der Reaktionen festgelegt.

#### 2.4.7 Klonierungen

Für Klonierungen wurde die kodierende Sequenz von *DPL1* mittels PCR (Abschnitt 2.4.4, Tabelle 8) aus cDNA (Abschnitt 2.4.2) amplifiziert. Hierbei wurden durch die Verwendung von Überhangprimern Gateway<sup>®</sup>-Rekombinationssequenzen angefügt (Anhang, Tabelle A2). Das PCR-Produkt wurde in Agarose-Gelen aufgetrennt (Abschnitt 2.4.5) und aus diesen mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### T/A-Klonierung mit dem Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Das PCR-Amplifikat wurde anschließend in den Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega Corporation) integriert. Da für die Amplifikation der kodierenden Sequenz aufgrund der geringeren Fehlerrate durch Korrekturlesefunktion die Phusion<sup>™</sup>-Polymerase eingesetzt wurde, mussten für die Ligation in den geschnittenen und mit Desoxythymidin-Überhängen ausgestatteten pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor zunächst Desoxyadenosin-Überhänge an den 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt werden. Dies wurde durch Inkubation für 30 min bei 72°C in 10 µl Reaktionsansätzen mit DreamTaq<sup>™</sup> DNA-Polymerase (5 U, Thermo Fisher Scientific Inc.), DreamTaq<sup>™</sup> Puffer und dATP (0,2 mM) erreicht. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem Vektor nach dem Protokoll des Herstellers mit der T4 DNA-Ligase (Promega Corporation). Dabei wurde ein 3 zu 1 Verhältnis von Insert zu Vektor angesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und die Plasmide mittels Hitzeschock-Transformation (Abschnitt 2.4.8) in kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms DH5 $\alpha$  eingebracht.

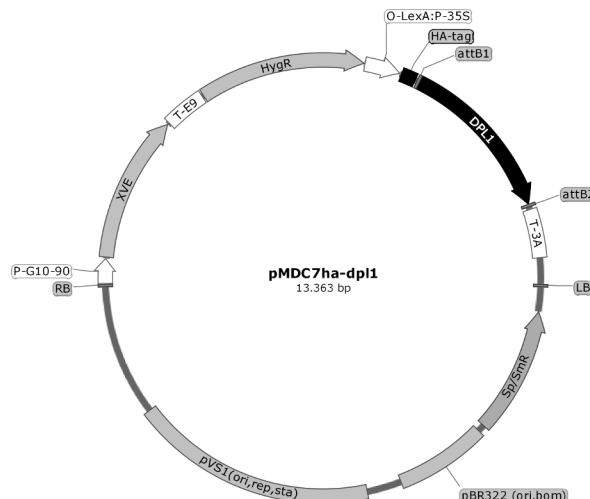
Eine Vorauswahl von Klonen mit korrekt ligierten Plasmiden für Kontrollen durch Restriktionsverdau (Abschnitt 2.4.10) und Sequenzierung (Abschnitt 2.4.11), wurde nach Wachstum auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, X-Gal (80 µg/ml) und IPTG (0,5 mM) durch Blau-Weiß-Selektion getroffen.

#### Gateway<sup>®</sup>-Klonierung

Ausgehend vom erstellten Klonierungsvektor wurde das für die  $\beta$ -Estradiol-induzierbare Überexpression von *DPL1* nötige Konstrukt mittels Gateway<sup>®</sup> Technology (Thermo Fisher Scientific Inc.) kloniert, die auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda basiert (Landy, 1989). Als *template* für die BP-Reaktion zur Klonierung in den mit *attP*-Sequenzen (*attachement*-Sequenzen) ausgestatteten Vektor pDONR<sup>™</sup>201 wurde somit pGEMdpl1GW, mit der von *attB*-Sequenzen flankierten kodierenden Sequenz von

*DPL1*, verwendet. Das Plasmid wurde hierzu durch einen Verdau mit *NcoI* (Abschnitt 2.4.10) linearisiert und dann gereinigt. Die BP-Reaktion wurde mit dem BP Clonase<sup>®</sup> II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37°C wurden das resultierende Plasmid pENTRdpl1 in den Stamm DH5 $\alpha$  eingebracht.

Durch die LR-Reaktion mit dem LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde nach Selektion korrekter *entry*-Klone mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung die kodierende Sequenz in den *destination*-Vektor pMDC7ha (Curtis und Grossniklaus, 2003) übertragen. Die Reaktion wurde ebenfalls über Nacht bei 25°C durchgeführt und mit Proteinase K und folgender Inkubation für 10 min bei 37°C gestoppt. Zur Selektion und Erhaltung wurde das erzeugte Plasmid pMDC7ha-dpl1 in DH5 $\alpha$  transformiert. Anschließend wurde das isolierte Plasmid in *A. tumefaciens* (Abschnitt 2.4.8) für die folgende stabile Transformation von *A. thaliana* (Abschnitt 2.2.3) eingebracht.



**Abbildung 3: Struktur des Plasmids pMDC7ha-dpl1.** Gezeigt ist das Plasmid (Curtis und Grossniklaus, 2003) für die  $\beta$ -Estradiol-induzierbare Überexpression (Zuo *et al.*, 2000) von *DPL1* in Pflanzen. Die zwischen *right border* (RB) und *left border* (LB) befindliche T-DNA wird bei der Agrobakterien-vermittelten Transformation stabil ins Genom der Pflanze integriert. Der unter der Kontrolle eines konstitutiv-aktiven Promotors (*G10-90*) stehende (*T-E9: rbcs E9* Polyadenylierungssignal), auf einem Estrogen-Rezeptor basierende, Transaktivator XVE aktiviert nach Bindung von  $\beta$ -Estradiol die Expression von *DPL1* (mit  $3 \times$  HA-tag) durch Induktion der LexA Operator-Sequenz, die mit der Minimalsequenz des CaMV 35S-Promotors fusioniert ist (*O-LexA:P-35S; T-3A: rbcs 3A* Polyadenylierungssignal). Die zwei Transkriptionseinheiten (*XVE* und *DPL1*) sind dabei durch eine Hygromycin B-Resistenzkassette voneinander getrennt, die als Selektionsmarker in der Pflanze dient. Außerhalb der T-DNA befinden sich eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette sowie Sequenzelemente aus den Plasmiden pBR322 und pVS1, die für die Erhaltung des Plasmids in *E. coli* und *A. tumefaciens* benötigt werden (*ori*: Replikationsursprung; *bom*: *basis of mobility*; *rep*: Sequenz für Replikationsprotein; *sta*: Sequenz für Stabilitätsprotein). Außerdem sind die Gateway<sup>®</sup>-Rekombinationssequenzen (*attB1*, *attB2*) gezeigt, die für die Klonierung verwendet wurden. Das Bild wurde mit dem Programm GENTle V 1.9.4 (Magne, 2006) erzeugt und mit dem SnapGene<sup>®</sup> Viewer V 4.2.11 (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) dargestellt.

Der Vektor pMDC7 wurde bereits vor dieser Arbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische

Biologie der Universität Würzburg um die kodierende Sequenz eines HA-*tags* ergänzt, das die Expression des gewünschten Proteins in N-terminaler Fusion mit diesem Protein-*tag* ermöglicht. Der von Curtis und Grossniklaus (2003) erstellte Vektor mit Gateway<sup>®</sup>-Rekombinationssequenzen enthält das für die Expression in Pflanzen genutzte und von Zuo *et al.* (2000) entwickelte  $\beta$ -Estradiol-induzierbare System XVE. Ähnlich wie beim Dexamethason-induzierbaren Expressionssystem (Aoyama und Chua, 1997), auf dem die in dieser Arbeit verwendete Linie *Dex:AvrRpm1-HA* (Geng und Mackey, 2011) basiert, besteht das XVE-System aus einem Estrogen-Rezeptor-enthaltenden Transaktivator, der nach Induktion mit  $\beta$ -Estradiol die Expression des gewünschten Proteins (in diesem Fall DPL1) aktiviert. Abbildung 3 zeigt das in dieser Arbeit klonierte Plasmid pMDC7ha-dpl1.

#### 2.4.8 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien wurde für *E. coli* mittels Hitzeschock vorgenommen, während für *A. tumefaciens* die Elektroporation angewendet wurde. Nach der Transformation wurden die Bakterien auf dem entsprechenden Medium mit Antibiotika selektiert.

##### Hitzeschock-Transformation

Die Herstellung von kompetenten Zellen für die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Inoue-Methode aus Green und Sambrook (2012). Dazu wurden 250 ml einer Hauptkultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  in SOC-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert (Abschnitt 2.3.1). Die Kulturen wurden für 10 min auf Eis gekühlt, die Zellen durch Zentrifugation (10 min; 2.500  $\times$  g; 4°C) geerntet und in 80 ml sterilem, eiskaltem Transformationspuffer (10 mM PIPES-KOH; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl; pH 6,7) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und nachfolgend mit 1,5 ml DMSO versetzt. 50  $\mu$ l Aliquots der Bakteriensuspension wurden entweder direkt verwendet oder für eine spätere Nutzung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde den chemisch kompetenten Zellen 10 ng DNA zugefügt und die Ansätze, nach 20 minütiger Inkubation auf Eis, für 50 s auf 42°C erhitzt, bevor sie erneut für 2 min auf Eis gekühlt wurden. Nach Zugabe von 950  $\mu$ l SOC-Medium wurden die Zellen für 1,5 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert.

##### Elektroporation

Kompetente Zellen für die Elektroporation wurden ausgehend von einer, bis OD<sub>600</sub> 0,6 inkubierten, 250 ml YEB-Hauptkultur von *A. tumefaciens* durch Zentrifugation (10 min; 2.500  $\times$  g; 4°C), dreimaliges Waschen mit 10 %iger (v/v) steriler, eiskalter Glycerin-Lösung und anschließender Resuspension in 1 ml gewonnen. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot mit 10 ng DNA versetzt, für 2 min auf Eis inkubiert und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 1 mm, VWR International LLC) überführt. Nach dem Elektropuls in einem Gene Pulser Xcell<sup>™</sup> Electroporation

System (Bio-Rad Laboratories Inc.) wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben, die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, für eine Stunde bei 28°C geschüttelt und auf YEB-Agarplatten ausplattiert.

#### 2.4.9 Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmiden für Klonierungen wurde abhängig von der benötigten Menge mit dem NucleoSpin® Plasmid oder dem NucleoBond® PC 100 Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, Flüssigvorkulturen oder Hauptkulturen der Bakterien angesetzt. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt.

#### 2.4.10 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc.) bezogen und mit dem entsprechenden Reaktionspuffer in Ansätzen von 10 µl oder 20 µl verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge und die Dauer der Inkubation richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden nach der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.4.5).

#### 2.4.11 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth Seqlab (Microsynth AG, Göttingen, Deutschland) nach dem Sanger-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977) mit einem der in Tabelle A2 im Anhang aufgeführten Sequenzierungsprimer durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mit dem Programm GENTle V 1.9.4 (Magne, 2006) ausgewertet.

## 2.5 Analytische Methoden

Die Bestimmung der Spiegel von verschiedenen Sphingolipiden erfolgte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS). Die Detektion von Sphingobasen mittels dieser Methode ist in mehreren Arbeiten beschrieben (Haynes *et al.*, 2009; Markham *et al.*, 2006; Markham und Jaworski, 2007; Scherer *et al.*, 2010; Sullards, 2000; Sullards und Merrill, 2001). Die Grundlagen für die hier durchgeführten Messungen der Sphingobasen und Ceramide mit den HPLC- und MS/MS-Bedingungen und folgender Quantifizierung anhand interner Standards wurden von Peer (2010) geschaffen.

#### 2.5.1 Extraktion von Sphingolipiden

Sphingolipide wurden aus ganzen, auf Agar angezogenen Keimlingen (Abschnitt 2.2.1) oder aus Blattscheiben (Abschnitt 2.2.4) nach einer von Baker *et al.* (2001) und Scherer



*et al.* (2010) beschriebenen modifizierten Methode extrahiert. Dazu wurde Pflanzenmaterial aus den Experimenten in flüssigem Stickstoff gefroren. Für Blattscheibenexperimente wurden die 5 Blattscheiben pro Probe (15 mg Frischgewicht) zuvor kurz mit Methanol und anschließend zweimal mit Wasser gewaschen, um Spuren der Sphingobasen-Behandlungslösung aus dem Experiment zu entfernen. Die auf MS-Agar angezogenen Keimlinge wurden zu Proben von 25 mg Frischgewicht vereinigt.

Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen mit jeweils einer Mahlkugel aus Zirkonoxid (Durchmesser 3 mm) in einer Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH) für 30 s bei 24 Hz zerkleinert und mit 30 µl eines Phosphat-Citrat-Puffers (77 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 61 µM Citronensäure; pH 4,0) zusammen mit 30 ng der internen Standards d17:1, d20:1, d17:1-P, d18:1-c10:0 (Abschnitt 2.1.6, Tabelle 6) versetzt. Die Extraktion erfolgte in einem ersten Schritt durch 500 µl 1-Butanol und nachfolgend erneut durch 250 µl wassergesättigtes 1-Butanol. Nach den beiden Extraktionsschritten wurden die Proben jeweils für 5 min mit Mahlkugel in der Schwingmühle (24 Hz) gemischt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min; 20.000 × *g*). Die Lösemittelphasen wurden abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Das 1-Butanol wurde unter Vakuum bei 60 °C verdampft und der Rückstand in 70 µl Methanol (1 % [v/v] Ameisensäure) durch gründliches Mischen gelöst. Die Extrakte wurden für 10 min bei 20.000 × *g* zentrifugiert, danach in gläserne Probengefäße überführt und bis zur HPLC-MS/MS Messung bei -20 °C gelagert.

Für die Messung von Sphingobasen-Behandlungslösungen aus den Experimenten wurden jeweils 70 µl direkt in gläserne Probengefäße transferiert und 3,5 µl mit je 30 ng der internen Standards (d17:1, d20:1, d17:1-P, d18:1-c10:0) zugegeben. Die Probengefäße wurden zusammen mit den Extrakten verwahrt. Direkt vor der Messung wurden alle Proben für 5 min in ein Ultraschallbad transferiert.

### 2.5.2 HPLC-Bedingungen

Als chromatographische Trennmethode vor der Elektrosprayionisation (ESI) der Analyten und Detektion mittels Tandemmassenspektrometer kam ein *ultra-performance liquid chromatography* System (UPLC<sup>®</sup>, Waters Corporation, Milford, MA, USA) zum Einsatz. Die Umkehrphasenchromatographie erfolgte dabei mit einer ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18-Säule (2,1 × 50 mm; Partikelgröße 1,7 µm) mit vorgeschalteter VanGuard<sup>™</sup>-Vorsäule (BEH C18; 2,1 × 5 mm; Partikelgröße 1,7 µm; Waters Corporation) und dem in Tabelle 9 angegebenen Gradienten mit Eluent A (58 % [v/v] Methanol; 41 % H<sub>2</sub>O; 1 % [v/v] Ameisensäure; 5 mM Ammoniumformiat) und Eluent B (99 % [v/v] Methanol; 1 % [v/v] Ameisensäure; 5 mM Ammoniumformiat).

Die Proben wurden vor der Injektion im Ultraschallbad für 5 min sonifiziert und im Autosampler des UPLC<sup>®</sup>-Systems auf 20 °C temperiert. Die Säulentemperatur betrug 30 °C bei einem Injektionsvolumen von 8 µl pro Probe.

**Tabelle 9: HPLC-Gradient zur Auftrennung von Sphingolipiden (Flussrate: 350  $\mu\text{l}/\text{min}$ )**

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

### 2.5.3 MS/MS-Bedingungen

Nach der chromatographischen Auftrennung der Analyten wurden diese mit der an das UPLC<sup>®</sup>-System gekoppelten ESI-Quelle im positiven Operationsmodus ionisiert und mit einem Quattro Premier XE<sup>™</sup> Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (Waters Corporation) mit *multiple reaction monitoring* (MRM) detektiert. Die Bedingungen für Ionisierung und Fragmentierung der Sphingolipide wurden aus Peer (2010) übernommen. Die allgemeinen Geräte-Parameter sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Allgemeine Parameter des Massenspektrometers**

Ionisierungsmodus	+ES
Kapillarspannung [kV]	3
Quellentemperatur [°C]	120
Desolvatisierungstemperatur [°C]	450
Konusgasfluss - N <sub>2</sub> [l/h]	50
Desolvatisierungsgasfluss - N <sub>2</sub> [l/h]	800
Kollisionsgasfluss - Ar [ml/min]	0,3

Die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im MRM-Modus der einzelnen Sphingolipide mit einer Verweilzeit (*dwel time*) von 25 ms für jeden Übergang und der spezifischen Konusspannung und Kollisionsenergie sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: MS/MS-Parameter der Sphingolipide.** Masse-zu-Ladung-Verhältnisse [m/z] der Vorläufer- (*precursor ion*) und Produktionen (*product ion*) der analysierten Sphingolipide im MRM-Modus sind ausgehend von Struktur und Fragmentierungsmuster als [M+H]<sup>+</sup> angegeben. IS: interner Standard.

Sphingolipid	MRM-Übergang [m/z]	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]
d17:1 (IS)	286,2 $\rightarrow$ 268,1	20	11
d18:2	298,2 $\rightarrow$ 280,2	22	17

Sphingolipid	MRM-Übergang [m/z]	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]
d18:1	300,2 → 282,2	22	17
d18:0	302,2 → 284,2	28	18
t18:1	316,1 → 298,2	22	20
t18:0	318,1 → 282,2	22	20
d17:1-P (IS)	366,1 → 250,1	22	15
d18:2-P	378,2 → 280,1	24	17
d18:1-P	380,0 → 264,2	20	17
d18:0-P	382,1 → 284,1	30	15
t18:1-P	396,2 → 298,2	24	20
t18:0-P	398,1 → 300,0	40	15
d18:1-c10:0 (IS)	454,4 → 264,2	11	22
t18:1-c16:0	554,5 → 262,3	30	30
t18:0-c16:0	556,5 → 264,3	30	30
t18:1-c22:0	638,6 → 262,3	35	40
t18:0-c22:0	640,6 → 264,3	35	40
t18:1-c24:0	666,6 → 262,3	35	40
t18:0-c24:0	668,6 → 264,3	35	40
t18:1-c26:0	694,7 → 262,3	35	40
t18:0-c26:0	696,7 → 264,3	35	40

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software MassLynx™ V 4.1 (Waters Corporation). Dabei wurde die Konzentration der Analyten anhand der Stoffmenge der eingesetzten internen Standards kalkuliert. Da sich die Ionisierbarkeit und Detektionsfähigkeit der einzelnen Sphingolipide unterscheiden, wurden für die Quantifizierung der Analyten in den Proben Korrekturfaktoren (*response factors*, RFs) durch Messung der Standardsubstanzen bekannter Konzentration bestimmt:

$$RF_{Analyt} = \frac{c_{Analyt} \times A_{IS}}{c_{IS} \times A_{Analyt}}$$

Dabei steht RF für den Korrekturfaktor des jeweiligen Analyten, c für die Stoffmenge des Analyten oder internen Standards (IS) und A für die integrierte Fläche (*area*) des Signals des Analyten oder internen Standards. Der Korrekturfaktor wurde bei der Messung jedes Experiments durch einen Standard-Mix der Sphingobasen berechnet und für die Auswertung des jeweiligen Experiments genutzt. Da die meisten in dieser Arbeit gemessenen Ceramide im Gegensatz zu den Sphingobasen als Substanzen nicht kommerziell erhältlich sind (Abschnitt 2.1.6, Tabelle 6), wurde für die Quantifizierung hierbei ein RF = 1 zum internen Standard (d18:1-c10:0) angenommen, womit nur eine annäherungsweise (relative) Quantifizierung möglich war. Unter Berücksichtigung des RF konnte die unbekannte

Konzentration der Analyten in den Proben nach folgender Formel bestimmt werden:

$$c_{Analyt(Probe)} = \frac{RF_{Analyt} \times c_{IS(Probe)} \times A_{Analyt(Probe)}}{A_{IS(Probe)}} \times \frac{1}{FG_{(Probe)}}$$

Mit der integrierten Fläche des Signals des Analyten ( $A_{Analyt(Probe)}$ ) und internen Standards ( $A_{IS(Probe)}$ ) der Probe sowie der bekannten Konzentration des internen Standards ( $c_{IS(Probe)}$ ) kann die Konzentration des jeweiligen Analyten ( $c_{Analyt(Probe)}$ ) damit auf die Menge des eingesetzten Pflanzenmaterials (Frischgewicht,  $FG_{(Probe)}$ ) in jeder Probe bezogen werden. Für die Messung von Behandlungslösungen kann anstelle des Frischgewichts das Volumen der Probe eingesetzt werden.

## 2.6 Statistik

Statistische Tests wurden mit der Software IBM SPSS Statistics V 24 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Der Effekt von Behandlungen (Sphingobasen,  $FB_1$ ) auf die Zelltodinduktion der verschiedenen Genotypen wurde mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) analysiert, während der Effekt von Behandlungen auf Sphingobasen-Spiegel der Genotypen mit einem multivariaten Test (allgemeines lineares Modell) nachgewiesen wurde. Die Varianz der Zelltodwerte wurde berechnet, indem „Genotyp“ und „Behandlung“ als gesetzte Faktoren mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate festgelegt wurden. Genotypen mit einem Signifikanzniveau  $< 0,05$  für die Interaktion des jeweiligen Genotyps mit dem Faktor „Behandlung“ in den Abbildungen 9, 11, 12, A9 wurden mit einem Sternchen gekennzeichnet. In Abbildung 14 wurden Sternchen für den Faktor „ $\beta$ -Estradiol-Behandlung“ mit einem Signifikanzniveau  $< 0,05$  vergeben.

Die Varianz der Spiegel der Sphingobasen (d18:0, d18:0-P, t18:0, t18:0-P) wurde für Abbildung 10 durch Festlegung der Faktoren „Genotyp“ und „Behandlung“ und im Fall der Abbildungen 9, 11, 12, 14 zusätzlich mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet. Mittelwerte für jede der Sphingobasen in den Abbildungen 9, 10, 11, 12, 14 wurden mit Sternchen markiert, falls der Genotyp ein Signifikanzniveau unter 0,05 für den Faktor „Genotyp“ (Abbildungen 9, 11, 12), für den Faktor „ $\beta$ -Estradiol-Behandlung“ (Abbildung 14) oder für die Interaktion der Faktoren „Genotyp“ und „Behandlung“ (Abbildung 10) aufwies. Eine Übersicht über die genauen Signifikanzwerte für alle Faktoren und Zwischensubjekteffekte findet sich im Anhang (Abbildungen A11, A12, A13, A14, A15, A16).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zum Zelltod nach exogener Zugabe von Sphingobasen in *A. thaliana*

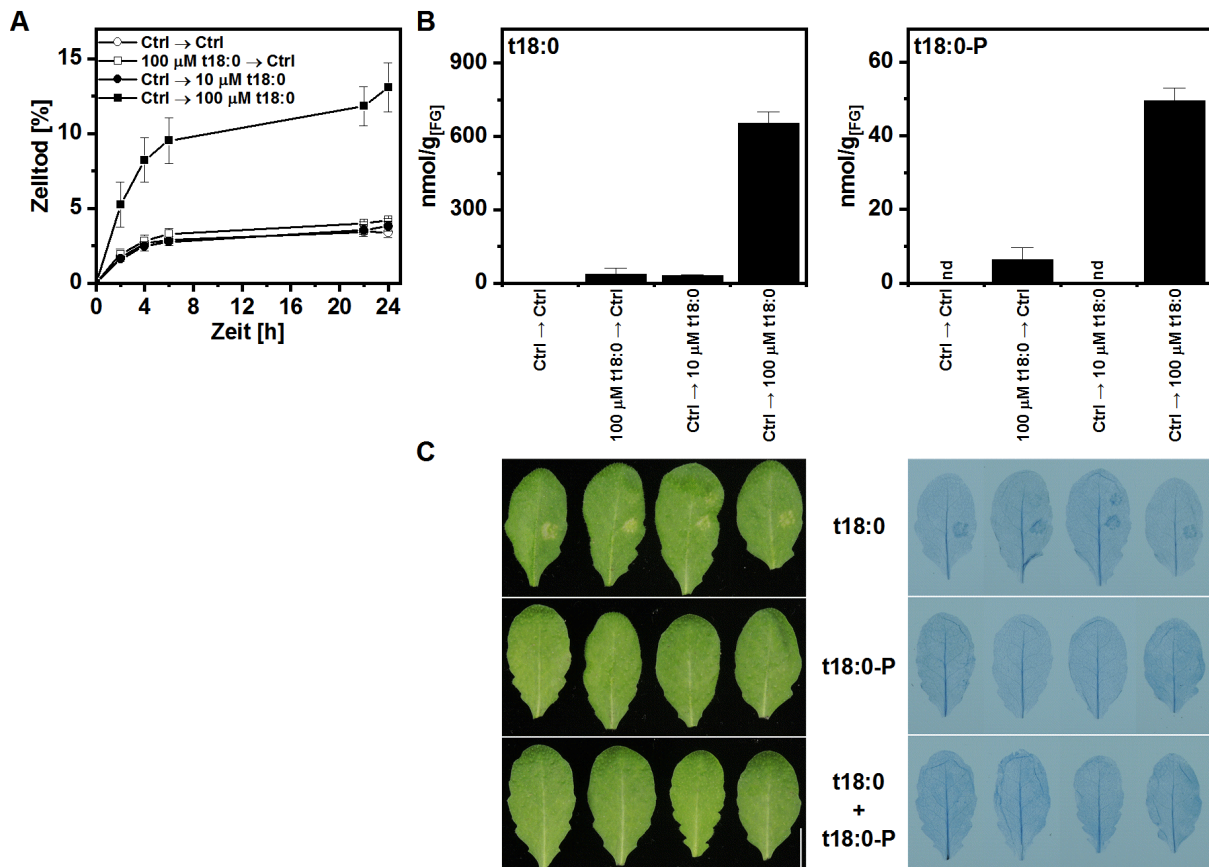
Sphingobasen als Signalmoleküle und Regulatoren von zellulären Prozessen wurden umfangreich untersucht. Besonders im tierischen System wurden Beteiligungen an Prozessen wie Entzündungsreaktion, Zellwachstum und Zelltod nachgewiesen und es sind dort mehrere Rezeptoren für Sphingosin-1-Phosphat bekannt und charakterisiert (Hannun und Obeid, 2018; Siehler und Manning, 2002). Demgegenüber sind Untersuchungen zur Rolle von Sphingobasen in Pflanzen weniger zahlreich vorhanden. Die Hypothese zur Rolle von Sphingobasen als Zelltod-regulierende Moleküle stützt sich dabei auf Experimente mit Fumonisin B<sub>1</sub>, *Pseudomonas syringae* oder Mutanten von Enzymen des Sphingolipid-Metabolismus mit veränderten Zelltodreaktionen. Weitere wichtige Hinweise für einen Effekt von Sphingobasen ergeben sich aus Experimenten mit exogen zugesetzten LCBs oder LCB-Ps bei Pflanzen. Speziell in diesem Bereich gibt es größere Unklarheiten über eine Zelltod-fördernde oder -inhibierende Wirkung und den damit verbundenen Antagonismus von LCBs/LCB-Ps.

#### 3.1.1 Evaluierung des Zelltods nach Behandlung mit LCB

Der direkte Effekt von Sphingobasen auf pflanzlichen Zelltod wurde von mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen methodischen Ansätzen untersucht, wobei sich die eingesetzte Konzentration der verwendeten LCBs, die Technik der Applikation sowie die Art der Zellen voneinander unterschieden (Alden *et al.*, 2011; Magnin-Robert *et al.*, 2015; Peer *et al.*, 2011; Saucedo-García *et al.*, 2011b; Shi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009). Um den durch Sphingobasen ausgelösten Zelltod möglichst genau beobachten und quantifizieren zu können, wurden in dieser Arbeit Leitfähigkeit-basierte Messungen bei Blattscheiben vorgenommen. Dieses System erlaubte auch die Anwendung mehrerer Applikationsformen und Konzentrationen der Sphingobasen zu testen.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob sich die Applikationen von Phytosphingosin (t18:0) mittels Infiltration und Immersion der Blattscheiben in Behandlungslösung hinsichtlich des ausgelösten Zelltods unterscheiden. Es wurden Blätter von *A. thaliana* mit 100 µM t18:0 oder Kontrolllösung infiltriert, Blattscheiben gestochen und diese in t18:0 Behandlungslösung zweier Konzentrationen oder Kontrolllösung eingelegt. Während weder die Infiltration von 100 µM t18:0 noch die Zugabe von 10 µM t18:0 zu einer Zelltodinduktion führten, konnte nach Immersion in 100 µM der Sphingobase nach 24 h ein Zelltod von etwa 12 % beobachtet werden (Abbildung 4 A). Um zu erfahren wie viel LCBs bei den beiden Behandlungsmethoden, Infiltration und Immersion, tatsächlich in das Gewebe aufgenommen wurden, konnten die Spiegel in den Blattscheiben mittels HPLC-MS/MS bestimmt werden. Dazu war es notwendig die Blattscheiben mit Methanol zu waschen, damit

keine Rückstände der Behandlungslösung das Ergebnis beeinflussen konnten. Abbildung 4B zeigt, dass 6 h nach Einlegen der Blattscheiben in 100  $\mu\text{M}$  Lösung etwa 650 nmol/g t18:0 im Frischgewicht des Gewebes vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden durch Infiltration der LCB nur etwa genauso hohe Spiegel erreicht (40 nmol/g) wie durch Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  t18:0. Interessanterweise fanden sich in den Blattscheiben mit hohen t18:0-Spiegeln, mit etwa 50 nmol/g t18:0-P, auch die höchsten Gehalte der LCB-P, was auf die Phosphorylierung der zugeführten Sphingobase im Gewebe schließen lässt.



**Abbildung 4: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel nach unterschiedlichen Applikationsarten von t18:0 in *Arabidopsis*-Blattmaterial.** (A) Zelltodinduktion nach Infiltration und Immersion in t18:0. Blätter wurden mit Kontrolllösung (2 % Methanol in Wasser) oder 100  $\mu\text{M}$  t18:0 infiltriert, anschließend Blattscheiben gestochen und diese in Kontrolllösung oder t18:0 der angegebenen Konzentration eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten nach Immersion der Blattscheiben (0 h) bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von t18:0 und t18:0-P in den Blattscheiben nach Infiltration und 6 h Immersion, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. (C) Phänotyp von Blättern nach Infiltration von 100  $\mu\text{M}$  t18:0, 100  $\mu\text{M}$  t18:0-P oder einer Kombination beider Sphingobasen. 4 Wochen alte Blätter wurden auf der rechten Blathälfte mit Behandlungslösung und auf der linken mit Kontrolllösung (2 % Methanol in Wasser) infiltriert. Die Blätter wurden nach zwei Tagen (48 h) von der Pflanze abgetrennt, fotografiert (links) und nachfolgend mit Trypanblau gefärbt (rechts). Zelltod lässt sich an der Infiltrationsstelle als gelbliche Läsion (links) oder dunkelblau gefärbter Bereich (rechts) erkennen. Maßstabsbalken = 1 cm.

In einigen Publikationen wurde ein direkter phänotypischer Effekt von LCBs auf Blätter in Form von Zelltod sowie eine antagonistische Wirkung durch LCB-Ps beschrieben (Shi *et al.*, 2007). Da hier im Test mit Blattscheiben kein Zelltod nach Infiltration von 100  $\mu\text{M}$  t18:0 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4 A), wurde eine phänotypische Evaluierung nach Infiltration von t18:0, t18:0-P und einer Kombination beider Sphingobasen in jüngere Blätter vorgenommen. Zelltod war in Form gelblicher Läsionen nur bei der Infiltration von t18:0 an der Infiltrationsstelle nach 48 h sichtbar, was auch durch Trypanblau-Färbung der Blätter bestätigt wurde (Abbildung 4 C). Weder bei der Infiltration von t18:0 in Kombination mit t18:0-P noch bei alleiniger Behandlung mit t18:0-P konnten Läsionen festgestellt werden, was den von Shi *et al.* (2007) beschriebenen inhibierenden Effekt der LCB-P widerspiegelt.

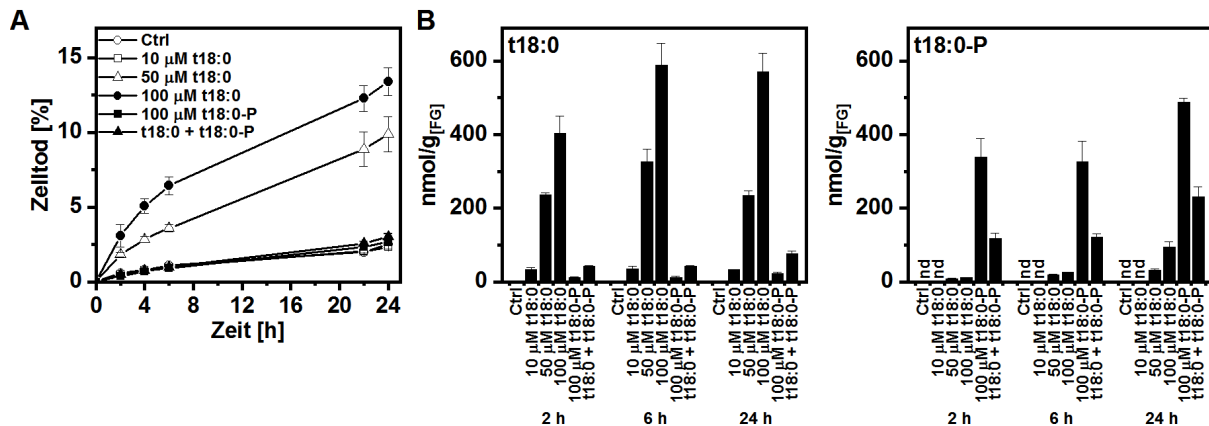
Für eine weitere Verwendung der hier angewandten Methode des Blattscheibentests zur Untersuchung eines Antagonismus von LCBs/LCB-Ps wurde zunächst noch die schnelle Aufnahme der Sphingobasen in das Gewebe genauer geprüft. Dafür wurden Blattscheiben in 100  $\mu\text{M}$  t18:0 eingelegt und die Spiegel im Gewebe und in der Behandlungslösung mit kurzen Zeiträumen bis 6 h analysiert. Es zeigte sich, dass bereits nach 1 h Inkubation etwa 65 % des nach 6 h vorhandenen Gehalts von t18:0 in den Blattscheiben vorhanden war, während gleichzeitig die Spiegel von t18:0-P gleichmäßig über die Zeit zunahm (Anhang, Abbildung A1 A). Auf der anderen Seite nahmen die Spiegel von t18:0 in der Behandlungslösung kontinuierlich ab. Nach 1 h waren noch etwa 25 % des t18:0 nachweisbar. Nach 6 h fanden sich lediglich 3 % der ursprünglich eingesetzten Konzentration der LCB noch in der Behandlungslösung (Anhang, Abbildung A1 B).

### 3.1.2 Zelltod bei gemeinsamer Zugabe von LCB und LCB-P

Die Hypothese, dass LCB-Ps in Pflanzen eine inhibierende Wirkung auf den durch LCBs ausgelösten Zelltod haben, beruht unter anderem auf Untersuchungen von Shi *et al.* (2007), in denen äquimolare Konzentrationen der beiden Sphingobasen-Spezies keinen Zelltod auslösten. Dies wurde auch in Abbildung 4 C gezeigt. Um diesen Antagonismus genauer zu untersuchen und die Zelltod-induzierende Wirkung von LCBs weiter zu charakterisieren, wurden Blattscheiben mit äquimolaren Konzentrationen von Phytosphingosin und Phytosphingosin-1-Phosphat behandelt.

100  $\mu\text{M}$  t18:0-P, 10  $\mu\text{M}$  t18:0 sowie t18:0/t18:0-P (je 100  $\mu\text{M}$ ) in Kombination lösten auch beim Test mit Blattscheiben keinen Anstieg der Leitfähigkeit aus, während durch Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  t18:0 eine Konzentrationsabhängigkeit der LCB für den Zelltod nachgewiesen wurde (Abbildung 5 A). Die Quantifizierung der Sphingobasen erfolgte zu drei Zeitpunkten (2 h, 6 h und 24 h) und zeigte, dass höhere Konzentrationen von t18:0 in Behandlungslösungen zu erhöhten Spiegeln der LCB in den Blattscheiben führte (Abbildung 5 B). Bei der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  t18:0 wurden die höchsten Gehalte im Gewebe mit 400 (2 h) bis 570 nmol/g (24 h) erreicht. Nach kombinierter Behandlung

mit t18:0/t18:0-P wurden vergleichbare Spiegel wie mit 10  $\mu\text{M}$  t18:0 in den Blattscheiben gemessen, was nicht ausreichend war, um einen Zelltod nachzuweisen.



**Abbildung 5: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel nach Behandlung von Blattscheiben mit t18:0 und t18:0-P.** (A) Zelltodinduktion nach Immersion in t18:0, t18:0-P. Blattscheiben wurden in Kontrolllösung (2 % Methanol in Wasser), t18:0 oder t18:0-P der angegebenen Konzentration eingelegt. Die kombinierte Behandlung enthielt je 100  $\mu\text{M}$  beider Sphingobasen. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von t18:0 und t18:0-P in den Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Durch die Bestimmung der Gehalte von LCB/LCB-P in den Behandlungslösungen konnte festgestellt werden, dass bei der gleichzeitigen Behandlung mit t18:0/t18:0-P die Konzentration beider Sphingobasen über die Zeit nicht abnahm und nach 24 h noch etwa genau so hoch war wie vor Zugabe zu den Blattscheiben (Anhang, Abbildung A2 A). Dies korreliert mit den niedrigen Spiegeln der LCB im Gewebe bei dieser Applikation und deutet auf eine verminderte Aufnahme von t18:0 hin, wenn dieses in Kombination mit t18:0-P appliziert wird.

Nach der Behandlung mit t18:0-P wurden in Blattscheiben Gehalte zwischen 330 und 490 nmol/g gemessen (Abbildung 5B). Im Gegensatz zu t18:0 blieben die Spiegel der LCB-P in der Behandlungslösung mit nur einer Sphingobase über den gemessenen Zeitraum hoch. Die Messung von abundanten Ceramiden im Gewebe zeigte nach Behandlung mit t18:0 (50 und 100  $\mu\text{M}$ ) einen starken Anstieg von t18:0-c16:0 (nach 6 h und 24 h) und t18:1-c16:0 (nach 24 h), was auf die Verfügbarkeit der zugeführten LCB für den Einbau in Sphingolipide schließen lässt (Anhang, Abbildung A2B).

### 3.1.3 Löslichkeit von LCB in organischen Phasen bei Anwesenheit von LCB-P

Es wurde gezeigt, dass bei Zugabe von t18:0/t18:0-P die Spiegel der LCB im Gewebe niedrig blieben und die Konzentration in der Behandlungslösung über die Zeit nicht abnahm (Abbildungen 5B, A2 A). Diese reduzierte Aufnahme von t18:0 in Gegenwart von



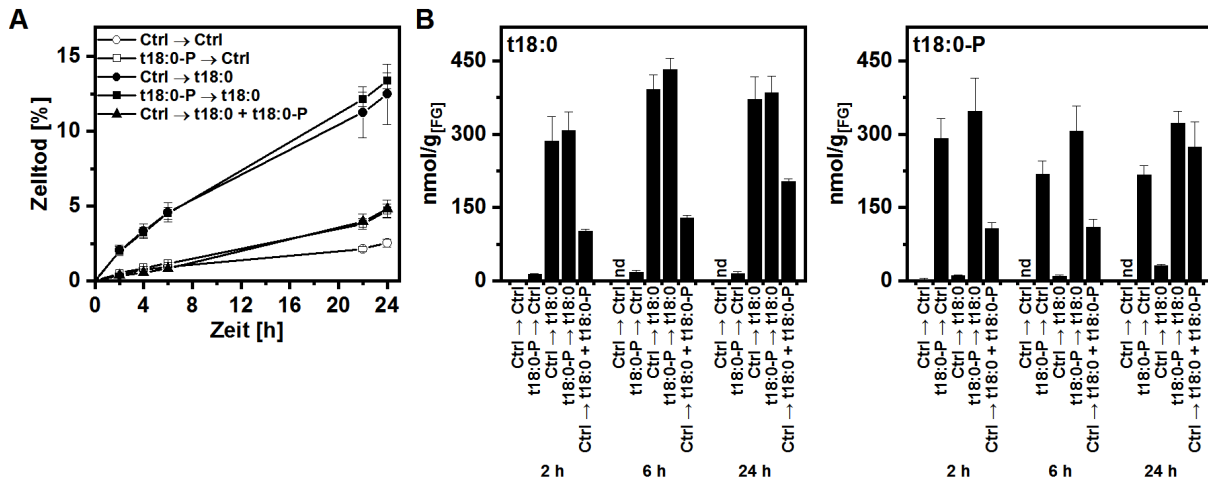
t18:0-P könnte in einer verminderten Diffusion durch die Plasmamembran aufgrund einer schlechteren Löslichkeit in der lipophilen Phase begründet sein. Um dies zu testen, wurde ein *in-vitro*-Experiment durchgeführt, in dem eine Lösung von t18:0 (100  $\mu$ M; 2 % Methanol; 100 mM Tris-HCl; pH 7,2) und eine Lösung von t18:0/t18:0-P in Kombination mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt wurden. Nach Mischen für 15 min wurden die Phasen getrennt und die Anteile an Sphingobasen mittels HPLC-MS/MS bestimmt. Die organische Phase wurde für die Messung verdampft, der Rückstand in Methanol gelöst. Für t18:0 fanden sich bei drei unabhängigen Proben 99,6 % (Standardabweichung:  $\pm 0,1$ ) der Menge in der organischen Phase, während für t18:0/t18:0-P 53,6 % (Standardabweichung:  $\pm 15,1$ ) des t18:0 dort nachgewiesen werden konnte. Dieses Verteilungsexperiment wurde zuerst mit gepufferten Lösungen (100 mM Tris-HCl; pH 7,2) angesetzt, da der pH-Wert einen generellen Effekt auf die Verteilung von LCBs in den Phasen haben könnte. Diese gepufferten Lösungen der LCB oder LCB-P waren für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Zelltodmessungen mit Blattscheiben aufgrund der hohen Leitfähigkeit nicht zu verwenden. Die für diese Experimente genutzten Behandlungslösungen wurden mit Wasser (2 % Methanol) angesetzt und hatten deshalb durch die Sphingobasen beeinflusste pH-Werte. Diese lagen für 100  $\mu$ M t18:0 bei etwa pH 7, für 100  $\mu$ M t18:0-P bei etwa pH 8,2 und für t18:0/t18:0-P bei etwa pH 9,1 und wurden vor jedem Experiment kontrolliert. Die Wiederholung des Verteilungsexperiments mit den Behandlungslösungen ergab einen Anteil von etwa 94,4 % (Standardabweichung:  $\pm 0,4$ ) des t18:0 in der organischen Phase für die einfache Behandlungslösung und 16,2 % (Standardabweichung:  $\pm 4,7$ ) t18:0 für die kombinierte t18:0/t18:0-P-Behandlungslösung. Der weitaus größere Teil (83,8 %) der LCB befand sich somit zusammen mit 100 % des t18:0-P in der wässrigen Phase. Die Anwesenheit von t18:0-P führte demnach zu einer verminderten Verteilung von t18:0 in der organischen Phase, was auch die passive Diffusion der Substanz durch die Plasmamembran beeinträchtigen könnte.

### 3.1.4 Zelltod nach Vorbehandlung mit LCB-P

Zur Umgehung des Problems der schlechten t18:0-Aufnahme bei gemeinsamer Zugabe mit t18:0-P wurde eine zeitversetzte Behandlung mit den beiden Sphingobasen vorgenommen. Es wurden Blattscheiben für 3 h in 100  $\mu$ M t18:0-P gelegt, bevor die Lösung getauscht wurde und die Leitfähigkeitsmessung startete.

Die getrennte Immersion wurde mit der kombinierten Applikation von t18:0/t18:0-P verglichen. Anders als nach gemeinsamer Zugabe von t18:0/t18:0-P löste die LCB nach Vorbehandlung mit LCB-P einen Zelltod von etwa 13 % (24 h) aus, der nicht von der Zelltodinduktion durch t18:0 alleine zu unterscheiden war (Abbildung 6 A). Durch die zeitlich getrennte Aufnahme konnten hohe t18:0-P-Spiegel (300–350 nmol/g) in den Blattscheiben zusammen mit hohen t18:0-Spiegeln (300–430 nmol/g) erreicht werden, was bei der gleichzeitigen Gabe, wie in den Experimenten zuvor, nicht in dem Maße möglich war (Ab-

bildung 6B). Hohe Spiegel von t18:0-P im Gewebe waren damit nicht ausreichend, den t18:0-induzierten Zelltod zu hemmen. Die Messung der Konzentrationen der Sphingobasen in den Lösungen zeigte, dass die Gehalte von t18:0 bei der einfachen Gabe auch nach vorheriger Immersion in t18:0-P schneller und in höherem Maße abnahmen als bei der kombinierten Behandlung (Abbildung A3). Dies ist ein weiteres Zeichen für die bessere Aufnahme von LCBs bei zeitlich getrennter Applikation.



**Abbildung 6: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel in Blattscheiben nach zeitversetzter Behandlung mit t18:0 und t18:0-P.** (A) Zelltodinduktion nach zwei unterschiedlichen Behandlungen. Blattscheiben wurden in der ersten Lösung eingelegt, nach 3 h mit Wasser gewaschen und in der zweiten Behandlungslösung für die angegebene Zeit inkubiert. Die Behandlungslösung bestand aus 100  $\mu$ M der jeweiligen Sphingobase oder einer Kontrolle (2 % Methanol in Wasser). Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten, nach Beginn der Behandlung mit der zweiten Lösung, bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von t18:0 und t18:0-P in den Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Sphingobasen auf den Pathogen-induzierten Zelltod in *A. thaliana*

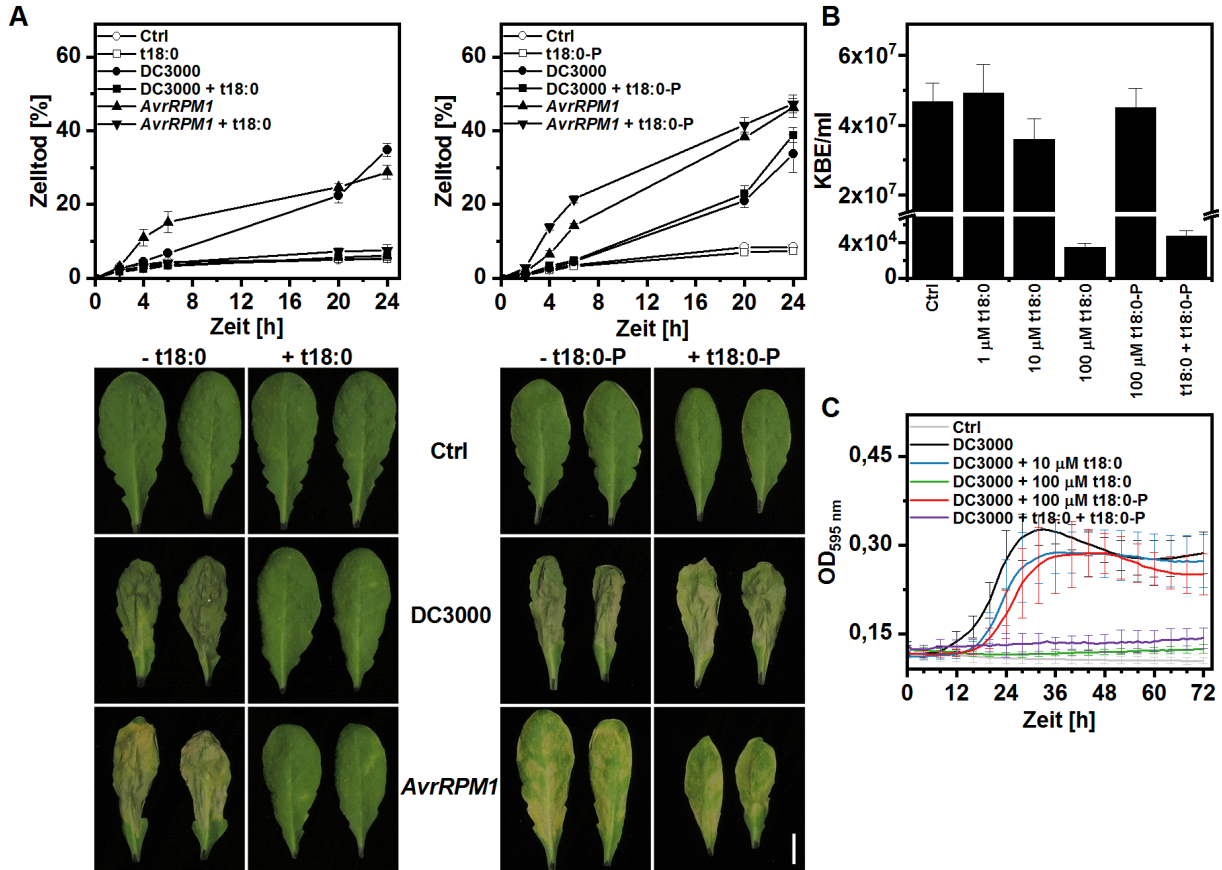
Hemibiotrophe Pathogene wie das Bakterium *Pseudomonas syringae* lösen Zelltod in Pflanzen aus. Dabei ist zwischen eher unspezifischen Schädigungen, wie sie generell durch Infektionen mit virulenten Stämmen entstehen können und spezifischem programmiertem Zelltod zu unterscheiden, der durch Erkennung von avirulenten Stämmen im Wirt ausgelöst wird. Von Peer *et al.* (2010) wurde ein stärkerer, langanhaltender Anstieg der t18:0-Spiegel in *A. thaliana* nach Infektion mit avirulenten *P. syringae* gegenüber einem schwachen, transienten Anstieg mit virulenten Bakterien beschrieben. Diese Hinweise lassen eine regulatorische Funktion von LCBs im Verlauf des programmierten Zelltods bei Pflanzen vermuten.

### 3.2.1 Einfluss von LCB und LCB-P auf *Pseudomonas*-induzierten Zelltod in Pflanzen und auf das Wachstum von Bakterien

Ein inhibierender Effekt von LCBs und LCB-Ps nach exogener Zugabe auf den *Pseudomonas*-induzierten Zelltod in *Arabidopsis* wurde von Magnin-Robert *et al.* (2015) nachgewiesen. Dort wurden unter anderem bei Koinfiltration von Sphingobasen (d18:0 oder t18:0-P) und *Pseudomonas* eine niedrigere Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und ein verminderter Zelltod bei Leitfähigkeitsmessungen von Blattscheiben beobachtet. Dies stand teilweise im Widerspruch zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Zelltod-induzierenden Effekt von LCBs (Abbildung 4). Zur Untersuchung dieser hemmenden Effekte von LCBs und LCB-Ps auf den durch *P. syringae* ausgelösten Zelltod wurde hier zunächst das von Magnin-Robert *et al.* (2015) beschriebene Experiment mit dem bereits getesteten Versuchsaufbau durchgeführt. Hierfür wurden Blätter von *A. thaliana* mit dem Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mit oder ohne Avirulenzfaktor *AvrRpm1* in einer Suspension gemeinsam mit Sphingobasen infiltriert. Die Blattscheiben wurden direkt nach Infiltration gestochen und die Leitfähigkeitsmessung nach Transferieren in Wasser begonnen. Der durch *Pseudomonas* ( $OD_{600} = 0,01$ ) ausgelöste Zelltod lag nach 24 h sowohl für den virulenten Stamm (DC3000) als auch für den avirulenten Stamm (*AvrRpm1*) bei 30 bis 50 % (Abbildung 7 A). Die Form der Zelltodinduktion konnte dabei deutlich zwischen *Pst AvrRpm1* und DC3000 unterschieden werden. Während bei *AvrRpm1* bereits in den ersten 6 h ein Anstieg der Leitfähigkeit zu verzeichnen war, der bei den späteren Zeitpunkten etwas weniger stark war, konnte bei DC3000 erst gegen Ende der Messung (22 h und 24 h) ein sich entwickelnder Zelltod beobachtet werden. Dies spiegelt bei DC3000 den unspezifischen Zelltod wider, der vermutlich bei längerer Dauer des Experiments deutlich stärker zunehmen würde. Im Gegensatz dazu steht für *Pst AvrRpm1*-Infiltration die hypersensitive Antwort als schnelle Form des programmierten Zelltods. 72 h nach Infiltration konnten auch phänotypisch diese unterschiedlichen Arten des Zelltods an den Blättern in Form von gelben Bereichen bei *AvrRpm1* und stark geschädigtem Gewebe bei DC3000 unterschieden werden (Abbildung 7 A). Koinfiltration mit t18:0-P führte weder bei *AvrRpm1* noch bei DC3000 zu einer Verringerung des Zelltods. Im Fall der gemeinsamen Gabe mit *AvrRpm1* lag er zu den früheren Zeitpunkten sogar etwas höher als bei der Einzelbehandlung mit den Bakterien. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Magnin-Robert *et al.* (2015). Bei der Koinfiltration mit t18:0 konnte hingegen, unabhängig vom *Pseudomonas*-Stamm, die für d18:0 beschriebene starke Reduktion des Zelltods auch mit t18:0 bestätigt werden. Auch der Phänotyp der Blätter zeigte bei gemeinsamer Gabe von t18:0 und Bakterien keine Schädigungen (Abbildung 7 A).

Dieses deutliche Ausbleiben des Zelltods bei gemeinsamer Infiltration von *Pseudomonas* und t18:0 könnte in einem direkten Effekt der Sphingobase auf die Bakterien begründet sein. Aus dem medizinischen Bereich ist eine antibakterielle Wirkung von Sphingobasen für mehrere Bakterien bekannt (Fischer *et al.*, 2012). Um einen direkten Einfluss von LCBs

auf *P. syringae* bei den hier durchgeführten Experimenten zu untersuchen, wurden Bakteriensuspensionen der zehnfachen optischen Dichte, wie sie für die Infiltration der Blätter genutzt wurden ( $OD_{600} = 0,1 \approx 5 \times 10^7$  KBE/ml), mit verschiedenen Konzentrationen der LCB oder LCB-P versetzt.



**Abbildung 7: Zelltodinduktion in *Arabidopsis*-Blattmaterial nach Infiltration von *P. syringae* und t18:0 oder t18:0-P und direkter Einfluss der Sphingobasen auf Bakterien.** (A) Zelltodinduktion nach Koinfiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) und t18:0 oder t18:0-P. Blätter wurden mit Kontrolllösung (10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 % DMSO), *Pst* DC3000, *Pst* *AvrRpm1* ( $OD_{600} = 0,01$ ) und/oder 100 µM t18:0 oder 100 µM t18:0-P infiltriert, anschließend Blattscheiben gestochen und diese in Wasser eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung des Wassers bei den angegebenen Zeitpunkten, nach Immersion der Blattscheiben (0 h), bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Überzählige Blätter wurden 72 h nach Infiltration von den Pflanzen abgetrennt und fotografiert. Maßstabsbalken = 1 cm. (B) Effekt von t18:0 und t18:0-P auf Bakterienzellzahl. Eine Suspension von *Pst* DC3000 (10 mM MgCl<sub>2</sub>;  $OD_{600} = 0,1$ ; 2 % DMSO) wurde mit t18:0 und/oder t18:0-P der angegebenen Konzentration angesetzt. Die Kombination enthielt je 100 µM beider Sphingobasen. Verschiedene Verdünnungen wurden zur Bestimmung koloniebildender Einheiten (KBE) ausplattiert. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. (C) Effekt von t18:0 und t18:0-P auf Bakterienwachstum. Flüssigmedium (KB-Medium; 2 % DMSO) wurde mit t18:0 und/oder t18:0-P der angegebenen Konzentration angesetzt. Die Kombination enthielt je 100 µM beider Sphingobasen. Anschließend wurde das Medium mit *Pst* DC3000 auf eine  $OD_{600}$  von 0,01 inokuliert (10 mM MgCl<sub>2</sub> als Kontrolle) und bei 28 °C unter Schütteln für die angegebene Zeit inkubiert. Die  $OD_{595}$  wurde stündlich gemessen. Werte sind Mittelwerte aus acht unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Aufgrund besserer Übersichtlichkeit wurde nur bei jedem vierten Datenpunkt die Standardabweichung dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  t18:0 die Anzahl lebender Bakterien in der Suspension um etwas mehr als den Faktor Eintausend reduziert (Abbildung 7B). Eine ähnlich starke Reduktion ließ sich bei der Kombination der beiden Sphingobasen t18:0/t18:0-P feststellen, während niedrigere Konzentrationen der LCB und LCB-P alleine keinen starken Effekt auf die Zellzahl hatten. Lediglich bei 10  $\mu\text{M}$  t18:0 konnte noch ein leichter, aber dennoch signifikanter Effekt ( $P < 0,035$  in zweiseitigem Zweistichproben-*t*-Test) beobachtet werden. Da der durch die Sphingobasen beeinflusste pH-Wert der Suspensionen einen negativen Effekt auf die Bakterien haben könnte, wurde das Experiment mit gepufferter Lösung (100 mM Tris-HCl; pH 7,2) wiederholt. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt). Hingegen wurde bei der Verwendung dichter Bakterienkulturen ( $\text{OD}_{600} = 1$ ) für 100  $\mu\text{M}$  t18:0 nur die leichte Reduktion der Zellzahl, wie sie im hier dargestellten Experiment mit 10  $\mu\text{M}$  t18:0 zu sehen war, festgestellt.

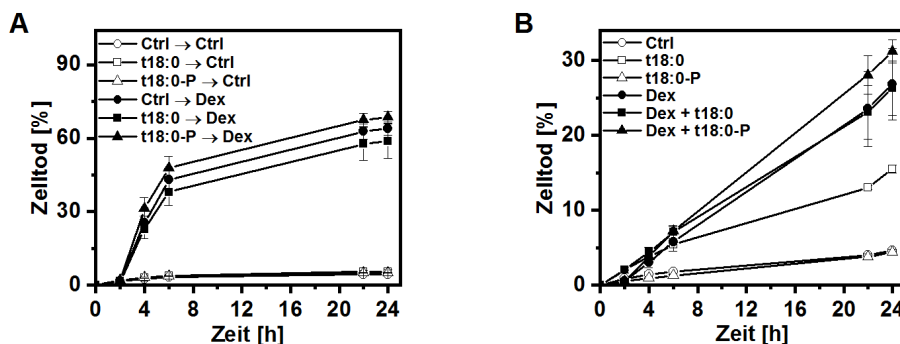
Als einen zweiten Ansatz zur besseren Charakterisierung des Effekts von LCBs auf Bakterien wurde das Wachstum von *P. syringae*-Flüssigkulturen in Anwesenheit von t18:0 und t18:0-P untersucht. Dazu wurde Flüssigmedium mit den Sphingobasen versetzt und mit *Pseudomonas* inokuliert. Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der optischen Dichte dokumentiert. Vor Inokulation mit den Bakterien wurde der pH-Wert des Mediums mit der LCB oder LCB-P bestimmt um sicherzugehen, dass eine ausreichende Pufferkapazität vorhanden war. Der pH-Wert lag dabei stets beim Wert des Mediums ohne Zusatz (pH 7,2). Nach Inokulation der Kulturen zeigte sich bei 100  $\mu\text{M}$  t18:0 und der gemeinsamen Anwesenheit von t18:0/t18:0-P kein Wachstum der Bakterien in einem Zeitraum von 72 h (Abbildung 7C). Demgegenüber verhält sich die Zunahme der optischen Dichte beim Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  t18:0 oder 100  $\mu\text{M}$  t18:0-P ähnlich wie in der Kultur ohne Sphingobasen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Bestimmung der Zellzahl (Abbildung 7B) und bestätigt den negativen Effekt von LCBs auf Bakterien. Bemerkenswerterweise konnte der gleichzeitige Zusatz von t18:0-P diesen negativen Effekt nicht hemmen. Die bei Pflanzen beobachtete reduzierte Aufnahme der Sphingobasen bei äquimolarer Zugabe von LCBs/LCB-Ps scheint bei Bakterien nicht der Fall zu sein. Die hier gezeigten Experimente für den Effekt von Sphingobasen auf *P. syringae* wurden auch mit *E. coli* durchgeführt, wobei gleiche Ergebnisse erzielt wurden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2 Einfluss von LCB und LCB-P auf den AvrRpm1-induzierten Zelltod

Für eine weitergehende Untersuchung eines Einflusses von LCBs oder LCB-Ps auf den programmierten Zelltod in Pflanzen konnte, neben dem avirulenten Stamm von *P. syringae*, der Effekt auf die direkt durch den Avirulenzfaktor verursachte hypersensitive Antwort getestet werden. Dazu wurde auf die transgene *Arabidopsis*-Linie *Dex:AvrRpm1-HA* zurückgegriffen (Geng und Mackey, 2011), die es ermöglicht das bakterielle Typ-III-Effektorprotein (AvrRpm1) unter der Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors zu exprimieren. Hiermit konnte programmierter Zelltod in den Leitfähigkeit-

basierten Blattscheibenexperimenten spezifischer ausgelöst werden, was die experimentellen Möglichkeiten zur Applikation der Sphingobasen erweiterte.

Zunächst wurde die Linie mit hohen Konzentrationen von Dexamethason ( $50\ \mu\text{M}$ ) getestet, um die Zelltodreaktion nach der möglichst vollständigen Induktion des Promotors zu charakterisieren. Dabei wurde schon nach 6 h ein Zelltod von etwa 65% erreicht, wobei kein Effekt von zusätzlich zugesetztem t18:0-P sichtbar war (Anhang, Abbildung A4). In der Folge wurden niedrigere Konzentrationen von Dexamethason ( $50\ \text{nM}$ ) verwendet, um eine schwächere Entwicklung des Zelltods zu erreichen und einen Effekt der Sphingobasen besser einschätzen zu können. Die Sphingobasen wurden dabei auf zwei Weisen zugesetzt: Zum einen durch Infiltration vor Induktion der AvrRpm1-Expression und zum anderen gleichzeitig mit Dexamethason. In keinem der Fälle führten t18:0 oder t18:0-P zu einer Reduktion des AvrRpm1-induzierten programmierten Zelltods (Abbildung 8). Auffällig war die verzögerte Induktion des Zelltods, sodass 2 h nach Zugabe des Dexamethasons noch keine Reaktion festgestellt werden konnte, was auf die Zeit bis zur Expression des Avirulenzproteins hinweisen könnte. Dies war ähnlich zu den zuvor durchgeführten Experimenten mit *Pst AvrRpm1* (Abbildung 7 A). Bei gleichzeitiger Zugabe des t18:0 zeigte sich die schnellere Zelltodreaktion bereits nach 2 h, obwohl diese zu späteren Zeitpunkten zusammen mit Dexamethason zu keiner höheren Leitfähigkeit führte als die Zugabe des Induktors alleine (Abbildung 8 B). Selbst die vergleichsweise niedrige Konzentration des Dexamethasons von  $50\ \text{nM}$  löste einen höheren Zelltod als die alleinige Behandlung mit t18:0 aus, die in Abbildung 8 A durch Infiltration, wie in den Experimenten zuvor, nicht von der Kontrolle zu unterscheiden war und in Abbildung 8 B durch Immersion der Blattscheiben etwa 15% Zelltod nach 24 h erreichte.



**Abbildung 8: Einfluss von t18:0 und t18:0-P auf AvrRpm1-induzierten Zelltod in Blattscheiben.** (A) Zelltodinduktion durch AvrRpm1-Expression nach Vorinfiltration mit t18:0 oder t18:0-P. Blätter der Linie *Dex:AvrRpm1-HA* wurden mit Kontrolllösung (2% Methanol in Wasser),  $100\ \mu\text{M}$  t18:0 oder  $100\ \mu\text{M}$  t18:0-P infiltriert, anschließend Blattscheiben gestochen und diese in Kontrolllösung oder  $50\ \text{nM}$  Dexamethason eingelegt. (B) Zelltodinduktion durch AvrRpm1-Expression in Anwesenheit von t18:0 oder t18:0-P. Blattscheiben der Linie *Dex:AvrRpm1-HA* wurden in Kontrolllösung (2% Methanol in Wasser),  $100\ \mu\text{M}$  t18:0,  $100\ \mu\text{M}$  t18:0-P und/oder  $50\ \text{nM}$  Dexamethason eingelegt. Der Zelltod in (A) und (B) wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten nach Immersion der Blattscheiben (0h) bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100% Zelltod gesetzt wurde. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.3 Untersuchungen zum Zelltod in *A. thaliana*-Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus

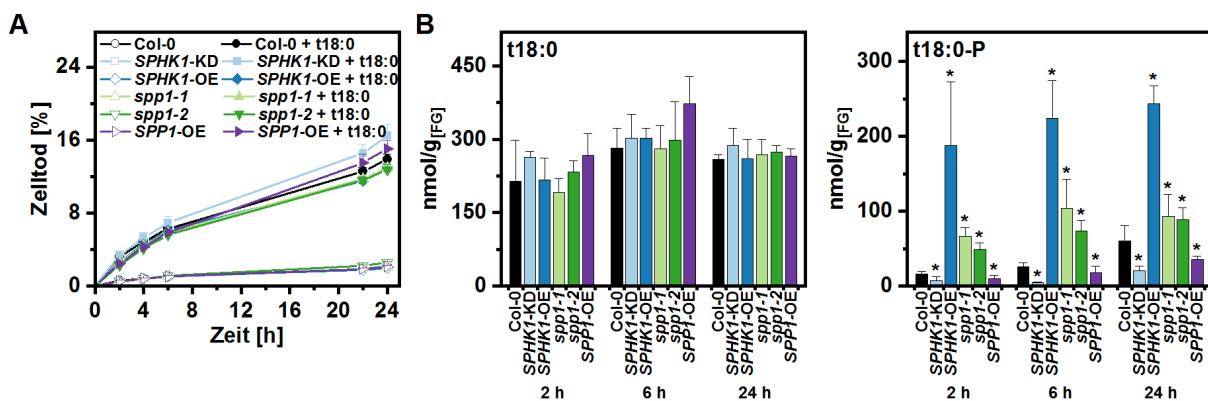
Sphingobasen bilden die Ausgangsbausteine der Biosynthese von komplexeren Sphingolipiden. In Pflanzen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Mutanten von Enzymen des Sphingobasen- und Sphingolipid-Metabolismus charakterisiert und hinsichtlich eines Phänotyps untersucht. Neben grundsätzlichen Effekten auf die Entwicklung unter optimalen Wachstumsbedingungen, die in einzelnen *knockout*-Mutanten eher selten zu finden sind, wurden zahlreiche in Verbindung mit Zelltod stehende Phänotypen unter biotischen Stressbedingungen beschrieben (Berkey *et al.*, 2012). Trotz der Charakterisierung dieser Mutanten im Hinblick auf die Reaktion gegenüber Zelltod-auslösenden Bedingungen sind Untersuchungen in Verbindung mit den dabei herrschenden Gehalten von Sphingobasen in der Minderheit. Speziell das Verhältnis von phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Sphingobasen in Mutanten, die diesen Teil des Metabolismus betreffen, wurden dabei bisher weniger genau bestimmt. Dieses Verhältnis ist für die Hypothese eines Antagonismus von LCBs und LCB-Ps bei Zelltodreaktionen von großer Bedeutung.

Hier fiel das Interesse auf Mutanten von Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus, die an der Konvertierung von LCBs/LCB-Ps durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder der Degradierung beteiligt sind. Als solche wurden in *A. thaliana* als LCB-Kinase SPHK1, LCB-P-Phosphatase SPP1 und LCB-P-Lyase DPL1 beschrieben (Nakagawa *et al.*, 2012; Tsegaye *et al.*, 2007; Worrall *et al.*, 2008). Diese sind nach den zuerst untersuchten homologen Enzymen in Tieren oder *Saccharomyces cerevisiae* als Sphingosin-Kinase 1 (SPHK1), Sphingosin-1-Phosphat-Phosphohydrolase 1 (SPP1) und Dihydrosphingosin-1-Phosphat-Lyase 1 (DPL1) benannt. Die für *Arabidopsis* verfügbaren T-DNA-Insertionsmutanten der Gene, die für diese Enzyme kodieren, wurden bezogen, mit PCR genotypisiert und falls nötig, zur Homozygotie vermehrt. Dabei wurden, wenn vorhanden, sowohl mehrere *knockout*-Linien mit T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich als auch potenzielle Überexpressionslinien mit einer T-DNA-Insertion im Promotor herangezogen (siehe Abschnitt 2.1.3, Tabelle 3 für eine Übersicht der Mutantenlinien). Nachdem diese Linien etabliert waren, wurde die Expression der betroffenen Gene mittels qRT-PCR untersucht. Für jede der Linien wurde je nach *knockout* oder Überexpression eine starke Reduktion beziehungsweise Erhöhung der Transkriptmenge des entsprechenden Gens gezeigt (Anhang, Abbildung A5). Diese entsprachen den beschriebenen Effekten (Nakagawa *et al.*, 2012; Worrall *et al.*, 2008). Allerdings wurde, anders als bei Nakagawa *et al.* (2012), keine gleichzeitige Reduktion der Genexpression von *DPL1* in den Mutantenlinien *spp1* festgestellt. Obwohl bei einem *knockout* durch T-DNA-Insertion die Detektion des Transkripts auf diese Weise nicht reduziert sein muss, da je nach genauem Ort der Insertion immer noch verkürzte oder veränderte mRNA, abhängig von den Primer-Bindestellen, nachgewiesen werden kann, ist für die Feststellung der Überexpression diese Analyse wichtig. Während für *SPHK1*-OE die starke Überexpression um das etwa 65fache noch etwas höher lag als von Worrall *et*

al. (2008) berichtet, konnte für die erstmals untersuchte Linie *SPP1*-OE eine moderate Überexpression um das Vierfache beobachtet werden (Anhang, Abbildung A5).

### 3.3.1 Evaluierung des Zelltods nach Zugabe von LCB in Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus

Da keine der Linien einen veränderten Phänotyp unter normalen Wachstumsbedingungen zeigte, wurde die Zelltodinduktion nach Zugabe von LCBs charakterisiert. Dabei lag der Fokus zunächst auf den Linien, bei denen ein direkter Einfluss auf das Verhältnis von LCBs/LCB-Ps durch stärkere oder verminderte Phosphorylierung der zugesetzten LCB beziehungsweise folgender erneuter Dephosphorylierung der gebildeten LCB-P erwartet wurde. Als solche waren hier besonders die Mutanten der LCB-Kinase und der LCB-P-Phosphatase von Interesse. Deshalb wurden Blattscheiben der Linien, mit Ausnahme von *dpl1-1* und *dpl1-2*, mit t18:0 behandelt und der Zelltod mittels Leitfähigkeitsmessung bestimmt. Wie in vorigen Experimenten zeigte sich nach Zugabe von t18:0 die Zelltodinduktion mit etwa 14% Zelltod für den Wildtyp (Col-0) nach 24 h. Die verschiedenen Genotypen unterschieden sich dabei kaum bezüglich des induzierten Zelltods voneinander. Für *SPHK1*-KD als *knockdown*-Linie der LCB-Kinase konnte mit 16,5% die stärkste, aber nicht signifikant unterschiedliche Reaktion beobachtet werden (Abbildung 9 A).



**Abbildung 9: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel in Blattscheiben von Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus nach Behandlung mit t18:0.** (A) Zelltodinduktion nach Immersion in t18:0. Blattscheiben der angegebenen Genotypen wurden in Kontrolllösung (2% Methanol in Wasser) oder 100  $\mu$ M t18:0 eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100% Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von t18:0 und t18:0-P in den mit 100  $\mu$ M t18:0 behandelten Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  des jeweiligen Genotyps. Für Zelltodmessungen in (A) wurden Niveaus mittels ANOVA für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „t18:0-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet. Für Spiegel in (B) wurden Signifikanzniveaus mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet.

Bei einer zeitlichen Analyse der Spiegel von LCBs und LCB-Ps in den mit t18:0 be-



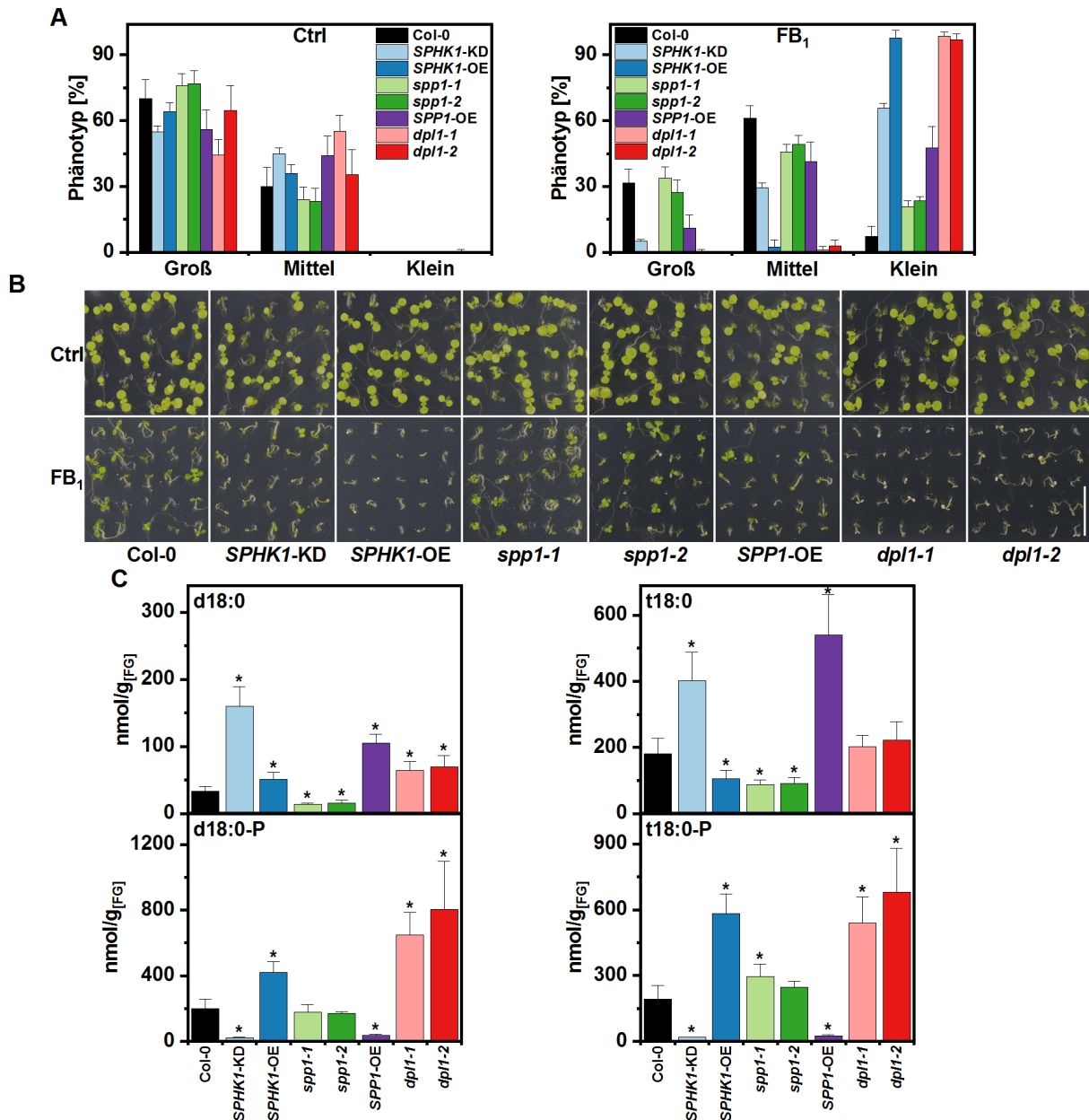
handelten Blattscheiben ließen sich für t18:0-P große Unterschiede zwischen den Linien feststellen (Abbildung 9 B). So waren die Spiegel in den Linien *SPHK1*-KD und in geringerem Umfang *SPP1*-OE gegenüber dem Wildtyp reduziert. Demgegenüber fanden sich in *SPHK1*-OE mit 190 bis 240 nmol/g, besonders zu den frühen Zeitpunkten (2 h, 6 h), zehnfach höhere Gehalte von t18:0-P als im Wildtyp, während *spp1-1* und *spp1-2* zu diesen Zeitpunkten zwischen drei- und vierfach höhere Gehalte als Col-0 aufwiesen (Abbildung 9 B). Die Spiegel von t18:0 waren zu allen untersuchten Zeitpunkten mit Schwankungen von 190 (2 h, *spp1-1*) bis 370 nmol/g (6 h, *SPP1*-OE) deutlich ähnlicher zwischen den Genotypen und es konnte keine signifikante, generelle Erhöhung der LCB beobachtet werden. Dies liegt vermutlich an der starken Zufuhr durch direkte Behandlung mit der hohen Konzentration von t18:0. Trotz des deutlich höheren Verhältnisses der Spiegel von t18:0-P/t18:0 bei *SPHK1*-OE im Vergleich zum Wildtyp wurde in dieser Mutante nicht weniger Zelltod induziert.

Ein Unterschied zwischen den Genotypen bei späteren Zeitpunkten (24 h) konnte bei den Gehalten der Ceramide t18:0-c16:0 und t18:1-c16:0 erkannt werden (Anhang, Abbildung A6 A). Diese stiegen bei Behandlung mit t18:0 stark an, wobei die Zunahme in den Mutanten *spp1-1*, *spp1-2* und *SPHK1*-OE deutlich geringer ausfiel. Dies könnte daran liegen, dass hier die Abführung der LCB verstärkt über die Phosphorylierung zu t18:0-P erfolgte (Abbildung 9 B). Als Kontrolle der basalen Spiegel der Sphingobasen und Ceramide wurden diese zum 24 h-Zeitpunkt bestimmt. Für t18:0 konnten in diesem Experiment die basalen Spiegel, vermutlich aufgrund einer geringeren Messsensitivität, nicht detektiert werden. Die basalen Gehalte von t18:0-P konnten im Wildtyp und in den meisten Mutanten nach Kontrollbehandlung aufgrund der geringen Menge an Blattmaterial (5 Blattscheiben pro Probe), wie in vorigen Experimenten, nicht bestimmt werden (vergleiche Abbildungen 4, 5, 6). Nur *spp1-1* und *spp1-2* zeigten Spiegel von 7–8 nmol/g t18:0-P (Abbildung A6 B). Aus einer Bestimmung der Nachweisgrenze mit gelöstem LCB-P konnte geschlossen werden, dass diese bei ungefähr 1 nmol/g lag und somit in den Mutanten der LCB-P-Phosphatase erhöht war. Interessanterweise konnten bei der Linie mit den höchsten t18:0-P-Spiegeln nach t18:0-Behandlung, *SPHK1*-OE, keine so hohen basalen LCB-P-Spiegel nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Evaluierung des FB<sub>1</sub>-induzierten Effekts auf das Wachstum in Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus

Um zu untersuchen wie die Spiegel von LCBs und LCB-Ps ohne externe Zugabe der Sphingobasen den Zelltod in Pflanzen beeinflussen, konnte auf Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) zurückgegriffen werden. Dieses Toxin aus nekrotrophen Ascomyceten der Gattung *Fusarium* löst in Pflanzen Zelltod mit Merkmalen der hypersensitiven Antwort aus. FB<sub>1</sub> führt über die Hemmung von Ceramid-Synthasen zu einem starken Anstieg der Sphingobasen (Abbas *et al.*, 1994; Markham *et al.*, 2011). Es wurde in zahlreichen Untersuchungen bei Pflanzen

verwendet, in denen mehrere Mutanten von Enzymen des Sphingolipid-Metabolismus mit einem veränderten Phänotyp gegenüber  $\text{FB}_1$  beschrieben wurden (Berkey *et al.*, 2012).



**Abbildung 10: Effekt von Fumonisin B<sub>1</sub> auf Wachstum und Sphingobasen-Spiegel von *Arabidopsis*-Keimlingen.** (A) Wachstum verschiedener Genotypen auf Kontrollmedium (links) und Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  (rechts). Keimlinge wurden für 12 Tage nach der Aussaat auf dem Medium angezogen und anschließend in die drei Kategorien „Groß“, „Mittel“ und „Klein“ eingeteilt. Prozentwerte für die Anzahl der Pflanzen in den drei Kategorien wurden anhand von Platten mit 55 Keimlingen pro Genotyp berechnet. Werte sind Mittelwerte von vier unabhängigen Platten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. (B) Phänotyp der verschiedenen Genotypen nach Wachstum auf Kontrollmedium (obere Reihe) und Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  (untere Reihe) für 12 Tage. Maßstabsbalken = 1 cm. (C) Spiegel von d18:0, d18:0-P, t18:0 und t18:0-P von Keimlingen der verschiedenen Genotypen nach Wachstum auf Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  für 12 Tage, gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 25–50 Keimlingen einer Platte und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  des jeweiligen Genotyps und wurden mittels allgemeinem linearem Modell für eine Interaktion der Faktoren „Genotyp“ und „ $\text{FB}_1$ -Behandlung“ für jede der vier Sphingobasen berechnet.

Falls höhere Spiegel von LCB-Ps einen antagonistischen Effekt auf den LCB-induzierten Zelltod haben, wurde angenommen, dass eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $FB_1$  in Mutanten mit einem niedrigeren Verhältnis von phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Sphingobasen korreliert. Die Sensitivität gegenüber  $FB_1$  kann in *A. thaliana* unter anderem als Effekt auf das Wachstum von Keimlingen charakterisiert werden. Dazu wurden Mutanten und Wildtyp auf Medium mit  $FB_1$  angezogen und nach 12-tägigem Wachstum hinsichtlich Größe und Schädigung verglichen. Wie in Abbildung 10 A ersichtlich, führte  $FB_1$  zu einer erhöhten Anzahl kleinerer, geschädigter Pflanzen. Diese Verschiebung zu kleineren Keimlingen war am stärksten in den Mutanten *dpl1-1*, *dpl1-2* und *SPHK1-OE*, bei denen fast jede Pflanze in diese Kategorie fiel. Zusätzlich konnte zwischen *dpl1-1/dpl1-2* und *SPHK1-OE* die Art der Schädigung unterschieden werden. Während Keimlinge von *dpl1-1* und *dpl1-2* zumeist zwei kleinere Blätter ausbildeten, die schließlich chlorotisch wurden, waren Keimlinge von *SPHK1-OE* noch etwas kleiner (Abbildung 10 B). Trotz dieses leicht unterschiedlichen Phänotyps wurden die Pflanzen dieser Linien für Abbildung 10 A als klein kategorisiert (siehe Anhang, Abbildung A7 A für Beispiele der Kategorien). Auch *SPHK1-KD* und *SPP1-OE* zeigten eine höhere Sensitivität als Col-0, wohingegen *spp1-1* und *spp1-2* dem Wildtyp ähnlich waren (Abbildung 10 A, B).

Bei der Analyse der Sphingobasen-Spiegel nach 12-tägigem Wachstum auf  $FB_1$ -Medium ließen sich für *dpl1-1*, *dpl1-2* und *SPHK1-OE* zwei- bis vierfach höhere Gehalte von d18:0-P und t18:0-P als im Wildtyp beobachten (Abbildung 10 C). Im Gegensatz dazu waren die Gehalte der LCB-Ps in *SPHK1-KD* und *SPP1-OE* um das bis zu Zehnfache reduziert. Dafür wiesen diese beiden Mutanten im Vergleich zu Col-0 zwei- bis dreifach höhere Spiegel von d18:0 und t18:0 auf. Eine Zusammenstellung der Verhältnisse von LCB-Ps zu LCBs findet sich im Anhang (Tabelle A3). Außerdem konnten in diesem Versuch bei Einfluss von  $FB_1$ , neben den am häufigsten vorkommenden LCB-Ps (d18:0-P und t18:0-P), auch d18:1-P und t18:1-P detektiert werden. Diese waren in *dpl1-1* und *dpl1-2* stark erhöht, auch wenn die absoluten Spiegel mit maximal 6 nmol/g gegenüber den Hauptspezies der LCB-Ps zu vernachlässigen waren (Anhang, Abbildung A7 B). Ebenso konnte für die Ceramide t18:0-c16:0 und t18:1-c16:0 bei Wachstum auf Medium mit  $FB_1$  eine deutliche Erhöhung in den beiden *knockout*-Mutanten der LCB-P-Lyase, im Vergleich zum Wildtyp, festgestellt werden. Die basalen Spiegel der Sphingobasen und Ceramide in der Kontrolle unterschieden sich kaum zwischen den Genotypen mit Ausnahme der Gehalte von t18:0-P, die wiederum nur in *spp1-1* und *spp1-2* zu detektieren waren (Anhang, Abbildung A7 C). Da die Mutanten mit der größten Sensitivität gegenüber  $FB_1$  (*dpl1-1*, *dpl1-2* und *SPHK1-OE*) dabei auch die höchsten Spiegel der LCB-Ps aufwiesen, wurde untersucht, wie sich diese Mutanten in Kombination mit einem *knockout* der LCB-P-Phosphatase (*spp1-1*, *spp1-2*) verhielten, der bei Kontrollbedingungen die höchsten basalen Spiegel von phosphorylierten Sphingobasen besaß, allerdings keinen veränderten  $FB_1$ -Phänotyp erkennen ließ. Durch Kreuzung der Linien wurden die beiden Doppelmутanten *SPHK1-OE* × *spp1-2* und *spp1-2* × *dpl1-1* erzeugt, die anschließend bis zur Homozygotie beider mutierter

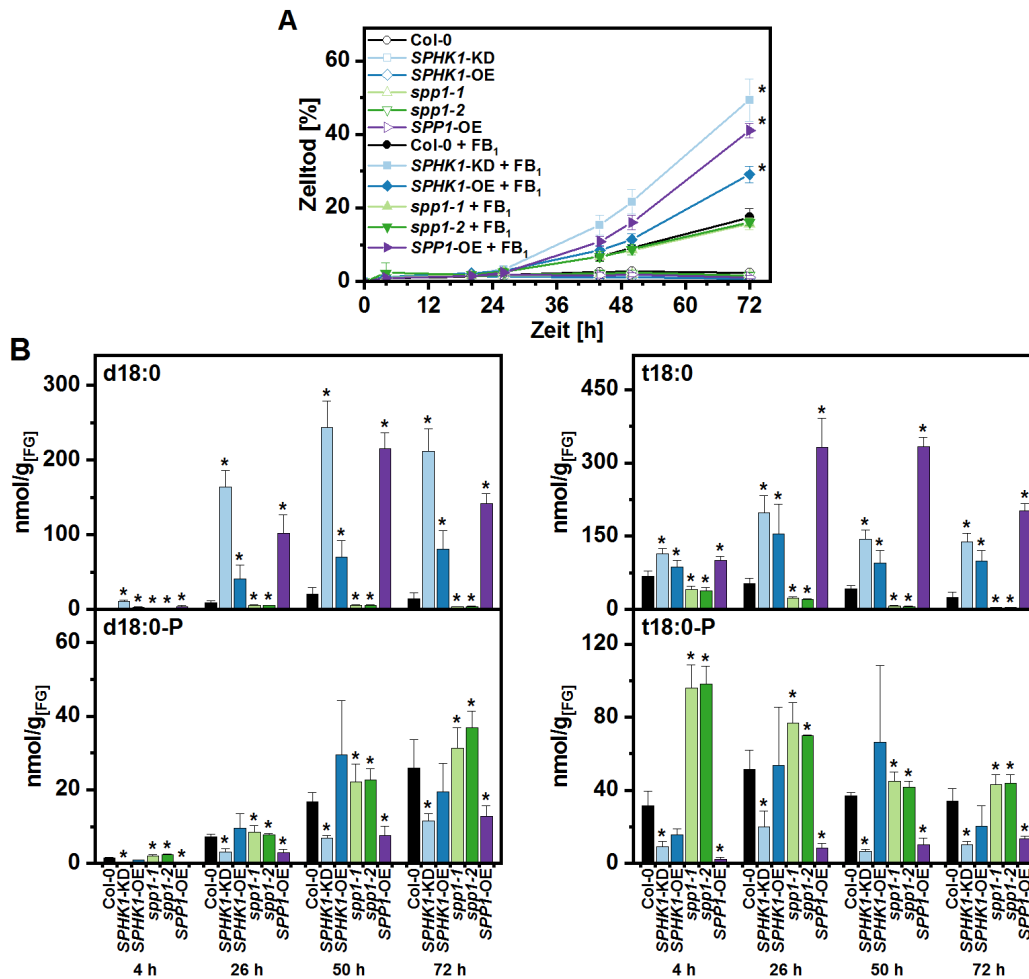
Gene vermehrt wurden. Aussaat und Wachstum der Doppelmutanten auf FB<sub>1</sub>-Medium zeigte für *spp1-2* × *dpl1-1* keinen Unterschied zu *dpl1-1*, während Keimlinge von *SPHK1*-OE × *spp1-2* noch etwas kleiner erschienen als *SPHK1*-OE (Anhang, Abbildung A7D). Bei einer Analyse der basalen Sphingobasen-Spiegel konnten für *SPHK1*-OE × *spp1-2* im Vergleich zu den 4–5 nmol/g t18:0-P in *spp1-2* (Abbildung A7C) etwa 25 nmol/g der LCB-P gemessen werden.

### 3.3.3 Evaluierung des Zelltods nach Zugabe von FB<sub>1</sub> in Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus

Um die Korrelation zwischen dem FB<sub>1</sub>-induzierten Zelltod und den Spiegeln von LCBs und LCB-Ps genauer untersuchen zu können, wurden die *Arabidopsis*-Linien für Leitfähigkeit-basierte Blattscheibenexperimente mit Charakterisierung der Zelltodinduktion und Entwicklung der Sphingobasen-Spiegel nach direkter Behandlung mit FB<sub>1</sub> verwendet. Da sich der Zelltod nach Zugabe von FB<sub>1</sub> langsamer entwickelte als nach Behandlung mit LCBs, wurde die Dauer des Experiments gegenüber diesen Versuchen auf drei Tage verlängert, wobei die Gehalte der LCBs/LCB-Ps an jedem der Tage bestimmt wurden. Zwei der Mutanten, *SPHK1*-KD und *SPP1*-OE, zeigten bereits nach zwei Tagen einen höheren Zelltod als Col-0, welcher nach drei Tagen auf 40–50 % anstieg. Für *SPHK1*-OE ließ sich nach 72 h ein knapp zweifach höherer Zelltod erkennen, während *spp1-1* und *spp1-2* ähnlich dem Wildtyp waren (Abbildung 11 A).

Stärkerer Zelltod in den Linien *SPHK1*-KD und *SPP1*-OE wurde von stark erhöhten Spiegeln der LCBs begleitet. Bemerkenswerterweise war für *SPHK1*-KD bereits nach 26 h der Gehalt von d18:0 mit etwa 160 nmol/g um das 18fache höher als in Col-0. Demgegenüber stand für t18:0 ab dem zweiten Tag (26, 50, 72 h) nur eine Erhöhung um das Dreis- bis Vierfache (Abbildung 11 B). Für *SPP1*-OE wurden sowohl für d18:0 als auch für t18:0 deutlich höhere Spiegel als im Wildtyp gemessen. Beide Linien, *SPHK1*-KD und *SPP1*-OE, wiesen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu Col-0 niedrigere Gehalte der LCB-Ps d18:0-P und t18:0-P auf. Die beobachteten Unterschiede der phosphorylierten Sphingobasen waren zwischen den Linien über alle Zeitpunkte hinweg allerdings nicht so groß wie die der LCBs. *SPHK1*-OE zeigte Wildtyp-Spiegel von d18:0-P und t18:0-P zwischen einem und drei Tagen nach Beginn der FB<sub>1</sub>-Behandlung, während die Gehalte der LCBs d18:0 und t18:0 signifikant höher lagen.

Bei den Ceramid-Spiegeln nach Behandlung mit FB<sub>1</sub> oder in der Kontrolle sowie bei den basalen Spiegeln der Sphingobasen konnten keine starken Unterschiede zwischen den Linien festgestellt werden (Anhang, Abbildung A8 A B). Der in Abbildung 11 A mittels Leitfähigkeitsmessung bestimmte Zelltod nach FB<sub>1</sub>-Behandlung konnte auch optisch unterschieden werden. Nach 72 h in der Lösung erschienen die Blattscheiben der Linien mit den höchsten gemessenen Zelltodwerten (*SPHK1*-KD und *SPP1*-OE) etwas gelblicher als die anderen Genotypen (Anhang, Abbildung A8 C).

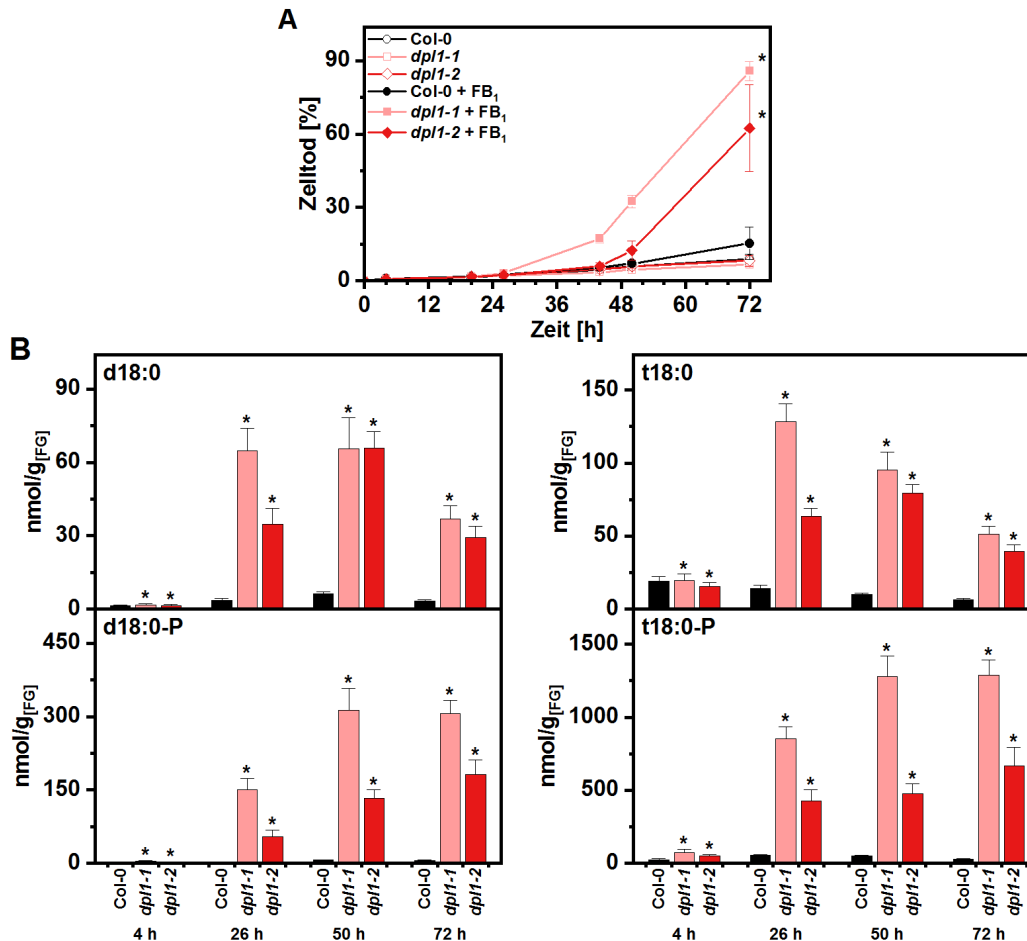


**Abbildung 11: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel in Blattscheiben von Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus nach Behandlung mit Fumonisin B<sub>1</sub>.** (A) Zelltodinduktion nach Immersion in FB<sub>1</sub>. Blattscheiben der angegebenen Genotypen wurden in Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) oder 50  $\mu$ M FB<sub>1</sub> eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von d18:0, d18:0-P, t18:0 und t18:0-P in den mit 50  $\mu$ M FB<sub>1</sub> behandelten Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  des jeweiligen Genotyps. Für Zelltodmessungen in (A) wurden Niveaus mittels ANOVA für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet. Für Spiegel in (B) wurden Signifikanzniveaus mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet.

### 3.3.4 Analyse des FB<sub>1</sub>-induzierten Zelltods in den *knockout*-Mutanten *dpl1*

Die Mutanten der LCB-Kinase SPHK1 und der LCB-P-Phosphatase SPP1 wurden in Blattscheibenexperimenten nach Zugabe von 50  $\mu$ M Fumonisin B<sub>1</sub> untersucht. Neben diesem Experiment wurden auch geringere Konzentrationen des Mykotoxins (10  $\mu$ M) verwendet, um die Zelltodinduktion in den verschiedenen Linien zu charakterisieren. Dabei zeigten sich die gleichen Tendenzen hinsichtlich der Sensitivität gegenüber FB<sub>1</sub> (Anhang, Abbildung A9). Allerdings war die Induktion des Zelltods deutlich geringer, sodass signi-

fikante Unterschiede nur für *SPHK1*-KD erkannt wurden. Die Linien mit der stärksten Sensitivität beim Wachstum in Gegenwart von  $\text{FB}_1$  waren *knockout*-Mutanten der LCB-P-Phosphatase, *dpl1-1* und *dpl1-2* (Abbildung 10). Diese Mutanten wurden deshalb bei geringerer  $\text{FB}_1$ -Konzentrationen in Blattscheibenexperimenten getestet.



**Abbildung 12: Zelltodinduktion und Sphingobasen-Spiegel in Blattscheiben der *knockout*-Mutanten *dpl1* nach Behandlung mit Fumonisin  $\text{B}_1$ .** (A) Zelltodinduktion nach Immersion in  $\text{FB}_1$ . Blattscheiben der angegebenen Genotypen wurden in Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) oder  $10 \mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Spiegel von d18:0, d18:0-P, t18:0 und t18:0-P in den mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  behandelten Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  des jeweiligen Genotyps. Für Zelltodmessungen in (A) wurden Niveaus mittels ANOVA für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „ $\text{FB}_1$ -Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet. Für Spiegel in (B) wurden Signifikanzniveaus mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet.

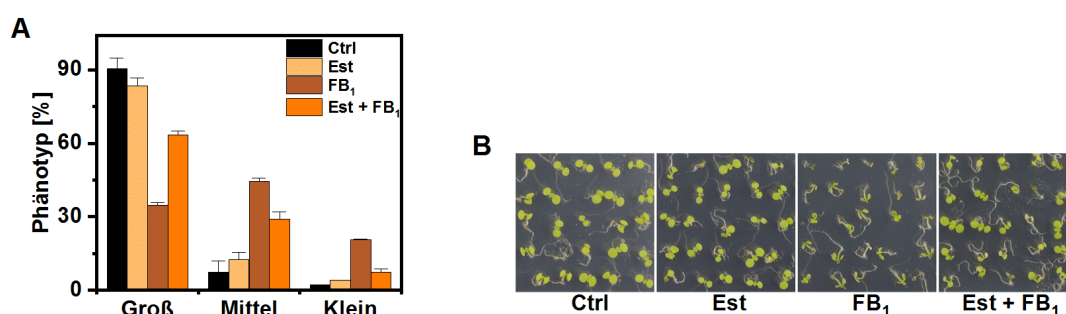
Beide *dpl1*-Mutanten zeigten, im Vergleich zu Col-0, zwei Tage (50 h) nach Zugabe von  $\text{FB}_1$  einen höheren Zelltod, der nach drei Tagen auf bis zu 85 % anstieg (Abbildung 12 A). Die Spiegel der vier Sphingobasen d18:0, t18:0, d18:0-P und t18:0-P waren ab 26 h nach Beginn der  $\text{FB}_1$ -Behandlung alle stark erhöht. Besonders die LCB-Ps waren um das etwa

50fache für *dpl1-1* und um das 20fache für *dpl1-2* stärker akkumuliert als im Wildtyp (Abbildung 12 B). Zu allen Zeitpunkten wiesen die *dpl1*-Mutanten dabei ein höheres Verhältnis von phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Sphingobasen auf (Anhang, Tabelle A3).

Wie bei der Untersuchung des Einflusses von  $FB_1$  auf das Wachstum (Anhang, Abbildung A7 B) konnten bei *dpl1-1* und *dpl1-2* in Gegenwart des Mykotoxins beim Blattscheibenexperiment geringe Gehalte der LCB-Ps d18:1-P, t18:1-P und ein stärkerer Anstieg der Ceramide t18:0-c16:0 und t18:1-c16:0 nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung A10 A).

### 3.3.5 Analyse des $FB_1$ -induzierten Zelltods bei Überexpression von *DPL1*

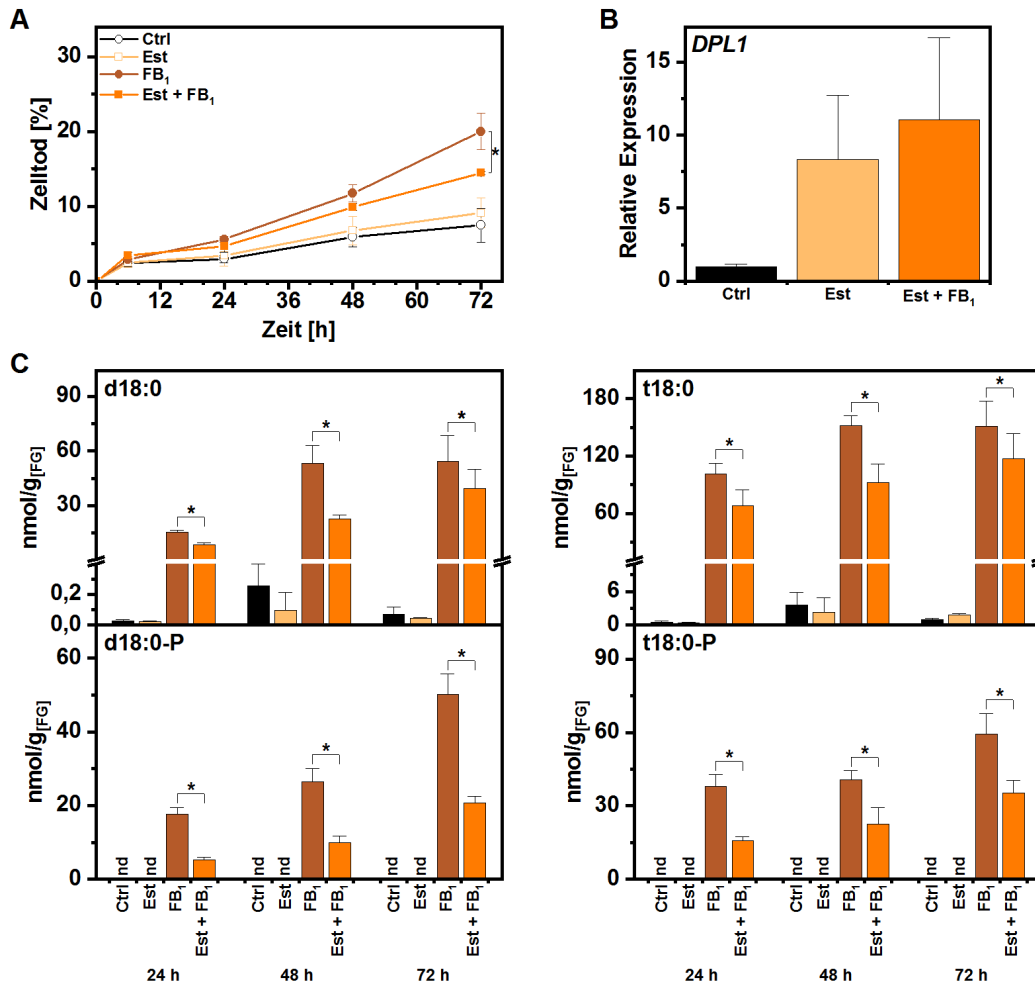
Anders als für die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten der LCB-Kinase SPHK1 und LCB-P-Phosphatase SPP1 waren bisher für *DPL1* keine Überexpressionslinien bekannt oder beschrieben. Die starke Sensitivität der *knockout*-Mutanten *dpl1* gegenüber Fumonisin  $B_1$  in Wachstums- und Blattscheibenexperimenten (Abbildungen 10, 12) mit stark erhöhten Spiegeln der LCB-Ps ließ dieses Enzym für die Untersuchung des Antagonismus von LCBs/LCB-Ps besonders interessant werden. Daher wurde die kodierende Sequenz von *DPL1* mit dem von Zuo *et al.* (2000) entwickelten  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren Expressionssystem kloniert. Nach stabiler Transformation von *A. thaliana* erlaubte dies die Überexpression von *DPL1* unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren Promotors durch Behandlung mit dem Hormon. Durch Selektion und Vermehrung wurde so in der dritten Generation nach Transformation die homozygote Linie *XVE-HA-DPL1* mit einfacher T-DNA-Insertion an unbekannter Stelle im Genom etabliert.



**Abbildung 13: Effekt von Fumonisin  $B_1$  auf Wachstum von Keimlingen bei induzierbarer Überexpression von *DPL1*.** (A) Wachstum der Linie *XVE-HA-DPL1* auf Kontrollmedium, Medium mit  $10 \mu M$   $\beta$ -Estradiol, Medium mit  $0,5 \mu M$   $FB_1$  oder Medium der Kombination von  $\beta$ -Estradiol und  $FB_1$ . Keimlinge wurden für 12 Tage nach der Aussaat auf dem Medium angezogen und anschließend in die drei Kategorien „Groß“, „Mittel“ und „Klein“ eingeteilt. Prozentwerte für die Anzahl der Pflanzen in den drei Kategorien wurden anhand von Platten mit 49 Keimlingen berechnet. Werte sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Platten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. (B) Phänotyp der Linie *XVE-HA-DPL1* nach Wachstum auf den verschiedenen Medien für 12 Tage. Maßstabsbalken = 1 cm.

Zunächst wurde die Linie *XVE-HA-DPL1* zur Untersuchung der *DPL1*-Überexpression auf den  $FB_1$ -induzierten Zelltod in einem Wachstumsexperiment getestet. Dazu wurden

Keimlinge der transgenen Linie auf Medium mit  $\beta$ -Estradiol und/oder  $\text{FB}_1$  angezogen. Während  $\beta$ -Estradiol keinen negativen Einfluss auf das Wachstum hatte, konnte der Effekt des  $\text{FB}_1$  auf die Pflanzen durch Anwesenheit des Hormons im Medium verringert werden. Dies zeigte sich nicht erst nach Einteilung der gewachsenen Keimlinge in Kategorien (Abbildung 13 A), sondern konnte bereits bei einfachem Betrachten der Platten erkannt werden (Abbildung 13 B).



**Abbildung 14: Zelltodinduktion und Spingobasen-Spiegel in Blattscheiben nach Behandlung mit Fumonisin  $\text{B}_1$  bei induzierbarer Überexpression von *DPL1*.** (A) Zelltodinduktion nach Immersion in  $\beta$ -Estradiol und  $\text{FB}_1$ . Blattscheiben der Linie *XVE-HA-DPL1* wurden in Kontrolllösung (2 % Methanol in Wasser), 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Estradiol und/oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. (B) Expression des Gens *DPL1* (*At1g27980*) in Blattscheiben wurde 24 h nach Immersion in der entsprechenden Behandlungslösung nach RNA-Extraktion mittels qRT-PCR analysiert und auf das Referenzgen *ACT2/8* (*At3g18780*, *At1g49240*) normalisiert. Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. (C) Spiegel von d18:0, d18:0-P, t18:0 und t18:0-P in den behandelten Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (A) und (C) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  der  $\beta$ -Estradiol-Behandlung. Für Zelltodmessungen in (A) wurden Niveaus mittels ANOVA, für Spiegel in (C) mittels allgemeinem linearem Modell, für den Faktor „Est-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet.



Für die genauere Charakterisierung der Überexpression von *DPL1*, dem daraus resultierenden Effekt auf die Spiegel von LCBs/LCB-Ps und den FB<sub>1</sub>-induzierten Zelltod wurden Blattscheibenexperimente mit direkter Behandlung der Linie mit  $\beta$ -Estradiol und FB<sub>1</sub> durchgeführt. Der durch Zugabe von FB<sub>1</sub> in der Linie *XVE-HA-DPL1* ausgelöste Zelltod in Höhe von 20 % nach 72 h konnte durch gleichzeitige Behandlung mit  $\beta$ -Estradiol signifikant reduziert werden (Abbildung 14 A). Dabei wurde eine Induktion der Expression von *DPL1* nach 24 h um das Acht- bis Zehnfache erreicht (Abbildung 14 B). Die Analyse der Spiegel von LCBs und LCB-Ps nach einem, zwei und drei Tagen zeigte einen geringeren Anstieg der Gehalte der Sphingobasen d18:0, t18:0, d18:0-P und t18:0-P bei gleichzeitiger Behandlung mit  $\beta$ -Estradiol im Vergleich zur alleinigen Zugabe von FB<sub>1</sub>. Die Spiegel der LCB-Ps waren bei der kombinierten Behandlung zu allen drei Zeitpunkten um das Zwei- bis Dreifache niedriger, während die Spiegel der LCBs um das höchstens Zweifache reduziert waren (Abbildung 14 C).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zelltodregulation bei exogener Zugabe von nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Sphingobasen

Die Hypothese eines Antagonismus von LCBs und LCB-Ps bei Zelltodprozessen wurde im tierischen System begründet, in dem die Zusammenhänge zwischen Sphingosin (d18:1) und Sphingosin-1-Phosphat (d18:1-P), die Phosphorylierung durch Sphingosin-Kinasen (SPHK), Bindung an spezifische Rezeptoren und Apoptose umfassend untersucht wurden (Hait *et al.*, 2006). In Pflanzen sind verschiedene Untersuchungen zu LCBs als Regulatoren von Zelltodprozessen bekannt. Viele dieser Studien beruhen auf der Verwendung des Mykotoxins Fumonisin B<sub>1</sub> oder der direkten Zugabe von Sphingobasen wie d18:0, d18:1 und t18:0. So wurden in Pflanzen auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MPK6 und die Calcium-abhängige Proteinkinase CPK3 als mögliche Signalkomponenten des LCB-vermittelten programmierten Zelltods identifiziert (Lachaud *et al.*, 2013; Saucedo-García *et al.*, 2011b, 2015). Dagegen ist die Rolle von LCB-Ps in der Zelltodregulation bei Pflanzen aufgrund des Fehlens der in Tieren identifizierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Sphingosin-1-Phosphat unklar. Wegen der in *Arabidopsis* bekannten und charakterisierten Enzyme der LCB-Kinasen (SPHK1, SPHK2, LCBK1, LCBK2) wurde in mehreren Publikationen eine Rolle von LCB-Ps an Prozessen wie Schließung der Stomata und Kälteadaptation beschrieben (Coursol *et al.*, 2003, 2005; Dutilleul *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017; Worrall *et al.*, 2008). Darüber hinaus dient die Phosphorylierung der Sphingobasen möglicherweise als Abbauweg über die LCB-P-Lyase DPL1. Hingegen basiert die Hypothese einer inhibierenden Wirkung von LCB-Ps auf den Zelltod in Pflanzen zum Großteil auf Experimenten, bei denen Sphingobasen exogen zugegeben wurden. So wurde von Alden *et al.* (2011) unter anderem berichtet, dass die Behandlung mit Sphingosin-1-Phosphat (d18:1-P), nicht aber mit Dihydrosphingosin-1-Phosphat (d18:0-P), den durch Hitze und Ceramide induzierten Zelltod in *Arabidopsis*-Zellkulturen hemmt. Im Gegensatz dazu wurde von Coursol *et al.* (2015) berichtet, dass LCB-Ps (d18:0-P, t18:0-P) die durch den Elicitor Cryptogein ausgelöste Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* verstärken, während LCBs (d18:0, d18:1, t18:0) diese reduzieren. Hinweise auf einen direkten inhibierenden Effekt von LCB-Ps auf den durch LCBs-induzierten Zelltod, bei gleichzeitiger Infiltration von *Arabidopsis*-Blättern, wurden von Shi *et al.* (2007) gefunden. Die exogene Zugabe von Sphingobasen wurde somit von mehreren Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Applikationsformen in verschiedenen Pflanzenspezies und Zellarten durchgeführt (Da Silva *et al.*, 2011; Lachaud *et al.*, 2010, 2011; Magnin-Robert *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2001; Peer *et al.*, 2011; Saucedo-García *et al.*, 2011b; Takahashi *et al.*, 2009; Testard *et al.*, 2016). Die Berichte über Zelltod-fördernde oder Zelltod-inhibierende Wirkung von LCBs und besonders LCB-Ps unterscheiden sich dabei zum Teil.

In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen der Leitfähigkeit zur Bestimmung eines Zelltodeffekts nach Behandlung mit Sphingobasen durchgeführt. Dabei wurde sich am methodischen Ansatz aus Peer *et al.* (2011) orientiert, in dem die Zelltodinduktion verschiedener LCBs (d18:0, t18:0, d17:1, d20:0) verglichen wurde. Nach Wiederholung dieser Experimente wurde hier im weiteren Verlauf Phytosphingosin (t18:0) mit dem zugehörigen LCB-P Phytosphingosin-1-Phosphat (t18:0-P) verwendet, da dieses die in Pflanzen abundanteste, natürlich vorkommende Sphingobase darstellt und im Vergleich zu d18:0 stärkeren Zelltod induzierte (13–16 % für t18:0, 6–8 % für d18:0, jeweils nach 24 h). In einem Test verschiedener Applikationsformen der Sphingobasen (Infiltration gegenüber Immersion) konnte gezeigt werden, dass Infiltration von t18:0 zu keinem messbaren Zelltod bei Leitfähigkeitsexperimenten führt, da es hierbei nicht möglich war hohe Spiegel der LCB ins Gewebe zu applizieren (Abbildung 4). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Magnin-Robert *et al.* (2015), wo bei ähnlichen Experimenten keine Zelltodinduktion durch Infiltration von d18:0 detektiert wurde, steht jedoch im Widerspruch zu Shi *et al.* (2007), die den Zelltod in Blättern durch Infiltration anhand von Zelltodfärbungen zeigten. Deshalb wurde hier auch der Zelltod durch Infiltration an ganzen Blättern von *A. thaliana* genauer untersucht und es wurden Läsionen an der direkten Infiltrationsstelle nach 48 h beobachtet (Abbildung 4 C). Da Blattscheiben außerhalb dieses Bereichs gestochen wurden, konnte dagegen mit dieser Applikationsform kein Zelltod in Leitfähigkeitsexperimenten detektiert werden. Die mangelnde Ausbreitung des Zelltods im Blatt bei Infiltration könnte in der sehr schnellen Aufnahme des t18:0 begründet liegen, die auch bei Experimenten mit Immersion in Behandlungslösung beobachtet wurde (Anhang, Abbildung A1).

Zur genaueren Untersuchung des von Shi *et al.* (2007) vorgeschlagenen hemmenden Effekts von LCB-Ps auf den Zelltod, bei gleichzeitiger Behandlung mit LCBs, wurde in den weiteren Experimenten die Immersion der Blattscheiben in Sphingobasen-Lösung angewandt, da hier der Zelltod bei sehr gut kontrollierbaren Bedingungen bestimmt werden konnte. Dabei wurde bei gemeinsamer Gabe von t18:0/t18:0-P kein Zelltod festgestellt (Abbildung 5 A), was den beschriebenen Antagonismus von LCBs/LCB-Ps belegt (Shi *et al.*, 2007). Allerdings konnte durch die Messung der Spiegel von t18:0 und t18:0-P dieser Effekt auf die mangelnde Aufnahme der LCB zurückgeführt werden, weil hierbei ein zehnfach niedrigerer Gehalt im Gewebe nachgewiesen wurde als bei alleiniger Behandlung mit t18:0 und die Konzentration der Behandlungslösung während des Experiments hoch blieb (Abbildung 5 B; Anhang, Abbildung A2). Durch ein *in-vitro*-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von t18:0 zwischen der wässrigen und der organischen Phase stark durch t18:0-P beeinflusst wurde. Wie anhand der chemischen Eigenschaften vermutet wurde, findet sich bei getrennten Lösungen nach Zugabe von Chloroform t18:0 in der organischen Phase, während t18:0-P wegen der polaren Phosphatgruppe in der wässrigen Phase verbleibt. Bei der kombinierten Lösung von t18:0/t18:0-P konnte dagegen der Großteil beider Sphingobasen in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Dies lässt auf

eine Interaktion von nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Sphingobasen schließen, wenn diese zusammen in einer Lösung vorliegen, was auch die Diffusion durch die Plasmamembran bei der Applikation an Pflanzen beeinträchtigen könnte und so die beobachtete geringere Aufnahme in das Gewebe erklärt. Da Moleküle in geladener Form nur schlecht die Membran passieren können und die Nettoladung der Sphingobasen durch den pH-Wert der Lösung bestimmt wird, wurde dieser kontrolliert und das *in-vitro*-Experiment zur Verteilung der Sphingobasen in gepufferter Umgebung wiederholt. Hierbei wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit ungepufferten Lösungen. Der pH-Wert schien somit keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zu haben, da auch die leicht basischen Behandlungslösungen nach Kontakt mit Blattscheiben einen neutralen pH-Wert annahmen. Die hier gezeigte verminderte Verfügbarkeit von t18:0 in den Zellen bei gemeinsamer Gabe mit t18:0-P könnte auch die mangelnde Zelltodinduktion aus anderen Arbeiten erklären (Shi *et al.*, 2007).

Um dieses Problem experimentell zu umgehen, wurden Blattscheiben aufeinanderfolgend mit getrennten Lösungen von t18:0-P und t18:0 behandelt. Nach Erreichen hoher Spiegel von t18:0-P im Gewebe konnte anschließend durch Tausch der Behandlungslösung mit t18:0 ein hoher LCB-Spiegel und in der Folge ein Anstieg der Leitfähigkeit induziert werden, der nicht von dem Zelltod ohne Vorbehandlung mit LCB-P zu unterscheiden war (Abbildung 6). Dies widerspricht dem hypothetischen antagonistischen Effekt von t18:0-P. Dagegen war die Stärke des Zelltodes in allen Experimenten eng mit den Spiegeln von t18:0 korreliert. Durch Einsatz verschiedener Konzentrationen der LCB konnte ein Zelltod unterschiedlicher Stärke ausgelöst werden. Obwohl die Zufuhr der Gesamtmenge von t18:0 aufgrund der schlechter werdenden Löslichkeit in wässrigen Behandlungslösungen auf maximal 100  $\mu\text{M}$  beschränkt wurde, konnten durch Erhöhung des Volumens, bei gleichbleibender Masse der Blattscheiben, auch höhere Zelltodwerte induziert werden ( $> 20\%$  nach 24 h). Bei den dargestellten Experimenten wurden bei einem Nachweis von etwa 400 bis 600 nmol/g t18:0 im Gewebe etwa 13% (24 h) der durch Kochen des Pflanzenmaterials erreichbaren Gesamtleitfähigkeit gemessen. Diese Spiegel entsprachen dabei einer etwa hundertfachen Erhöhung gegenüber den Basalspiegeln der LCB. Wie die Abfuhr des Überschusses der zugesetzten Sphingobasen erreicht wurde, konnte teilweise durch Messung einiger Metabolite nachvollzogen werden. So war über die Zeit eine deutliche Zunahme von t18:0-P und der Ceramide mit kurzkettigen Fettsäuren (t18:0-c16:0 und t18:1-c16:0) erkennbar, sodass auf eine Umsetzung der zugeführten LCB durch Enzyme geschlossen werden kann (Abbildung 4 B, 5 B, Anhang, Abbildung A2 B). Auch Ceramide können bei der Erklärung von Zelltodreaktionen nicht außer Acht gelassen werden, da für diese ebenfalls Berichte über eine Rolle bei der Regulation von programmiertem Zelltod existieren (Bi *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2003; Simanshu *et al.*, 2014; Townley *et al.*, 2005). Da die hier gemessene Zunahme aber im Vergleich zu den Spiegeln der Sphingobasen eher gering ausfiel ist fraglich, inwiefern Ceramide in den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zum Zelltod beitragen.

Viele Untersuchungen zum Effekt von LCB-Ps in Pflanzen wurden durch exogene Zugabe von Inhibitoren der LCB-Kinasen durchgeführt (Alden *et al.*, 2011; Coursol *et al.*, 2003, 2005, 2015; Dutilleul *et al.*, 2012). Als solche wurden N,N-Dimethylsphingosin (DMS) und DL-*threo*-Dihydrosphingosin in Tieren als Analoga für die Inhibierung der Sphingosin-Kinase beschrieben (Edsall *et al.*, 1998; Kohama *et al.*, 1998). In pflanzlichen Zellkulturen wurden dabei in den angegebenen Studien normalerweise Konzentrationen von 10 bis 25  $\mu\text{M}$  verwendet und *in vitro* die Aktivität der LCB-Kinase und Phosphorylierung von Sphingobasen mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Direkte Messungen von LCBs und LCB-Ps mittels HPLC-MS/MS im Verlauf von Experimenten zur Untersuchung der Funktion bei exogener Zugabe von Sphingobasen oder LCB-Kinase-Inhibitoren wurden dagegen bisher nicht durchgeführt. Es ist zu beachten, dass bei einer externen Applikation von Sphingosin-Analoga, wie DMS, neben der möglichen Inhibierung einer Bildung von LCB-Ps auch eine direkte Wirkung als nicht-phosphorylierte Sphingobase in Betracht gezogen werden muss, besonders wenn der Inhibitor in weitaus höheren Konzentrationen zugegeben wird, als diese in Zellen für LCB-Ps zu erwarten sind. Trotz der kompetitiven Hemmung von LCB-P-Kinasen durch DMS kann doch der direkte Zelltod-fördernde Effekt des Inhibitors nicht ausgeschlossen werden. Solche Untersuchungen zum Zelltod mit gleichzeitiger Bestimmung der Sphingobasen-Spiegel bei exogener Zugabe sind, aufgrund der fehlenden Möglichkeit Behandlungslösung und Zellen zu trennen, in Zellkulturen schlecht durchführbar. Die hier angewandten Zelltodexperimente mit Leitfähigkeitsmessung und einfacher Handhabung des Pflanzenmaterials scheinen dagegen gut geeignet, um direkte Effekte von LCBs und LCB-Ps in Pflanzen zu studieren und Zelltod mit Sphingobasen-Spiegeln *in situ* zu verknüpfen.

## 4.2 Einfluss von Sphingobasen auf Pathogen-induzierten Zelltod in Pflanzen und direkter Effekt auf Bakterien

Sphingolipide als mögliche Regulatoren von programmiertem Zelltod in Pflanzen bei Pathogeninfektion wurden, neben Versuchen mit dem Mykotoxin Fumonisin B<sub>1</sub>, auf verschiedene Weisen untersucht. So sind zum Beispiel *knockdown*- oder *knockout*-Mutanten von Enzymen des Sphingolipid-Metabolismus, wie der Serin-Palmitoyl-Transferase und der Inositolphosphorylceramid-Synthase, mit veränderter Suszeptibilität gegenüber Pathogenen beschrieben (Takahashi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Hinweise auf eine Funktion von Sphingobasen ergeben sich aus Phänotypen von *Arabidopsis*-Mutanten der LCB-P-Lyase DPL1 und der Ceramidase ACER mit erhöhter Suszeptibilität gegenüber dem Bakterium *Pseudomonas syringae* (Magnin-Robert *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Darüber hinaus wurde von Peer *et al.* (2010) im *A. thaliana*-Wildtyp ein Anstieg der nicht-phosphorylierten Sphingobasen nach Infektion mit avirulenten Stämmen von *P. syringae* beobachtet, während virulente Stämme nur einen vorübergehenden, schwachen Anstieg auslösten. Von Magnin-Robert *et al.* (2015) wurde außerdem ein stark hemmender Effekt auf den auftre-

tenden Zelltod, bei der gleichzeitig zur Infektion mit *Pseudomonas* stattfindenden exogenen Behandlung mit LCBs oder LCB-Ps, festgestellt. Da die Versuchsbedingungen dabei mit Koinfiltration von *P. syringae* und d18:0 oder t18:0-P und folgenden Leitfähigkeitsmessungen von Blattscheiben sehr ähnlich waren wie bei den in vorliegender Arbeit zuvor durchgeführten Experimenten, waren diese Befunde von besonderem Interesse. Speziell das publizierte vollständige Ausbleiben von messbarem Zelltod bei der Koinfiltration von Bakterien und LCB stand dabei in Widerspruch zu der hier gezeigten Zelltod-fördernden Wirkung von LCBs, selbst wenn, genau wie bei Magnin-Robert *et al.* (2015) beschrieben, durch Infiltration von Sphingobasen alleine kein Zelltod gemessen werden konnte (Abbildung 4).

Die Experimente zur Beeinflussung des *Pseudomonas*-induzierten Zelltods durch Behandlung mit LCBs oder LCB-Ps wurden hier durch leichte Anpassungen der Versuchsparameter, wie Blattscheibengröße und Infiltrationszeit, vor Beginn der Leitfähigkeitsmessung durchgeführt. Dabei wurde nach Unterscheidung der Zelltodarten, einerseits mit hypersensitiver Antwort nach Infektion mit avirulentem *P. syringae* Stamm (*Pst AvrRpm1*), andererseits mit langsamerem, unspezifischem Zelltod nach Infektion mit virulentem Stamm (*Pst DC3000*), im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen keine Reduktion durch t18:0-P festgestellt (Abbildung 7 A). Bei Koinfiltration mit t18:0 konnte hingegen das komplette Ausbleiben von Zelltod bei den Blattscheiben bestätigt werden. Dieser sehr starke Effekt wurde allerdings auf eine direkte antibakterielle Wirkung der LCB zurückgeführt, da in gemeinsamer Lösung mit *Pseudomonas* eine LCB-konzentrationsabhängige Verringerung der Lebendzellzahl von Bakterien beobachtet werden konnte (Abbildung 7 B). Selbst bei einem zehnfach höheren Verhältnis von Bakterienzellen zur Menge der LCB in der Suspension war dies erkennbar. Eine solche Konzentrationsabhängigkeit könnte auf eine direkte Wirkung der Sphingobasen auf die Bakterien und eine eventuell folgende Inaktivierung hindeuten. Bei einem Test der Bakterien in Flüssigkultur in Anwesenheit von t18:0 zeigte sich eine Verzögerung des Wachstums um bis zu 72 h (Abbildung 7 C). Allerdings konnte bei noch längerer Inkubationsdauer eine leichte Zunahme der optischen Dichte der Kulturen mit t18:0 beobachtet werden, was eine schrittweise Metabolisierung oder einen Abbau der Sphingobasen bedeuten könnte. Dies wurde nicht durch Messung der Spiegel der Sphingobasen in den Suspensionen bestätigt und bietet einen interessanten Ausgangspunkt für künftige Experimente.

Eine antibakterielle Wirkung von Sphingobasen wurde mit medizinisch relevanten Bakterien von Fischer *et al.* (2012) beschrieben. Die meisten der dort getesteten elf gramnegativen und grampositiven Stämme wurden dabei von verschiedenen Sphingobasen (d18:0, d18:1, t18:0) stark beeinflusst. Als Ausnahme kann *Pseudomonas aeruginosa* genannt werden, wofür von Fischer *et al.* (2012) kein antibakterieller Effekt durch die LCBs beobachtet wurde. Für *E. coli* wurde dort, genau wie in dieser Arbeit für *P. syringae* und *E. coli*, hingegen ein starker Effekt festgestellt. Anders als in Eukaryoten sind Sphingolipide in Bakterien äußerst selten und wurden bisher mit einer abweichenden Struktur nur in ei-

ner kleinen Gruppe der Phyla nachgewiesen (Heaver *et al.*, 2018). Dementsprechend ist auch das Vorkommen von Sphingobasen als Metabolite der komplexeren Sphingolipide in Bakterien kaum bekannt. Ob es sich bei dem hier beobachteten antibakteriellen Effekt um eine aktive Interaktion mit Bakterien oder um eine zytotoxische Wirkung der Sphingobasen handelt, wurde dabei nicht bestimmt. Besonders beachtenswert ist jedoch, dass die gleichzeitige Gabe von LCB-P in Kombination mit der LCB den gleichen Effekt aufwies wie die Anwesenheit von t18:0 alleine (Abbildung 7B, C). Die zuvor beschriebene reduzierte Aufnahme von t18:0 in Blattscheiben von *A. thaliana* in Anwesenheit von t18:0-P, durch mögliche Interaktion der beiden Sphingobasen in der Lösung, scheint bei Bakterien deshalb keine Rolle zu spielen. Künftige Untersuchungen mit Bestimmung der Sphingobasen-Spiegel bei Bakterien nach Behandlung mit LCBs im Hinblick auf eine Wirkung und mögliche Metabolisierung der Sphingobasen, zum Beispiel auch durch rekombinante, heterologe Expression von pflanzlichen Enzymen des Sphingobasen-Metabolismus (SPHK1, SPP1, DPL1), könnten Aufschluss über eine Interaktion von Sphingobasen und Bakterien geben.

Für t18:0-P konnte kein antibakterieller Effekt und keine Reduzierung des *Pseudomonas*-induzierten Zelltodes festgestellt werden (Abbildung 7). Die von Magnin-Robert *et al.* (2015) beschriebene Zelltod-inhibierende Wirkung von LCB-P zeigte sich dagegen sowohl bei avirulentem Stamm und virulentem Stamm als auch nach Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Sphingobasen werden speziell mit der Regulation des programmierten Zelltods, wie der hypersensitiven Antwort, in Verbindung gebracht. Um die Diskrepanz der Zelltod-inhibierenden Wirkung von LCB-Ps beim Pathogen-induzierten programmierten Zelltod weiter zu untersuchen, wurde die transgene *A. thaliana*-Linie *Dex:AvrRpm1-HA* verwendet (Geng und Mackey, 2011). Dadurch konnte in Blattscheibenexperimenten der Zelltod, in Form der hypersensitiven Antwort, konzentrationsabhängig, durch Induktion der Expression des Avirulenzproteins mit Dexamethason, ausgelöst werden. Die so erreichte Vereinfachung gegenüber der Infektion mit avirulentem *Pseudomonas*-Stamm (*Pst AvrRpm1*) erlaubte darüber hinaus die simultane Applikation mit den Sphingobasen durch Immersion in der Behandlungslösung. Auf diese Weise konnte, wie aus früheren Experimenten bekannt (Abbildung 4), eine höhere Konzentration der LCBs oder LCB-Ps im Gewebe gewährleistet werden. Bei einer dosierten Induktion mit Dexamethason konnte eine, vergleichbar mit dem durch avirulente *P. syringae* induzierte, Zelltodstärke erreicht werden, die sich aber nicht durch gleichzeitige Zugabe oder Vorbehandlung durch Infiltration von t18:0-P verringern ließ (Abbildung 8). Damit konnten die hier erhaltenen Ergebnisse mit *Pseudomonas* bestätigt werden, wonach die hypersensitive Antwort von *A. thaliana* nicht durch LCB-Ps gehemmt werden kann.

Interessanterweise erzielte auch die gleichzeitige Zugabe von t18:0 und Dexamethason nur eine Wirkung in der Stärke des AvrRpm1-induzierten Zelltodes und konnte nicht, wie zunächst erwartet, durch die LCB verstärkt werden (Abbildung 8B). Dies könnte darauf hindeuten, dass Pathogen-induzierter Zelltod zum Teil durch einen Anstieg der LCBs

vermittelt wird und die hohen Spiegel von t18:0 durch exogene Zugabe in diesem Fall ausreichend sind, um eine maximale Reaktion zu gewährleisten. Dies würde zu den von Peer *et al.* (2010) publizierten Ergebnissen eines Anstiegs der Sphingobasen nach *Pseudomonas*-Infektion passen. Auf der anderen Seite müssten dann durch t18:0-Zugabe genauso hohe Zelltodwerte erreicht werden wie durch die Induktion der AvrRpm1-Expression, was nicht der Fall war. Eine wahrscheinlichere Erklärung für den nicht additiven Effekt der Zelltodwerte nach Behandlung mit t18:0 und Dexamethason ist, dass AvrRpm1 ein stärkerer Auslöser ist und der vergleichsweise geringe Zelltod nach Gabe von t18:0 mit 13 % im Hintergrund nicht zu detektieren war. Für eine genauere Erklärung wäre eine Bestimmung der LCB-Spiegel notwendig. Tatsächlich wurde im Laufe dieser Arbeit eine Messung der Sphingobasen-Spiegel an ganzen Blättern der Linie *Dex:AvrRpm1-HA* nach Besprühen mit Dexamethason (50  $\mu$ M) durchgeführt, die eine Erhöhung der basalen Spiegel um das Vierfache nach vier Stunden zeigte. Eine Messung zu späteren Zeitpunkten war aufgrund der äußerst starken Schädigung der Pflanzen nicht möglich. Dieser vierfache Anstieg entspricht ungefähr der publizierten Erhöhung der LCB-Spiegel nach *Pst AvrRpm1*-Infektion (Magnin-Robert *et al.*, 2015; Peer *et al.*, 2010). Im Vergleich mit Spiegeln von t18:0, nach dessen Zugabe, sind solche geringen Anstiege als äußerst niedrig zu bewerten. In diesen Experimenten war durch die Behandlung eine mindestens fünfzigfache Erhöhung notwendig, um einen messbaren Zelltod von 10 % nach 24 h zu erzielen (Abbildung 5). Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine wichtige Rolle der Sphingobasen als Regulatoren des programmierten Zelltods als zweifelhaft betrachtet werden. Ein geringer Anstieg der LCBs im Laufe einer Pathogeninfektion könnte auch die Folge, und nicht der Auslöser, eines auftretenden Zelltods sein. Ein leichter Anstieg freier Sphingobasen durch Abbau oder Metabolisierung komplexer, membranbildender Sphingolipide im Zuge eines Zelltodes scheint nicht unwahrscheinlich. Auch ließe sich damit eine Korrelation von Sphingobasen-Spiegeln und Zelltodinduktion durch hypersensitive Antwort oder virulente Pathogeninfektion erklären. Trotzdem könnte das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Metabolismuswege, mit leichten Variationen der Verhältnisse der Sphingolipid-Klassen, wichtig für die Regulation des Zelltodes sein. Dafür spricht eine veränderte Suszeptibilität von Mutanten der Enzyme des Sphingolipid-Metabolismus gegenüber verschiedenen Pathogenen (Liang *et al.*, 2003; Magnin-Robert *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015).

Im Laufe dieser Arbeit wurden Mutanten der Enzyme des Sphingobasen-Metabolismus (siehe Abschnitt 2.1.3, Tabelle 3 für eine Übersicht) unter anderem auch auf einen Phänotyp gegenüber Infektion mit *P. syringae* untersucht. In Experimenten zur Bestimmung des Bakterienwachstums in Blättern nach *Pseudomonas*-Infiltration, analog zu den von Magnin-Robert *et al.* (2015) beschriebenen Versuchen mit *dpl1*-Mutanten, konnte allerdings für keine der Linien zuverlässig eine Veränderung zum Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies gilt auch für die Linien *dpl1-1* und *dpl1-2*, bei denen der publizierte veränderte Phänotyp nach *Pseudomonas*-Behandlung nicht reproduziert werden



konnte. Aus den hier gewonnenen Daten war keine antagonistische Funktion von LCB-Ps im Pathogen-induzierten Zelltod ersichtlich.

### 4.3 Zelltodregulation in Mutanten von Enzymen des Metabolismus von LCBs/LCB-Ps

Die vorigen in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zu einem möglichen Antagonismus von nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Sphingobasen beim Zelltod in Pflanzen wurden durch exogene Zugabe von LCB-Ps durchgeführt. Obwohl gezeigt werden konnte, dass t18:0 schnell aufgenommen wurde und für einen Metabolismus durch Enzyme in den Zellen verfügbar war, konnte dies für t18:0-P nur bedingt nachgewiesen werden. Zwar wurden durch Zugabe hohe Konzentrationen im Gewebe erreicht, doch kann eine natürliche Verteilung von LCB-Ps in der Zelle bei exogener Applikation nicht sicher gestellt werden. Diese natürliche intrazelluläre Lokalisation könnte für eine Wirkung der LCB-Ps allerdings kritisch sein. Bei phosphorylierten Sphingobasen handelt es sich um Moleküle mit amphiphilen Eigenschaften, was auch die Möglichkeit der Diffusion über Membranen einschränken könnte. Mit ACD11 (*Accelerated Cell Death 11*) ist ein potentielles Protein für einen intrazellulären Transport der im endoplasmatischen Retikulum gebildeten Sphingobasen oder Ceramid-1-Phosphat beschrieben, das somit auch eine Rolle im Transfer über die Zellmembran spielen könnte (Brodersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2008, 2009; Simanshu *et al.*, 2014). Entsprechende Experimente mit Zugabe von LCB-Ps wurden allerdings bisher nicht durchgeführt. Wie zuvor erwähnt, sind Publikationen mit exogener Behandlung von phosphorylierten Sphingobasen selten.

Um eine Zelltod-inhibierende Wirkung von LCB-Ps zu untersuchen und eventuelle Probleme mit einer Verfügbarkeit bei der Applikation zu umgehen, wurden deshalb Mutanten von Enzymen des LCB/LCB-P-Metabolismus bei verschiedenen Zelltod-auslösenden Bedingungen hinsichtlich der Verhältnisse von LCB-Ps/LCBs charakterisiert. In Mutanten konnten so durch Modifikation der *in-situ*-Spiegel von LCB-Ps Zweifel an der intrazellulären Lokalisation ausgeschlossen werden. Da wie bereits erwähnt, kein Phänotyp der Mutanten nach Infektion mit *P. syringae* beobachtet werden konnte und eine Erhöhung der Sphingobasen-Spiegel dabei zu gering ausfiel, um starke Änderungen des Verhältnisses der Sphingobasen festzustellen, wurden die Mutanten nach exogener Zugabe von Phytosphingosin getestet (Abbildung 9). So konnten in Mutanten mit verbesserter Effektivität der Konvertierung von LCBs zu LCB-Ps (*SPHK1*-OE) oder verringerter Gegenreaktion (*spp1-1*, *spp1-2*) bis zu zehnfach höhere Verhältnisse von t18:0-P/t18:0 erreicht werden als im Wildtyp (Anhang, Tabelle A3). Trotz signifikant veränderter LCB-P/LCB-Verhältnisse in den Genotypen war die Zelltodinduktion nur abhängig vom Spiegel der LCB. Damit konnte ein Effekt erhöhter LCB-P-Spiegel auf den Zelltod ausgeschlossen werden. Der bestimmende Faktor war somit die Menge der nicht-phosphorylierten Sphingobase, bei der keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Der starke Überschuss durch schnelle

Aufnahme und sofort einsetzendem Zelltod erlaubte dabei vermutlich nur die Umsetzung kleiner Mengen der LCB, sodass es in diesem System erschwert wurde, veränderte Phänotypen der verschiedenen Linien zu detektieren. Deshalb wurde bei den Mutanten im weiteren Verlauf die Reaktion gegenüber Fumonisin B<sub>1</sub> charakterisiert.

Als prominentester Vertreter aus der Gruppe der Fumonisine aus Pilzen der Gattung *Fusarium* wurde das Mykotoxin in zahlreichen Publikationen verwendet, um den durch Sphingolipide vermittelten Zelltod in Tieren und Pflanzen zu studieren. Die Wirkung des Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) und des ähnlich wirkenden AAL-Toxins aus dem nekrotrophen Pilz *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* sind dabei gut untersucht (Abbas *et al.*, 1994; Merrill *et al.*, 2001; Stockmann-Juvala und Savolainen, 2008). Durch Hemmung der Ceramid-Synthasen kommt es zu einem Anstieg der Spiegel von freien Sphingobasen durch Neusynthese. Von Spassieva *et al.* (2002) wurde in Pflanzen gezeigt, dass eine gleichzeitige Behandlung mit Myriocin, einem Inhibitor der Serin-Palmitoyl-Transferase, als erstem Enzym der Biosynthese von Sphingobasen, den Zelltodphänotyp durch AAL-Toxin verringert. Ebenso sind *knockout*-Mutanten der Serin-Palmitoyl-Transferase-Untereinheiten von *Arabidopsis* resistenter gegenüber FB<sub>1</sub> (Chen *et al.*, 2006; Kimberlin *et al.*, 2013; Saucedo-García *et al.*, 2011b; Shi *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2008). Dadurch kann darauf geschlossen werden, dass der durch FB<sub>1</sub>-ausgelöste Zelltod, der Anzeichen der hypersensitiven Antwort aufweist, hauptsächlich auf den Anstieg der Sphingobasen zurückzuführen ist. Neben den Untereinheiten der Serin-Palmitoyl-Transferase LCB1 (auch FBR11, Fumonisin B<sub>1</sub> Resistant 11) und LCB2a wurden als weitere Enzyme der Sphingolipid-Biosynthese, deren Mutanten einen veränderten FB<sub>1</sub>-Phänotyp aufweisen, in *A. thaliana* die Ceramid-Synthasen LOH1/2/3 (LAG One Homolog), die Ceramidase ACER (alkalische Ceramidase), die LCB-Kinasen LCBK1, SPHK1 und die LCB-P-Lyase DPL1 (Dihydrosphingosin-1-Phosphat-Lyase 1) beschrieben (Luttgeharm *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2017; Ternes *et al.*, 2011; Tsegaye *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2015; Yanagawa *et al.*, 2017). Die Rolle der phosphorylierten Sphingobasen im Mykotoxin-vermittelten Zelltod erscheint dabei allerdings äußerst unklar wenn man in Betracht zieht, dass von Yanagawa *et al.* (2017) für eine *knockdown*-Linie von *LCBK1* eine erhöhte Sensitivität und für eine Überexpressionslinie eine stärkere Resistenz gegenüber FB<sub>1</sub> berichtet wurde, während Qin *et al.* (2017) den umgekehrten Fall für die Linien *SPHK1*-KD und *SPHK1*-OE beschreibt. Die Spiegel der unter FB<sub>1</sub>-Einfluss gebildeten LCB-Ps wurden, mit Ausnahme von Yanagawa *et al.* (2017), in den genannten Publikationen nicht genau bestimmt, weshalb wenige Informationen zum Verhältnis von LCB-Ps/LCBs vorliegen. In dieser Arbeit wurden Phänotyp und Sphingobasen-Spiegel der Mutanten nach FB<sub>1</sub>-Behandlung auf zweierlei Weise miteinander verknüpft. Zum einen wurde der Effekt des Mykotoxins auf Keimlinge in einem Wachstumstest untersucht, zum anderen die zeitliche Entwicklung des Zelltods von Blattscheiben mit den dabei akkumulierten Sphingobasen bestimmt. Im Gegensatz zu Qin *et al.* (2017) wurde hier in beiden Ansätzen nicht nur die Linie *SPHK1*-OE, sondern ebenso der *knockdown* von *SPHK1* als sensitiver gegenüber FB<sub>1</sub> erkannt. Ein stärkerer Effekt bei

*SPHK1*-KD könnte durch erhöhte Spiegel der LCBs (d18:0, t18:0) gegenüber dem Wildtyp erklärt werden (Abbildungen 10, 11). Da gleichzeitig die Spiegel der LCB-Ps verringert waren, ließ sich für diesen Genotyp allerdings nicht eindeutig entscheiden, welches von beiden die Ursache für den stärkeren Zelltod war. Bei *SPHK1*-OE konnten im Wachstumstest bei Keimlingen deutlich höhere Spiegel von t18:0-P gemessen werden als im Wildtyp, während die Gehalte der LCBs nur leicht erhöht waren. Interessanterweise zeigte diese Linie einen Phänotyp der Keimlinge, welcher sich von allen anderen unterschied. Andere  $FB_1$ -sensitivere Linien zeigten zum Teil chlorotische Phänotypen. Allerdings waren keine Keimlinge so klein wie die von *SPHK1*-OE, was auf einen früheren wachstumshemmenden Effekt zurückzuführen sein könnte. In Doppelmantanten von *SPHK1*-OE  $\times$  *spp1-2* konnte dieser Effekt noch leicht verstärkt werden (Anhang, Abbildung A7). Obwohl hierbei keine Sphingobasen-Spiegel unter  $FB_1$ -Einfluss gemessen wurden, könnte dieser Effekt bei Keimlingen auf besonders hohe Spiegel der LCB-Ps zurückzuführen sein. Die Linie *SPHK1*-OE zeigte in Blattscheibenexperimenten nur einen leicht stärkeren Zelltod als der Wildtyp und nur bei höheren Konzentrationen (50  $\mu$ M) des Mykotoxins. Dieser Zelltod ließ sich dabei bemerkenswerterweise alleine durch höhere LCB-Spiegel erklären, da die Gehalte der LCB-Ps gegenüber dem Wildtyp nicht zu unterscheiden waren (Abbildung 11). Diese Mutante scheint somit besonders empfindlich gegenüber hohen  $FB_1$ -Konzentrationen, was auch mit der starken Überexpression von *SPHK1* (65fach) in Verbindung gebracht werden könnte. Wie bereits erwähnt, wurde auch von Qin *et al.* (2017) eine höhere Sensitivität für *SPHK1*-OE mit mehr Läsionen pro Blattfläche nach Infiltration von  $FB_1$  und einem höheren Zelltod bei Leitfähigkeitsmessung berichtet. Dies deckt sich mit den hier diskutierten Ergebnissen. Im Gegensatz dazu konnte die dortige stärkere Resistenz von *SPHK1*-KD hier nicht beobachtet werden. Auf zwei unterschiedliche Art und Weisen zeigte auch diese Linie in vorliegender Arbeit eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $FB_1$ , was durch die Sphingobasen-Spiegel belegt wurde. Selbst bei niedrigeren Konzentrationen des Mykotoxins konnten deutlich höhere Zelltodwerte bestimmt werden als im Wildtyp (Anhang, Abbildung A9). Eine Diskrepanz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen könnte durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen zu erklären sein.

Die *knockout*-Mutanten der LCB-P-Phosphatase *spp1-1* und *spp1-2* zeigten nach  $FB_1$ -Behandlung keinen von Col-0 zu unterscheidenden Phänotyp (Abbildungen 10, A8), wie es auch schon von Nakagawa *et al.* (2012) beschrieben wurde. Die Messung der Sphingobasen-Spiegel belegte die zu erwartenden erhöhten Gehalte von LCB-Ps nur im Experiment mit Blattscheiben, während eine leichte Reduktion der LCBs gegenüber dem Wildtyp in beiden Experimenten zu beobachten war. Trotz eines etwa fünffach höheren Verhältnisses von LCB-Ps/LCBs konnte keine Reduktion des Zelltods in diesen Linien festgestellt werden, was wiederum gegen einen Zelltod-hemmenden Effekt der phosphorylierten Sphingobasen spricht (siehe Anhang, Tabelle A3). Mit der Mutante *SPP1*-OE konnte als erste Überexpressionslinie der LCB-P-Phosphatase, trotz einer vergleichsweise schwach erhöhten Expression um das Vierfache, eine stärkere Sensitivität gegenüber  $FB_1$  gezeigt werden. Dies

lässt sich analog zu *SPHK1*-KD erklären, da dort ähnliche Spiegel von LCBs und LCB-Ps gemessen wurden. Im Vergleich zum *knockdown* der LCB-Kinase wurden in *SPP1*-OE in beiden  $\text{FB}_1$ -Behandlungsansätzen aber etwas höhere t18:0- und etwas niedrigere d18:0-Spiegel gemessen (Abbildungen 10, A8). Dies könnte ein Hinweis auf eine etwas unterschiedliche Substrataffinität, mit Dihydrosphingosin (Sphingamin, d18:0) für *SPHK1* und Phytosphingosin-1-Phosphat (t18:0-P) als dreifach hydroxylierte Sphingobase für *SPP1*, sein. In beiden Fällen kann eine stärkere Sensitivität gegenüber  $\text{FB}_1$  als der Wildtyp aber mit erhöhten LCB-Spiegeln erklärt werden. In allen Linien wurde durch  $\text{FB}_1$ -Behandlung ein Anstieg der LCB-Spiegel induziert, dessen Stärke vergleichbar mit den Gehalten von t18:0 nach Zugabe der LCB war und so den auftretenden Zelltod-Effekt erklären kann. Obwohl bei den meisten Linien (*Col-0*, *spp1-1*, *spp1-2*) im Experiment mit Blattscheiben (Abbildung 11) geringere Werte für t18:0 als die 200 bis 400 nmol/g aus Experimenten mit direkter Zugabe (Abbildung 5) induziert wurden, kann der Zelltod durch Kombination mit den ebenso erhöhten Siegeln von d18:0 und der längeren Wirkungsdauer von 72 h begründet werden. Der Phänotyp von Blattmaterial, drei Tage nach Zugabe von  $\text{FB}_1$  (Anhang, Abbildung A8 C), lässt sich mit dem Phänotyp nach Behandlung mit t18:0 durch Infiltration (Abbildung 4 C) oder Immersion zum selben Zeitpunkt vergleichen. Die einzigen Fälle, in denen Unterschiede zwischen den Linien nicht alleine auf veränderte Spiegel der LCBs zurückzuführen waren, bildeten im Wachstumstest bei Keimlingen der kleinwüchsige Phänotyp der Linie *SPHK1*-OE, der bereits zuvor diskutiert wurde und der stark chlorotische Phänotyp von *knockout*-Linien der LCB-P-Lyase *DPL1*. Die Regulation des Zelltods in Mutanten, die eine Funktionalität dieses Enzyms betreffen, wird im folgenden Abschnitt separat diskutiert.

#### 4.4 Zelltodregulation in Mutanten der LCB-P-Lyase *DPL1* nach Behandlung mit $\text{FB}_1$

Der starke Phänotyp von Keimlingen der *knockout*-Mutanten der LCB-P-Lyase *DPL1* nach Wachstum auf Medium mit  $\text{FB}_1$  wurde von Tsegaye *et al.* (2007) beschrieben. Obwohl dort eine Akkumulation von LCBs und LCB-Ps in Gegenwart von  $\text{FB}_1$  erwähnt und die basalen Sphingobasen-Spiegel dargestellt wurden, fand keine Bestimmung der Gehalte nach Behandlung mit dem Mykotoxin statt. Die Korrelation des auftretenden Zelltods mit den Spiegeln der LCBs und besonders LCB-Ps in diesem Genotyp war daher von besonderem Interesse für die Bewertung der Hypothese eines antagonistischen Effekts. Von Yanagawa *et al.* (2017), die ebenfalls die Mutante *dpl1-1* mit  $\text{FB}_1$  untersuchten, konnte festgestellt werden, dass erhöhter Zelltod dort nicht alleine durch eine Veränderung des Verhältnisses der phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Sphingobasen erklärt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein starker Phänotyp mit chlorotischen Keimlingen der beiden *knockout*-Linien *dpl1-1* und *dpl1-2* im Wachstumstest auf  $\text{FB}_1$ -Medium mit den,

im Vergleich zu den anderen Linien, höchsten Spiegeln der LCB-Ps verknüpft (Abbildung 10). Zur genaueren Analyse dieses Effekts wurden die Linien in Blattscheibenexperimenten unabhängig von den anderen Mutanten detailliert auf den auftretenden Zelltod untersucht, da die erhöhte Sensitivität durch eine gut messbare Reaktion die Anwendung geringerer FB<sub>1</sub>-Konzentrationen (10 µM) ermöglichte. Auch in diesem Test ging erhöhter Zelltod mit besonders stark erhöhten Spiegeln der phosphorylierten Sphingobasen einher. Während in diesem Experiment zwar auch gegenüber dem Wildtyp erhöhte LCB-Spiegel detektiert wurden, die zu allen Zeitpunkten den stärkeren Zelltod erklären könnten, scheinen die vergleichsweise moderaten Veränderungen von d18:0 und t18:0 mit maximal 130 nmol/g (Abbildung 12) im Vergleich zu den deutlich höheren Gehalten in anderen Mutanten (vergleiche erhöhte LCB-Spiegel in Abbildung 11) aber nicht ausreichend, um die besondere FB<sub>1</sub>-Sensitivität zu erklären. Es lässt vermuten, dass eine besonders starke Akkumulation der LCB-Ps (200–1300 nmol/g), wie in den Mutanten von *DPL1*, eine Zelltod-fördernde Wirkung besitzt. Dies wird auch durch die Ergebnisse des Wachstumsexperiments gestützt, da dort der starke Phänotyp nicht mit den kaum gegenüber dem Wildtyp erhöhten LCB-Spiegeln, sondern mit besonders hohen LCB-P-Spiegeln korrelierte. Ein Einfluss von anderen Sphingobasen oder Ceramiden in *dpl1-1* und *dpl1-2* kann nicht ausgeschlossen werden, allerdings waren die dabei auftretenden Gehalte im Vergleich zu d18:0/d18:0-P und t18:0/t18:0-P äußerst gering. Genau wie die von Magnin-Robert *et al.* (2015), Tsegaye *et al.* (2007) und Yanagawa *et al.* (2017) gemessenen höheren basalen Spiegel von t18:1-P in *dpl1*, konnten hier höhere Gehalte dieser phosphorylierten Sphingobase nach FB<sub>1</sub>-Behandlung bestimmt werden, die im Vergleich zu den abundanten Sphingobasen aber keine große Rolle in einer Bewertung des Zelltods spielen dürften. Interessanterweise korrelierte stärkerer Zelltod auch mit einem Anstieg der Ceramide mit kurzen Kettenlängen der Fettsäure wie t18:0-c16:0 und t18:1-c16:0 in *dpl1-1* (Anhang, Abbildungen A7, A10). Dies kann mit Ergebnissen von Luttgarm *et al.* (2015) und Markham *et al.* (2011) erklärt werden, wonach FB<sub>1</sub> besonders als Inhibitor auf die Ceramid-Synthasen LOH1 und LOH3 wirkt, während LOH2 weniger stark gehemmt wird und die Verknüpfung von LCBs und kurzkettigen Fettsäuren (C16) katalysiert. Dadurch und durch die hohe Verfügbarkeit der LCBs akkumulieren diese Ceramide unter Einfluss des Mykotoxins. Diese Veränderungen in *dpl1-1* und *dpl1-2* dürften insbesondere die Folge der durch Ausschalten des Abbauwegs über die Lyase vorkommenden Akkumulation der LCB-Ps und des daraufhin entstehenden Rückstaus der LCBs sein. Ob die besonders hohen Spiegel der LCB-Ps in *dpl1* unter Einfluss von FB<sub>1</sub> nun einen direkten Zelltod-fördernden Effekt besitzen oder die generelle Veränderung des LCB/LCB-P-Metabolismus mit veränderten Gehalten von nicht gemessenen Substanzen zum Zelltod beiträgt, konnte nicht bestimmt werden. In jedem Fall waren hohe *in-vivo*-Spiegel von phosphorylierten Sphingobasen jedoch nicht in der Lage Zelltod zu hemmen beziehungsweise zu reduzieren. Dies kann auch mit den gegenüber Col-0 teilweise zehnfach erhöhten Verhältnissen von LCB-Ps/LCBs zusammengefasst werden (Anhang, Tabelle A3).

Zur Förderung eines Abbaus von LCBs und LCB-Ps nach deren Akkumulation, wie sie in Gegenwart von Fumonisin B<sub>1</sub> auftritt, wurde eine Überexpressionslinie von *DPL1* erstellt. Dabei wurde ein induzierbares Expressionssystem anstelle einer konstitutiven Überexpression gewählt, da dies für eine zeitlich steuerbare Reaktion zur Abfuhr von LCBs und LCB-Ps, eventuell mit Vorbehandlung einer Zelltod auslösenden Substanz (zum Beispiel LCBs oder FB<sub>1</sub>), in Blattscheibenexperimenten als Vorteil gesehen wurde. Obwohl dieser funktionelle Ansatz mit der Linie bisher nicht getestet wurde, konnte in ersten Experimenten eine erhöhte Resistenz gegenüber FB<sub>1</sub> bei Überexpression von *DPL1* gezeigt werden. Die erstellte Linie *XVE-HA-DPL1* wies bei Induktion der Genexpression mit  $\beta$ -Estradiol sowohl in einem Wachstumstest als auch bei Bestimmung des Zelltods durch Leitfähigkeitsmessung in Blattscheibenexperimenten eine Reduktion des FB<sub>1</sub>-Effekts auf (Abbildungen 13, 14). Diese erhöhte Resistenz kann, wie bei einem verstärkten Vorkommen der LCB-P-Lyase erwartet, durch eine niedrigere Akkumulation der LCBs (d18:0 und t18:0) um 30–40 % und LCB-Ps (d18:0-P und t18:0-P) um 50–60 % erklärt werden. Die Induktion der Überexpression von *DPL1* führte damit zu allen Zeitpunkten bei gleichzeitiger FB<sub>1</sub>-Behandlung zu einem niedrigeren Verhältnis von LCB-Ps/LCBs. Der geringere Zelltod lässt sich dabei hingegen alleine durch den niedrigeren Anstieg der LCBs erklären. Bei der hier erstellten Linie *XVE-HA-DPL1* handelt es sich um die erste Mutante mit beschriebener Überexpression von *DPL1*. Es wäre interessant den Effekt einer verstärkten Expression der Lyase auf Pflanzen bei anderen Zelltod-auslösenden Bedingungen zu studieren, besonders da von Magnin-Robert *et al.* (2015) für die *knockout*-Mutanten *dpl1* eine höhere Suszeptibilität gegenüber *P. syringae* und stärkere Toleranz gegenüber *B. cinerea* beschrieben wurde. Obwohl, wie erwähnt, diese Ergebnisse für *P. syringae* in *dpl1-1* und *dpl1-2* im Zuge dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnten, ermöglicht diese Linie die Rolle von Sphingobasen in der Zelltodreaktion weiter zu analysieren. Zwar könnte der Einsatz des induzierbaren Systems bei biotischem Stress als Auslöser von Zelltodreaktionen aufgrund einer direkten Wirkung von  $\beta$ -Estradiol auf Pathogene dabei zu Problemen führen, was in separaten Tests ausgeschlossen werden müsste, doch kann diese Linie wichtige Einblicke in die Regulation von Sphingobasen bei Zelltodreaktionen liefern.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde durch Veränderung der Sphingobasen-Spiegel in *A. thaliana*, durch exogene Zugabe von t18:0/t18:0-P oder FB<sub>1</sub>, eine direkte Wirkung von LCBs und LCB-Ps auf den Zelltod untersucht. Dabei wurde, im Vergleich zu bisherigen publizierten Arbeiten, die detaillierteste Bestimmung der Spiegel von Sphingobasen bei der Entwicklung des Zelltods durch verschiedene Auslöser, wie LCB-Zugabe, Bakterieninfektion und FB<sub>1</sub>-Behandlung vorgenommen. Durch Bewertung der vorherrschenden Hypothese eines antagonistischen Effekts von LCB-Ps beim Zelltod in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass hohe Spiegel von LCB-Ps alleine nicht ausreichend sind, um Zelltod zu inhibieren oder

zu reduzieren und dass einige bisherige Belege aus anderen Arbeiten für diesen Effekt auf experimentelle Umstände zurückzuführen sind. Trotz der in dieser Arbeit gezeigten Belege, die gegen eine antagonistische Wirkung von phosphorylierten Sphingobasen sprechen, ist es möglich, dass bestimmte LCB-Ps oder Sphingolipid-Spezies unter speziellen Bedingungen einen negativen Einfluss auf den Zelltod in Pflanzen ausüben. Zwar wurde hier ausführlich durch Korrelation von Zelltodwerten und Sphingobasen-Spiegeln der in manchen Publikationen (Magnin-Robert *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2007) beschriebene direkte Zelltod-hemmende Effekt auf andere Weise erklärt, doch gibt es noch weitere publizierte Ansätze, bei denen eine reduzierte Zelltodwirkung durch vermeintlich höhere LCB-P-Spiegel begründet wurde. Von Alden *et al.* (2011) wurde beispielsweise gezeigt, dass in *Arabidopsis*-Zellkulturen durch Vorbehandlung mit d18:1-P der Hitze-induzierte Zelltod oder der nach unzureichender Verdünnung der Kultur auftretende Zelltod abgemildert werden kann. Magnin-Robert *et al.* (2015) berichteten, dass t18:0-P den durch *B. cinerea* ausgelösten Zelltod reduzieren kann und von Dutilleul *et al.* (2012) wurde eine erhöhte Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinase MPK6 nach t18:0-P-Behandlung festgestellt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, bietet aber durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung der Spiegel von Sphingobasen in den beschriebenen Experimenten mit Blattscheiben einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Studien. Neben der Frage, ob LCB-Ps einen Zelltod-inhibierenden Effekt aufweisen, war auch die direkte Wirkung der LCBs in Pflanzen von besonderem Interesse. Obwohl LCBs als Regulatoren des pflanzlichen programmierten Zelltods weitgehend studiert und diskutiert wurden, sind die genauen Funktionen als mögliche Signalmoleküle unklar. Zwar wurde die Signalleitung neben MPK6 und CPK3 (Dutilleul *et al.*, 2012; Lachaud *et al.*, 2013; Saucedo-García *et al.*, 2011b) mit Calcium als *second messenger* (Lachaud *et al.*, 2010, 2013; Townley *et al.*, 2005) und teilweise über die Wirkung von FB<sub>1</sub> mit Phytohormonen wie Jasmonaten, Salicylsäure und Ethylen in Verbindung gebracht (Asai *et al.*, 2000; Magnin-Robert *et al.*, 2015; Saucedo-García *et al.*, 2011b), doch sind die genaueren Zusammenhänge rätselhaft. Auch ist bekannt, dass der LCB/Ceramid-induzierte Zelltod mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht (Magnin-Robert *et al.*, 2015; Peer *et al.*, 2011; Saucedo-García *et al.*, 2011a; Shi *et al.*, 2007), allerdings ist deren Notwendigkeit für den ausgelösten Zelltod zweifelhaft (Lachaud *et al.*, 2011; Peer *et al.*, 2011; Townley *et al.*, 2005).

In Experimenten mit Fumonisin B<sub>1</sub> wurden darüber hinaus in *A. thaliana* die *knockout*-Quadrupelmutante der Cystein-Proteasen  $\alpha\beta\gamma\delta vpe$  (*vacuolar processing enzyme*) und eine Überexpressionsmutante des Serin-Protease-Inhibitors KTI1 (Kunitz-Trypsin-Inhibitor) als resistent gegenüber dem Mykotoxin beschrieben (Kuroyanagi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Dies lässt eine Funktion der beiden Enzyme in der Vermittlung des LCB-induzierten Zelltods vermuten. Im Zuge dieser Arbeit wurde deshalb auch die von Kuroyanagi *et al.* (2005) bereitgestellte Mutante  $\alpha\beta\gamma\delta vpe$  und eine T-DNA-Insertionsmutante von *KTI1* (SALK\_067224) in ersten Experimenten mit Blattscheiben auf Zelltodinduktion nach

t18:0-Behandlung getestet, wobei allerdings keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Trotzdem könnten genauere Untersuchungen dieser Linien oder Mutanten der Enzyme MPK6 oder CPK3, mit Bestimmung der Sphingobasen-Spiegel nach FB<sub>1</sub>-Behandlung, Aufschluss über einen Zusammenhang mit dem LCB-induzierten Zelltod geben.

Hingegen zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass zum Teil hohe Spiegel von LCBs für eine messbare Induktion des Zelltods benötigt wurden. Es kann angezweifelt werden, dass LCBs eine weit oben einnehmende Position in der Signalleitung einer Vermittlung des programmierten Zelltods besitzen. Wahrscheinlicher ist ein direkter zytotoxischer Effekt, was auch durch die gezeigte antibakterielle Wirkung der LCBs gestützt wird. Ob solch hohe Spiegel von LCBs, wie sie für eine Induktion des Zelltods in dieser Arbeit notwendig waren, unter anderen Bedingungen als mit den im Sphingobasen-Metabolismus interferierenden Mykotoxinen (FB<sub>1</sub>, AAL-Toxin) erreicht werden, ist unklar. Allerdings ist es denkbar, dass im Gewebe lokal induzierte, stärkere Veränderungen von Sphingobasen-Spiegeln in direkter Nähe zu biotischem Stress ausgesetzten Zellen (zum Beispiel am Infektionsort von Phytopathogenen) einen Einfluss auf die Immunantwort und den programmierten Zelltod haben. Tatsächlich deutet der in mehreren Publikationen beschriebene spontan auftretende Zelltod in verschiedenen Mutanten von Enzymen des Sphingolipid- oder Sphingobasen-Metabolismus auf lokal zu differenzierende Spiegel von Sphingobasen hin (Brodersen *et al.*, 2002; Bruggeman *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2003; Ternes *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008). Dies könnte auch bei veränderter Expression von Genen des Sphingolipid-Metabolismus im Umfeld von Infektionsorten von Pathogenen der Fall sein. Solch eine lokale Veränderung der Gehalte von LCBs und LCB-Ps ist experimentell äußerst schwierig aufzulösen und wurde hier nicht untersucht. Einen möglichen Ansatzpunkt hierfür bietet die bildgebende Massenspektrometrie in Form von MALDI-MS-*imaging* (*matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry*; Boughton *et al.*, 2016). In jedem Fall scheint eine Beeinflussung von wichtigen Enzymen des Sphingolipid- oder Sphingobasen-Metabolismus durch abiotische und biotische Stressbedingungen in der Lage, eine solche Akkumulation von LCBs oder LCB-Ps zu induzieren. Auch wenn hohe Spiegel von LCB-Ps in Pflanzen *per se* keine Zelltod-inhibierende Wirkung aufweisen, kann die gestörte Homöostase durch veränderte Phosphorylierung mittels LCB-Kinasen und Abbau durch die LCB-P-Lyase in solchen Situationen einen starken Einfluss auf den auftretenden Zelltod haben. Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, sollte in keinem Fall die Wichtigkeit und Notwendigkeit der Bestimmung von tatsächlich vorherrschenden Sphingobasen-Spiegeln bei der Beurteilung des LCB-vermittelten Zelltods vernachlässigt werden.



## Literaturverzeichnis

- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H. Jr. und Riley, R. T. (1994). Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.*, 106(3):1085–1093.
- Alden, K. P., Dhondt-Cordelier, S., McDonald, K. L., Reape, T. J., Ng, C. K. Y., McCabe, P. F. und Leaver, C. J. (2011). Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410(3):574–580.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C. und De Laurenzi, V. (2015). Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis.*, 6:e1609.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633):653–657.
- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.*, 9:367–393.
- Aoyama, T. und Chua, N. H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.*, 11(3):605–612.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796–815.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. und Ausubel, F. M. (2000). Fumonisin B1-Induced Cell Death in Arabidopsis Protoplasts Requires Jasmonate-, Ethylene-, and Salicylate-Dependent Signaling Pathways. *Plant Cell*, 12(10):1823–1835.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.*, 6(10):973–979.
- Baker, D. L., Desiderio, D. M., Miller, D. D., Tolley, B. und Tigyi, G. J. (2001). Direct Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid Molecular Species by Stable Isotope Dilution Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, 292:287–295.

- Baxter, A., Mittler, R. und Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.*, 65(5):1229–1240.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D. A., Mackey, D. und Dangl, J. L. (2004). Arabidopsis RIN4 Negatively Regulates Disease Resistance Mediated by RPS2 and RPM1 Downstream or Independent of the NDR1 Signal Modulator and Is Not Required for the Virulence Functions of Bacterial Type III Effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, 16(10):2822–2835.
- Berkey, R., Bendigeri, D. und Xiao, S. (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front. Plant Sci.*, 3:68.
- Bi, F. C., Liu, Z., Wu, J. X., Liang, H., Xi, X. L., Fang, C., Sun, T. J., Yin, J., Dai, G. Y., Rong, C., Greenberg, J. T., Su, W. W. und Yao, N. (2014). Loss of Ceramide Kinase in *Arabidopsis* Impairs Defenses and Promotes Ceramide Accumulation and Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bursts. *Plant Cell*, 26(8):3449–3467.
- Bigeard, J., Colcombet, J. und Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant*, 8(4):521–539.
- Boller, T. und Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60:379–406.
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. und Dupree, P. (2005). Analysis of Detergent-Resistant Membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts. *Plant Physiol.*, 137(1):104–116.
- Boughton, B. A., Thinagaran, D., Sarabia, D., Bacic, A. und Roessner, U. (2016). Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem. Rev.*, 15:445–488.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S. und Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9(11):883–897.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Ødum, N., Jørgensen, L. B., Brown, R. E. und Mundy, J. (2002). Knockout of *Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.*, 16:490–502.
- Bruggeman, Q., Raynaud, C., Benhamed, M. und Delarue, M. (2015). To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front. Plant Sci.*, 6:24.

- Buré, C., Cacas, J. L., Wang, F., Gaudin, K., Domergue, F., Mongrand, S. und Schmitter, J. M. (2011). Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25(20):3131–3145.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol. Rev.*, 40(6):894–937.
- Cacas, J. L., Buré, C., Furt, F., Maalouf, J. P., Badoc, A., Cluzet, S., Schmitter, J. M., Antajan, E. und Mongrand, S. (2013). Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry*, 96:191–200.
- Cacas, J. L., Buré, C., Grosjean, K., Gerbeau-Pissot, P., Lherminier, J., Rombouts, Y., Maes, E., Bossard, C., Gronnier, J., Furt, F., Fouillen, L., Germain, V., Bayer, E., Cluzet, S., Robert, F., Schmitter, J. M., Deleu, M., Lins, L., Simon-Plas, F. und Mongrand, S. (2016). Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant Physiol.*, 170(1):367–384.
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M. und Cahoon, E. B. (2006). The Essential Nature of Sphingolipids in Plants as Revealed by the Functional Identification and Characterization of the *Arabidopsis* LCB1 Subunit of Serine Palmitoyltransferase. *Plant Cell*, 18(12):3576–3593.
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G. und Cahoon, E. B. (2008). Sphingolipid Long-Chain Base Hydroxylation Is Important for Growth and Regulation of Sphingolipid Content and Composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(7):1862–1878.
- Chung, E. H., da Cunha, L., Wu, A. J., Gao, Z., Cherkis, K., Afzal, A. J., Mackey, D. und Dangl, J. L. (2011). Specific Threonine Phosphorylation of a Host Target by Two Unrelated Type III Effectors Activates a Host Innate Immune Receptor in Plants. *Cell Host Microbe*, 9(2):125–136.
- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16:735–743.
- Coll, N. S., Epple, P. und Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.*, 18:1247–1256.
- Coursol, S., Fan, L. M., Le Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S. und Assmann, S. M. (2003). Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 423:651–654.
- Coursol, S., Fromentin, J., Noirot, E., Brière, C., Robert, F., Morel, J., Liang, Y. K., Lherminier, J., Simon-Plas, F. (2015). Long-chain bases and their phosphorylated derivatives differentially regulate cryptogein-induced production of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *New Phytol.*, 205(3):1239–1249.

- Coursol, S., Le Stunff, H., Lynch, D. V., Gilroy, S., Assmann, S. M. und Spiegel, S. (2005). Arabidopsis Sphingosine Kinase and the Effects of Phytosphingosine-1-Phosphate on Stomatal Aperture. *Plant Physiol.*, 137(2):724–737.
- Curtis, M. D. und Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol.*, 133(2):462–469.
- Da Silva, D., Lachaud, C., Cotellet, V., Brière, C., Grat, S., Mazars, C., Thuleau, P. (2011). Nitric oxide production is not required for dihydrosphingosine-induced cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Signal. Behav.*, 6(5):736–739.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. und Dangl, J. L. (1991). Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J.*, 1(3):289–302.
- Dickson, R. C. (1998). Sphingolipid Functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison to Mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:27–48.
- Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M. und Cahoon, E. B. (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.*, 54(2):284–298.
- Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V. und Napier, J. A. (2004). A Post-genomic Approach to Understanding Sphingolipid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.*, 93(5):483–497.
- Dutilleul, C., Benhassaine-Kesri, G., Demandre, C., Rézé, N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, J. P., Zachowski, A., Baudouin, E. und Guillas, I. (2012). Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytol.*, 194:181–191.
- Dutilleul, C., Chavarria, H., Rézé, N., Sotta, B., Baudouin, E. und Guillas, I. (2015). Evidence for ACD5 ceramide kinase activity involvement in *Arabidopsis* response to cold stress. *Plant Cell Environ.*, 38(12):2688–2697.
- Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B. und Spiegel, S. (1998). *N,N*-Dimethylsphingosine Is a Potent Competitive Inhibitor of Sphingosine Kinase but Not of Protein Kinase C: Modulation of Cellular Levels of Sphingosine 1-Phosphate and Ceramide. *Biochemistry*, 37(37):12892–12898.
- Fischer, C. L., Drake, D. R., Dawson, D. V., Blanchette, D. R., Brogden, K. A. und Wertz, P. W. (2012). Antibacterial Activity of Sphingoid Bases and Fatty Acids against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(3):1157–1161.

- Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:299–325.
- Futerman, A. H. und Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.*, 5(8):777–782.
- Galluzzi, L., Vitale, I. *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, 25:486–541.
- Gao, Z., Chung, E. H., Eitas, T. K. und Dangl, J. L. (2011). Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* *pv. maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(18):7619–7624.
- Geng, X. und Mackey, D. (2011). Dose-Response to and Systemic Movement of Dexamethasone in the GVG-Inducible Transgene System in Arabidopsis. In: McDowell, J. M. (Hrsg.). *Plant Immunity, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 59–68. *Humana Press*, New York City, NY, USA.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43:205–227.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W. und Dangl, J. L. (1995). Structure of the *Arabidopsis* *RPM1* Gene Enabling Dual Specificity Disease Resistance. *Science*, 269(5225):843–846.
- Green, M. R. und Sambrook, J. (2012). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: “Ultra-competent” Cells. In: Green, M. R. und Sambrook, J. (Hrsg.). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Fourth Edition*. 168–172. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Gunawardena, A. H. L. A. N. (2008). Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *J. Exp. Bot.*, 59(3):445–451.
- Guo, L., Mishra, G., Taylor, K. und Wang, X. (2011). Phosphatidic Acid Binds and Stimulates *Arabidopsis* Sphingosine Kinases. *J. Biol. Chem.*, 286(15):13336–13345.
- Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. und Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758(12):2016–2026.
- Hamann, T. (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front. Plant Sci.*, 3:77.
- Hannun, Y. A. und Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 19:175–191.

- Hara-Nishimura, I. und Hatsugai, N. (2011). The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ.*, 18:1298–1304.
- Haynes, C. A., Allegood, J. C., Park, H. und Sullards, M. C. (2009). Sphingolipidomics: Methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J. Chromatogr. B*, 877:2696–2708.
- Heaver, S. L., Johnson, E. L. und Ley, R. E. (2018). Sphingolipids in host–microbial interactions. *Curr. Opin. Microbiol.*, 43:92–99.
- Huang, X., Zhang, Y., Zhang, X. und Shi, Y. (2017). Long-chain base kinase1 affects freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 259:94–103.
- Igarashi, D., Bethke, G., Xu, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J. und Katagiri, F. (2013). Pattern-Triggered Immunity Suppresses Programmed Cell Death Triggered by Fumonisin B1. *PLoS One*, 8(4):e60769.
- Imai, H. und Nishiura, H. (2005). Phosphorylation of Sphingoid Long-chain Bases in *Arabidopsis*: Functional Characterization and Expression of the First Sphingoid Long-chain Base Kinase Gene in Plants. *Plant Cell Physiol.*, 46(2):375–380.
- Islam, M. N., Jacquemot, M. P., Coursol, S. und Ng, C. K. Y. (2012). Sphingosine in plants – more riddles from the Sphinx? *New Phytol.*, 193(1):51–57.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N. und Hedrich, R. (2003). Isolation of *AtSUC2* promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J.*, 36(6):931–945.
- Jones, J. D. G. und Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323–329.
- Kim, M. G., Geng, X., Lee, S. Y. und Mackey, D. (2009). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the Arabidopsis nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *Plant J.*, 57(4):645–653.
- Kimberlin, A. N., Han, G., Luttgeharm, K. D., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Markham, J. E., Dunn, T. M. und Cahoon, E. B. (2016). *ORM* Expression Alters Sphingolipid Homeostasis and Differentially Affects Ceramide Synthase Activity. *Plant Physiol.*, 172(2):889–900.
- Kimberlin, A. N., Majumder, S., Han, G., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Dunn, T. M. und Cahoon, E. B. (2013). *Arabidopsis* 56-Amino Acid Serine Palmitoyltransferase-Interacting Proteins Stimulate Sphingolipid Synthesis, Are Essential, and Affect Mycotoxin Sensitivity. *Plant Cell*, 25(11):4627–4639.
- Király, Z., Barna, B. und Érsek, T. (1972). Hypersensitivity as a Consequence, Not the Cause, of Plant Resistance to Infection. *Nature*, 239:456–458.

- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P. und Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.*, 40:D1211–D1215.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. und Spiegel, S. (1998). Molecular Cloning and Functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase. *J. Biol. Chem.*, 273(37):23722–23728.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hroudá, M., Bachmair, A. und Schell, J. (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: Gelvin, S. B. und Schilperoort, R. A. (Hrsg.). *Plant Molecular Biology Manual*. 53–74. Springer, Dordrecht, Niederlande.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I. (2005). Vacuolar Processing Enzyme Is Essential for Mycotoxin-induced Cell Death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 280(38):32914–32920.
- Lachaud, C., Da Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Brière, C., Cotelle, V., Graziana, A., Grat, S., Mazars, C. und Thuleau, P. (2011). Dihydro-sphingosine-Induced Programmed Cell Death in Tobacco BY-2 Cells Is Independent of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production. *Mol. Plant*, 4(2):310–318.
- Lachaud, C., Da Silva, D., Cotelle, V., Thuleau, P., Xiong, T. C., Jauneau, A., Brière, C., Graziana, A., Bellec, Y., Faure, J. D., Ranjeva, R. und Mazars, C. (2010). Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium*, 47(1):92–100.
- Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Brière, C., Mazars, C. und Cotelle, V. (2013). 14-3-3-Regulated Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death Differ.*, 20:209–217.
- Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of  $\lambda$  Site-specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:913–949.
- Li, J., Bi, F. C., Yin, J., Wu, J. X., Rong, C., Wu, J. L. und Yao, N. (2015). An *Arabidopsis* neutral ceramidase mutant *ncer1* accumulates hydroxyceramides and is sensitive to oxidative stress. *Front. Plant Sci.*, 6:460.
- Li, J., Brader, G. und Palva, E. T. (2008). Kunitz Trypsin Inhibitor: An Antagonist of Cell Death Triggered by Phytopathogens and Fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, 1(3):482–495.
- Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H. und Greenberg, J. T. (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.*, 17:2636–2641.

- Lukasik, E. und Takken, F. L. W. (2009). STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12(4):427–436.
- Luttgeharm, K. D., Chen, M., Mehra, A., Cahoon, R. E., Markham, J. E. und Cahoon, E. B. (2015). Overexpression of Arabidopsis Ceramide Synthases Differentially Affects Growth, Sphingolipid Metabolism, Programmed Cell Death, and Mycotoxin Resistance. *Plant Physiol.*, 169(2):1108–1117.
- Lynch, D. V. und Dunn, T. M. (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.*, 161(3):677–702.
- Mackey, D., Holt, B. F. III, Wiig, A. und Dangl, J. L. (2002). RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108(6):743–754.
- Magne, M. (2006). GENTle, a free multi-purpose molecular biology tool. Dissertation, *Universität zu Köln*.
- Magnin-Robert, M., Le Bourse, D., Markham, J., Dorey, S., Clément, C., Baillieux, F. und Dhondt-Cordelier, S. (2015). Modifications of Sphingolipid Content Affect Tolerance to Hemibiotrophic and Necrotrophic Pathogens by Modulating Plant Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 169(3):2255–2274.
- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. und Jaworski, J. G. (2006). Separation and Identification of Major Plant Sphingolipid Classes from Leaves. *J. Biol. Chem.*, 281(32):22684–22694.
- Markham, J. E., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hématy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, J. C., Satiat-JeuneMaitre, B. und Faure, J. D. (2011). Sphingolipids Containing Very-Long-Chain Fatty Acids Define a Secretory Pathway for Specific Polar Plasma Membrane Protein Targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23(6):2362–2378.
- Markham, J. E. und Jaworski, J. G. (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21:1304–1314.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M. A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J. Z., Law, M., Meinke, D. und Patton, D. (2001). Insertional Mutagenesis of Genes Required for Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159(4):1751–1763.



- Melser, S., Batailler, B., Peypelut, M., Poujol, C., Bellec, Y., Wattelet-Boyer, V., Maneta-Peyret, L., Faure, J. D. und Moreau, P. (2010). Glucosylceramide Biosynthesis is Involved in Golgi Morphology and Protein Secretion in Plant Cells. *Traffic*, 11(4):479–490.
- Merrill, A. H. Jr. (2011). Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chem Rev.*, 111(10):6387–6422.
- Merrill, A. H. Jr., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A. und Riley, R. T. (2001). Sphingolipid Metabolism: Roles in Signal Transduction and Disruption by Fumonisin. *Environ. Health Perspect.*, 109(2):283–289.
- Michaelson, L. V., Napier, J. A., Molino, D. und Faure, J. D. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1861(9):1329–1335.
- Michaelson, L. V., Zäuner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., Heinz, E. und Napier, J. A. (2009). Functional Characterization of a Higher Plant Sphingolipid  $\Delta^4$ -Desaturase: Defining the Role of Sphingosine and Sphingosine-1-Phosphate in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 149(1):487–498.
- Mina, J. G., Okada, Y., Wansadhipathi-Kannangara, N. K., Pratt, S., Shams-Eldin, H., Schwarz, R. T., Steel, P. G., Fawcett, T. und Denny, P. W. (2010). Functional analyses of differentially expressed isoforms of the Arabidopsis inositol phosphorylceramide synthase. *Plant Mol. Biol.*, 73(4–5):399–407.
- Mishina, T. E. und Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J.*, 50(3):500–513.
- Mortimer, J. C., Yu, X., Albrecht, S., Sicilia, F., Huichalaf, M., Ampuero, D., Michaelson, L. V., Murphy, A. M., Matsunaga, T., Kurz, S., Stephens, E., Baldwin, T. C., Ishii, T., Napier, J. A., Weber, A. P. M., Handford, M. G. und Dupree, P. (2013). Abnormal Glycosphingolipid Mannosylation Triggers Salicylic Acid-Mediated Responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(5):1881–1894.
- Msanne, J., Chen, M., Luttgeharm, K. D., Bradley, A. M., Mays, E. S., Paper, J. M., Boyle, D. L., Cahoon, R. E., Schrick, K. und Cahoon, E. B. (2015). Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in Arabidopsis. *Plant J.*, 84(1):188–201.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. und Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.*, 59(3):501–520.

- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 36:489–517.
- Nakagawa, N., Kato, M., Takahashi, Y., Shimazaki, K., Tamura, K., Tokuji, Y., Kihara und Imai, H. (2012). Degradation of long-chain base 1-phosphate (LCBP) in Arabidopsis: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. *J. Plant Res.*, 125(3):439–449.
- Ng, C. K. Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B. und Hetherington, A. M. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410:596–599.
- Nishikawa, M., Hosokawa, K., Ishiguro, M., Minamioka, H., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Takahashi, Y., Shimazaki, K. und Imai, H. (2008). Degradation of Sphingoid Long-Chain Base 1-Phosphates (LCB-1Ps): Functional Characterization and Expression of *AtDPL1* Encoding LCB-1P Lyase Involved in the Dehydration Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 49(11):1758–1763.
- Niu, Y., Chen, K., Wang, J., Liu, X., Qin, H., Zhang, A. und Wang, D. (2007). Molecular and Functional Characterization of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Homolog from Higher Plants. *J. Integrat. Plant Biol.*, 49(3):323–335.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M. und Kuchitsu, K. (2008). Synergistic Activation of the *Arabidopsis* NADPH Oxidase AtrbohD by  $\text{Ca}^{2+}$  and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 283(14):8885–8892.
- Oliver, R. P. und Ipcho, S. V. S. (2004). *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.*, 5(4):347–352.
- Osbourn, A. E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell*, 8(10):1821–1831.
- Pata, M. O., Hannun, Y. A. und Ng, C. K. Y. (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.*, 185(3):611–630.
- Peer, M. (2010). Sphingolipide – Analytik, Biosynthese und Funktion in der *Arabidopsis thaliana* Pathogenantwort. Dissertation, *Universität Würzburg*.
- Peer, M., Bach, M., Mueller, M. J. und Waller, F. (2011). Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in Arabidopsis leaves. *FEBS Lett.*, 585(19):3006–3010.

- Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M. J. und Waller, F. (2010). *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 584(18):4053–4056.
- Petersen, N. H. T., Joensen, J., McKinney, L. V., Brodersen, P., Petersen, M., Hofius, D. und Mundy, J. (2009). Identification of proteins interacting with *Arabidopsis* ACD11. *J. Plant Physiol.*, 166(6):661–666.
- Petersen, N. H. T., McKinney, L. V., Pike, H., Hofius, D., Zakaria, A., Brodersen, P., Petersen, M., Brown, R. E. und Mundy, J. (2008). Human GLTP and mutant forms of ACD11 suppress cell death in the *Arabidopsis acd11* mutant. *FEBS J.*, 275(17):4378–4388.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9):2002–2007.
- Pruett, S. T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C. A., Sullards, M. C., Liotta, D. C. und Merrill, A. H. Jr. (2008). Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J. Lipid Res.*, 49(8):1621–1639.
- Qin, X., Zhang, R. X., Ge, S., Zhou, T. und Liang, Y. K. (2017). Sphingosine kinase AtSPHK1 functions in fumonisin B1-triggered cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 119:70–80.
- Rennie, E. A., Ebert, B., Miles, G. P., Cahoon, R. E., Christiansen, K. M., Stonebloom, S., Khatab, H., Twell, D., Petzold, C. J., Adams, P. D., Dupree, P., Heazlewood, J. L., Cahoon, E. B. und Scheller, H. V. (2014). Identification of a Sphingolipid  $\alpha$ -Glucuronosyltransferase That Is Essential for Pollen Function in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26(8):3314–3325.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(12):5463–5467.
- Saucedo-García, M., Gavilanes-Ruíz, M. und Arce-Cervantes, O. (2015). Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, 6:55.
- Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Olivera-Flores, T. de J., Vázquez-Santana, S., Cahoon, E. B. und Gavilanes-Ruiz, M. (2011a). Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Signal. Behav.*, 6(10):1616–1619.
- Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., Lozano-Rosas, M. G., Dietrich, C. R., Ramos-Vega, M.,

- Cahoon, E. B. und Gavilanes-Ruíz, M. (2011b). MPK6, sphinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 191(4):943–957.
- Scherer, M., Leuthäuser-Jaschinski, K., Ecker, J., Schmitz, G. und Liebisch, G. (2010). A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids. *J. Lipid Res.*, 51:2001–2011.
- Scherer, M., Schmitz, G. und Liebisch, G. (2009). High-Throughput Analysis of Sphingosine 1-Phosphate, Sphinganine 1-Phosphate, and Lysophosphatidic Acid in Plasma Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem.*, 55(6):1218–1222.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y. A. und Zuo, J. (2007). Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.*, 17:1030–1040.
- Siehler, S. und Manning, D. R. (2002). Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1582:94–99.
- Simanshu, D. K., Zhai, X., Munch, D., Hofius, D., Markham, J. E., Bielawski, J., Bielawska, A., Malinina, L., Molotkovsky, J. G., Mundy, J. W., Patel, D. J. und Brown, R. E. (2014). *Arabidopsis* Accelerated Cell Death 11, ACD11, Is a Ceramide-1-Phosphate Transfer Protein and Intermediary Regulator of Phytoceramide Levels. *Cell Rep.*, 6(2):388–399.
- Spassieva, S. D., Markham, J. E. und Hille, J. (2002). The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J.*, 32(4):561–572.
- Sperling, P., Ternes, P., Moll, H., Franke, S., Zähringer, U. und Heinz, E. (2001). Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 494(1–2):90–94.
- Spiegel, S. und Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4:397–407.
- Stockmann-Juvala, H. und Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B<sub>1</sub>. *Hum. Exp. Toxicol.*, 27(11):799–809.
- Sullards, M. C. (2000). Analysis of Sphingomyelin, Glucosylceramide, Ceramide, Sphingosine, and Sphingosine 1-Phosphate by Tandem Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.*, 312:32–45.

- Sullards, M. C. und Merrill, A. H. Jr. (2001). Analysis of Sphingosine 1-Phosphate, Ceramides, and Other Bioactive Sphingolipids by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Sci. STKE*, 2001(67):p11.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T. und Terauchi, R. (2009). Serine Palmitoyltransferase, the First Step Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis, Is Involved in Nonhost Resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22(1):31–38.
- Teng, C., Dong, H., Shi, L., Deng, Y., Mu, J., Zhang, J., Yang, X. und Zuo, J. (2008). Serine Palmitoyltransferase, a Key Enzyme for de Novo Synthesis of Sphingolipids, Is Essential for Male Gametophyte Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 146(3):1322–1332.
- Ternes, P., Feussner, K., Werner, S., Lerche, J., Iven, T., Heilmann, I., Riezman, H. und Feussner, I. (2011). Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 192(4):841–854.
- Testard, A., Da Silva, D., Ormancey, M., Pichereaux, C., Pouzet, C., Jauneau, A., Grat, S., Robe, E., Brière, C., Cotelle, V., Mazars, C. und Thuleau, P. (2016). Calcium- and Nitric Oxide-Dependent Nuclear Accumulation of Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Response to Long Chain Bases in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.*, 57(10):2221–2231.
- Thudichum, J. L. W. (1884). A Treatise on the Chemical Constitution of Brain. Bailliere, Tindall and Cox (Hrsg.). 149. *Royal College of Physicians*, London, Großbritannien.
- Townley, H. E., McDonald, K., Jenkins, G. I., Knight, M. R. und Leaver, C. J. (2005). Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol. Chem.*, 386(2):161–166.
- Tsegaye, Y., Richardson, C. G., Bravo, J. E., Mulcahy, B. J., Lynch, D. V., Markham, J. E., Jaworski, J. G., Chen, M., Cahoon, E. B. und Dunn, T. M. (2007). *Arabidopsis* Mutants Lacking Long Chain Base Phosphate Lyase Are Fumonisin-sensitive and Accumulate Trihydroxy-18:1 Long Chain Base Phosphate. *J. Biol. Chem.*, 282:28195–28206.
- van der Hooft, R. A. L. und Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell*, 20(8):2009–2017.
- van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L. A. J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B. und Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.*, 18:1241–1246.

- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J. E., Tsegaye, Y., Dunn, T. M., Wang, G. L., Bellizzi, M., Parsons, J. F., Morrissey, D., Bravo, J. E., Lynch, D. V. und Xiao, S. (2008). An Inositolphosphorylceramide Synthase Is Involved in Regulation of Plant Programmed Cell Death Associated with Defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(11):3163–3179.
- Warnecke, D. und Heinz, E. (2003). Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(5):919–941.
- Worrall, D., Liang, Y. K., Alvarez, S., Holroyd, G. H., Spiegel, S., Panagopoulos, M., Gray, J. E. und Hetherington, A. M. (2008). Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J.*, 56(1):64–72.
- Wu, J. X., Li, J., Liu, Z., Yin, J., Chang, Z. Y., Rong, C., Wu, J. L., Bi, F. C. und Yao, N. (2015). The *Arabidopsis* ceramidase *AtACER* functions in disease resistance and salt tolerance. *Plant J.*, 81(5):767–780.
- Xie, L. J., Chen, Q. F., Chen, M. X., Yu, L. J., Huang, L., Chen, L., Wang, F. Z., Xia, F. N., Zhu, T. R., Wu, J. X., Yin, J., Liao, B., Shi, J., Zhang, J. H., Aharoni, A., Yao, N., Shu, W. und Xiao, S. (2015). Unsaturation of Very-Long-Chain Ceramides Protects Plant from Hypoxia-Induced Damages by Modulating Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.*, 11(3):e1005143.
- Yanagawa, D., Ishikawa, T. und Imai, H. (2017). Synthesis and degradation of long-chain base phosphates affect fumonisin B<sub>1</sub>-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.*, 130(3):571–585.
- Zuo, J., Niu, Q. W. und Chua, N. H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.*, 24(2):265–273.

## Anhang

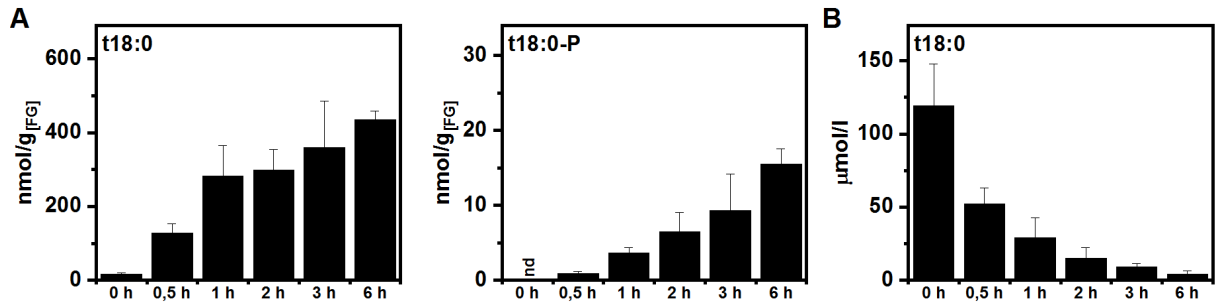
**Tabelle A1: Primer zur Überprüfung der T-DNA-Insertionsmutanten.** Für die Überprüfung der jeweiligen Mutante wurde zur Feststellung eines Wildtyp-Allels eine PCR mit dem angegebenen linken (LP) und rechten Primer (RP) durchgeführt. Zur Feststellung der T-DNA-Insertion im entsprechenden Gen wurde eine PCR mit dem angegebenen rechten Primer (RP) und einem der drei T-DNA spezifischen *left border* Primer (LB) durchgeführt.

Name	Mutante	Sequenz (5' → 3')
SALK_020151.LP	<i>dpl1-1</i>	CATGCCATCACACATAGCAAC
SALK_020151.RP		AGAAAGGCCTCAAAGCTTGTC
SALK_093662.LP	<i>dpl1-2</i>	CATGCCATCACACATAGCAAC
SALK_093662.RP		ATCCATGTTGATTCAAGCTCG
SAIL_794_B01.LP	<i>SPHK1-KD</i>	TCCCAAAGCAATTCCTCTTAC
SAIL_794_B01.RP		CGTCATAGCTAAGAGGAGGGG
GK-288D07.LP	<i>SPHK1-OE</i>	AACGGATTCACAAACACAAGC
GK-288D07.RP		ATCCCTTGTGGTTGTGTGTG
SALK_035202.LP	<i>spp1-1</i>	ATTGGCAGCAATCACAAAATC
SALK_035202.RP		GGCAGTAATCCTTCTAACCGG
SALK_027084.LP	<i>spp1-2</i>	ACCACTGACGATATCGACGAC
SALK_027084.RP		ATCAATGGAAGGTTCAAGGGAC
GK-126D07.LP	<i>SPP1-OE</i>	CCATGTCATGAAGTAATCGGC
GK-126D07.RP		ACAATACCAACGAGCACCAAG
LBb1.3	SALK-Linien	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LB3_SAIL	SAIL-Linien	TAGCATCTGAATTTTCATAACCA ATCTCGATACAC
LB_GK (o8474)	GK-Linien	ATAATAACGCTGCGGACATCTA CATTTT

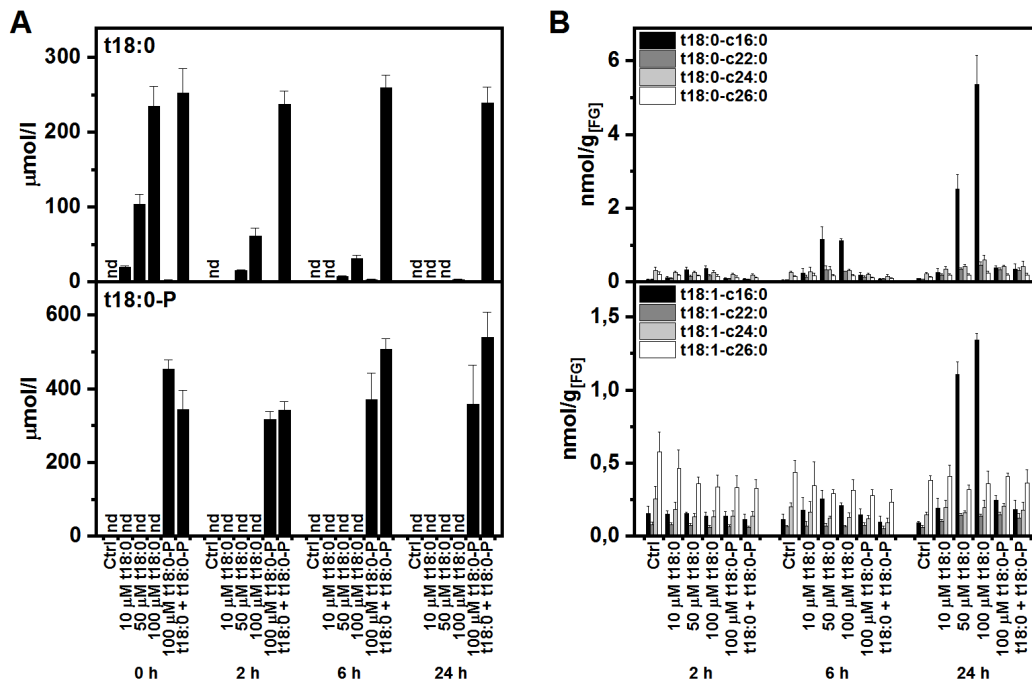
**Tabelle A2: Klonierungs-, Sequenzierungs- und qPCR-Primer.** Aufgeföhrt sind die für Klonierungen, Sequenzierungen und qPCR verwendeten Primer mit der jeweiligen Sequenz, der Orientierung (O) auf dem Strang (FW = *forward*, RV = *reverse*) und dem Verwendungszweck. Rekombinationssequenzen für Gateway®-Klonierung sind in rot markiert.

Name	Sequenz (5' → 3')	O	Verwendung
DPL1.GW.F	GGGGACAAGTTGTACAAA <b>AAAGCAGGCTTC</b> ATGGATTCTTTTCATATTCCTC	FW	CDS DPL1 mit Gateway® <i>attB1</i> -Sequenz
DPL1.GW.R	GGGGACCAC <b>TTGTACAAGA<b>AAAGCTGGTCT</b></b> TAAATATTGACTGTCCATGAAAC	RV	CDS DPL1 mit Gateway® <i>attB2</i> -Sequenz
M13-21.F	TGTAAAACGACGGCCAGT	FW	Sequenzierung von pGEM
M13-24.R	CGGATAACAATTTCACACAGG	RV	
SEQ-L1	TGCGGTTAACGCTAGCATGGATCTC	FW	Sequenzierung von pDONR™201, pENTR
SEQ-L2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	RV	
pMDC7ha.F	CGGACTATGCAGATATCTCTAGGC	FW	Sequenzierung von pMDC7ha
pMDC7.R	CCGATGATACGGACGAAAGCTGG	RV	
DPL1.Q.F	ACAAAGCGGCATATTAAC	FW	qPCR von <i>DPL1</i>
DPL1.Q.R	ACCAAGCTCCTCGATAGG	RV	
SPHK1.Q.F	CTCCTGACGCTAAGTTTC	FW	qPCR von <i>SPHK1</i>
SPHK1.Q.R	GGGTTCCATCACTCAACT	RV	
SPPI.Q.F	TACCTTAGGAATTGTTACCG	FW	qPCR von <i>SPPI</i>
SPPI.Q.R	ATAGGGAGCTCTGGTGAG	RV	
ACT2/8.Q.F	GGTGATGGTGTGTCT	FW	qPCR von <i>Aktin2/8</i> (Ivashikina <i>et al.</i> , 2003)
ACT2/8.Q.R	ACTGAGCACAAATGTTAC	RV	

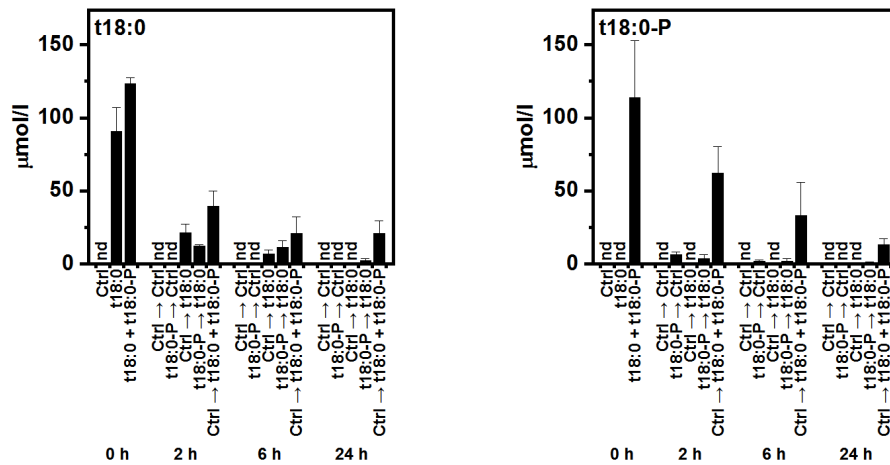




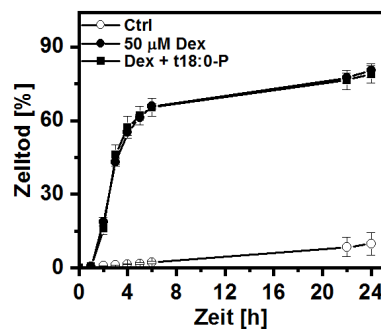
**Abbildung A1: Zeitliche Analyse der Aufnahme von t18:0 in Blattscheiben.** Blattscheiben wurden in 100 µM t18:0 gelegt. (A) Spiegel von t18:0 und t18:0-P in den Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. (B) Konzentration von t18:0 in der Behandlungslösung wurde nach Entfernung der 5 Blattscheiben pro Probe mit HPLC-MS/MS gemessen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



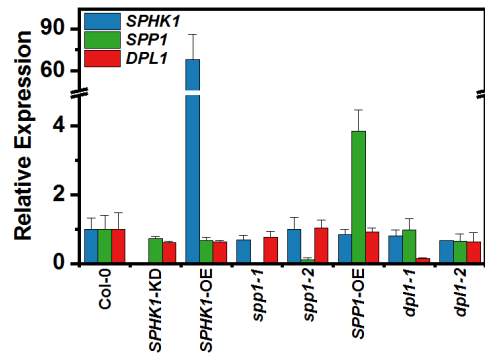
**Abbildung A2: Spingolipid-Spiegel nach Behandlung von Blattscheiben mit t18:0 und t18:0-P.** (A) Konzentration von t18:0 und t18:0-P in den Behandlungslösungen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Entfernung der 5 Blattscheiben pro Probe mit HPLC-MS/MS gemessen (vergleiche Abbildung 5 B für Sphingobasen-Spiegel in den Blattscheiben). Bei 0 h sind die Werte der Behandlungslösungen vor Kontakt mit den Blattscheiben dargestellt. (B) Spiegel von t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit t18:0 und/oder t18:0-P zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



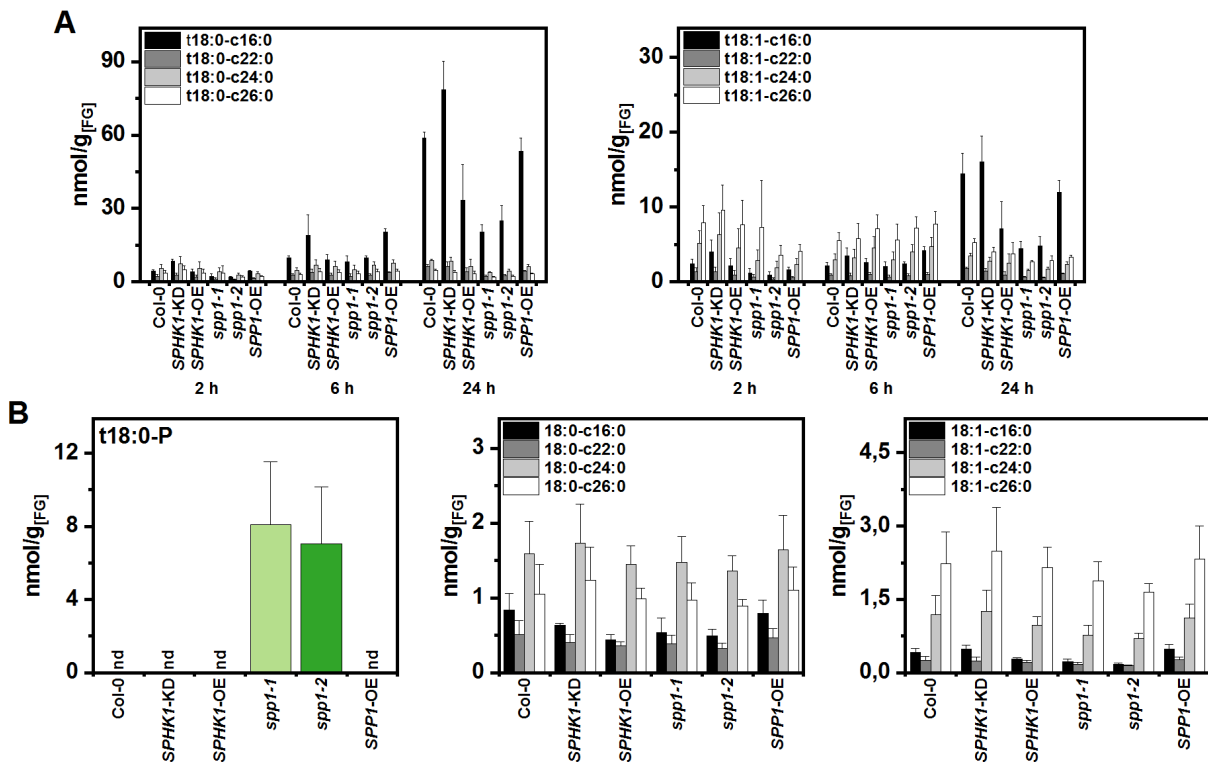
**Abbildung A3: Spingobasen-Spiegel in Behandlungslösungen nach zeitversetzter Applikation von t18:0 und t18:0-P.** Blattscheiben wurden in der ersten Lösung eingelegt, nach 3 h mit Wasser gewaschen und in der zweiten Behandlungslösung für die angegebene Zeit inkubiert. Die Behandlungslösungen bestanden aus 100 µM der jeweiligen Spingobase oder einer Kontrolle (2 % Methanol in Wasser). Konzentration von t18:0 und t18:0-P in den zweiten Behandlungslösungen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Entfernung der 5 Blattscheiben pro Probe mit HPLC-MS/MS gemessen (vergleiche Abbildung 6 B für Spingobasen-Spiegel in den Blattscheiben). Bei 0 h sind die Werte der zweiten Behandlungslösungen vor Kontakt mit den Blattscheiben dargestellt. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



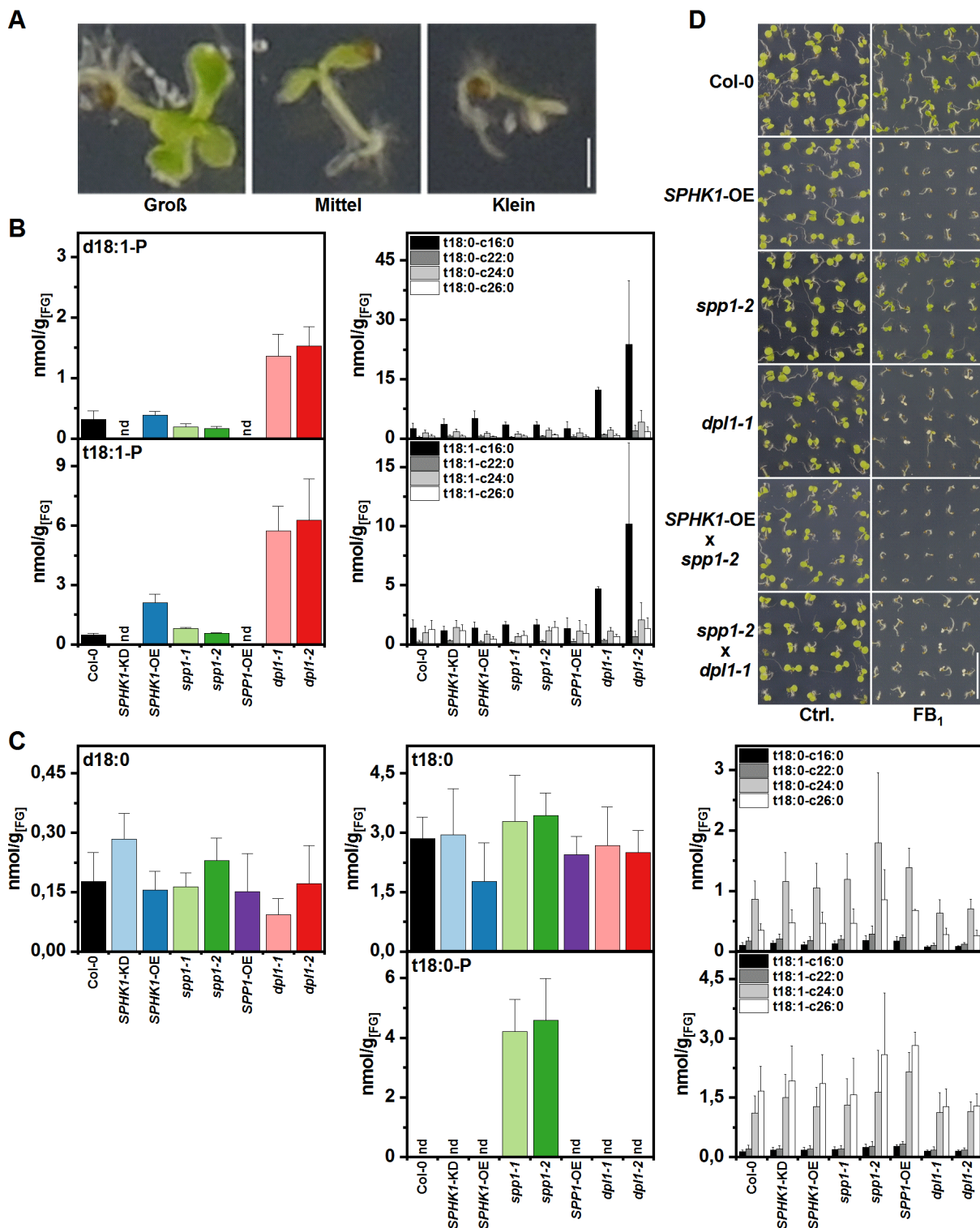
**Abbildung A4: Zelltodinduktion in Blattscheiben nach Expression von AvrRpm1.** Blattscheiben der Linie *Dex:AvrRpm1-HA* wurden in Kontrolllösung (2 % Methanol in Wasser), 50 µM Dexamethason und 100 µM t18:0-P eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken.



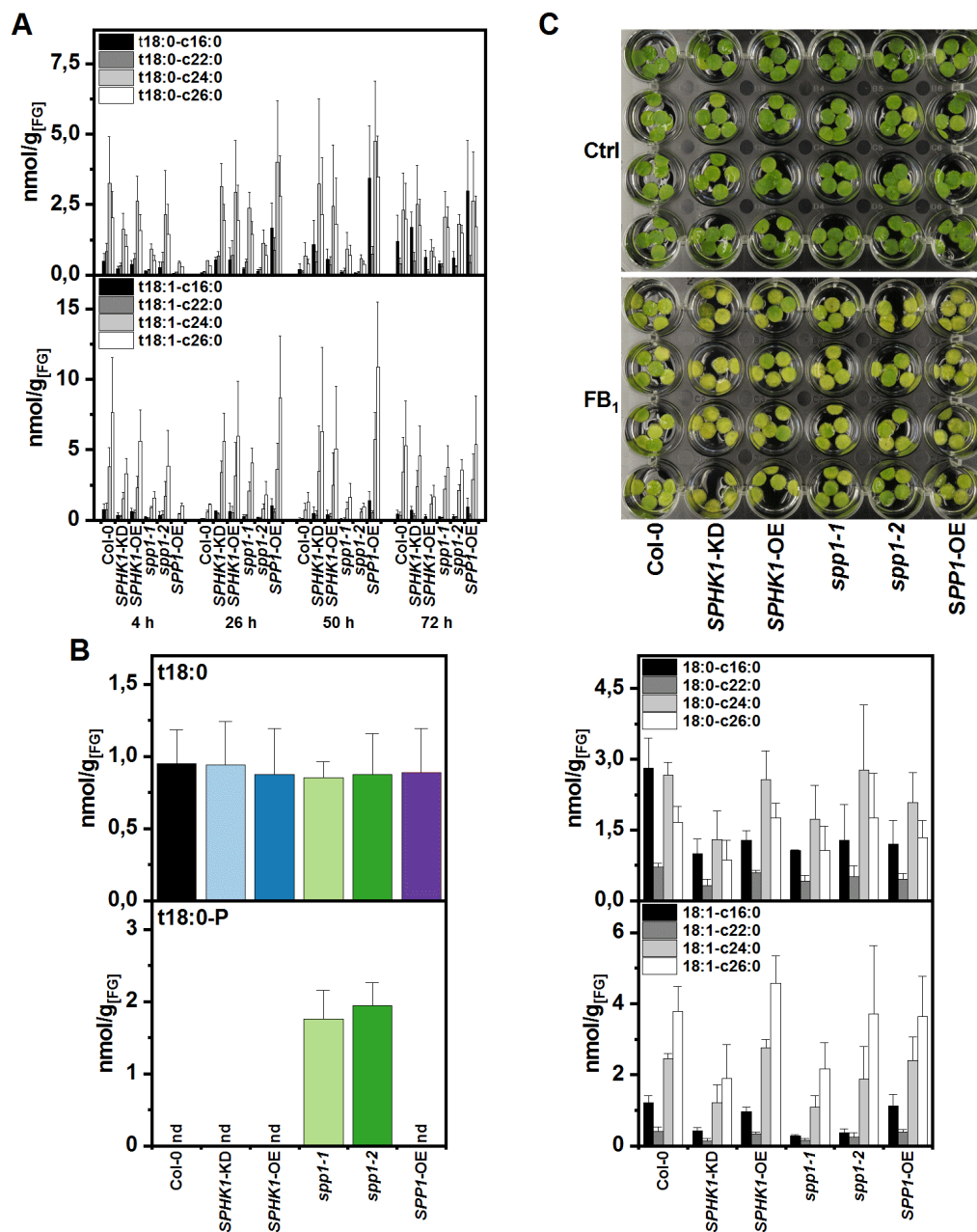
**Abbildung A5: Genexpression in *Arabidopsis*-Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus.** Expression der drei Gene *SPHK1* (At4g21540), *SPP1* (At3g58490) und *DPL1* (At1g27980) in Blättern von 6 Wochen alten Pflanzen wurde nach RNA-Extraktion mittels qRT-PCR analysiert und auf das Referenzgen *ACT2/8* (At3g18780, At1g49240) normalisiert. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.



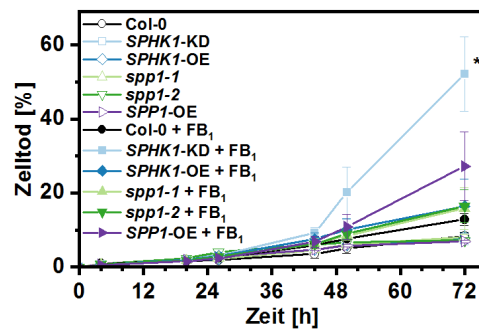
**Abbildung A6: Sphingolipid-Spiegel in Blattscheiben von Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus nach Behandlung mit t18:0.** (A) Spiegel von t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit 100  $\mu$ M t18:0 wurden zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS (vergleiche Abbildung 9 B für Sphingobasen-Spiegel in den Blattscheiben). (B) Spiegel von t18:0-P sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit Kontrolllösung (2% Methanol in Wasser) nach 24 h gemessen mit HPLC-MS/MS. Vor der Sphingobasen-Extraktion wurden die Blattscheiben gewaschen, um die Behandlungslösung möglichst vollständig zu entfernen. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken.



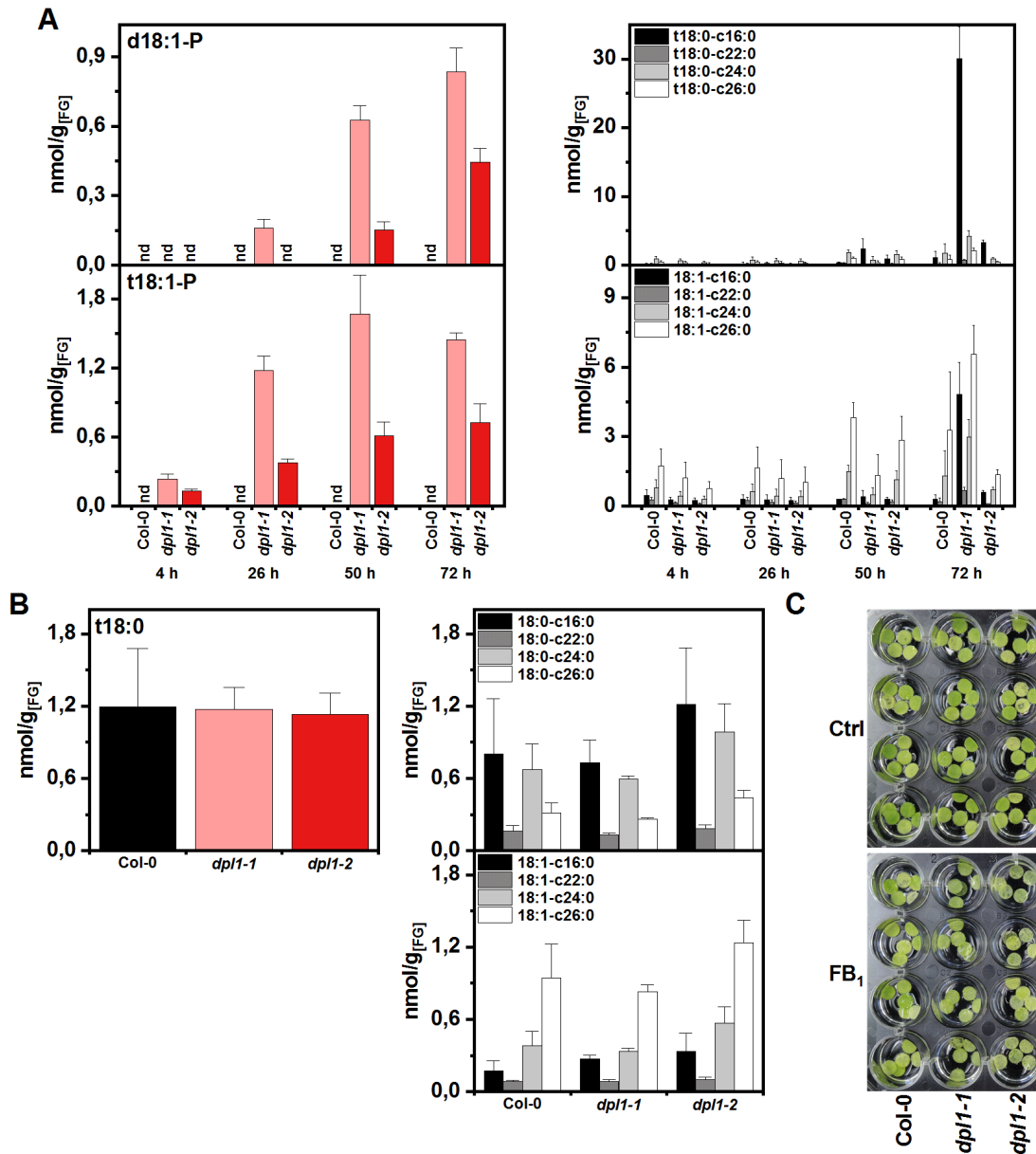
**Abbildung A7: Effekt von Fumonisin B<sub>1</sub> auf Wachstum und Sphingolipid-Spiegel von *Arabidopsis*-Keimlingen.** (A) Beispiel der Keimlingsgröße in den verschiedenen Kategorien in Abbildung 10 A. Maßstabsbalken = 1 mm. (B) Spiegel von d18:1-P, t18:1-P sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden von Keimlingen der verschiedenen Genotypen nach Wachstum auf Medium mit 0,5  $\mu$ M FB<sub>1</sub> für 12 Tage gemessen mit HPLC-MS/MS. (C) Spiegel von d18:0, t18:0, t18:0-P sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden von Keimlingen der verschiedenen Genotypen nach Wachstum auf Kontrollmedium für 12 Tage gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (B) und (C) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 25–50 Keimlingen einer Platte und der Standardabweichung als Fehlerbalken. (D) Phänotyp der verschiedenen Genotypen im Vergleich zu homozygot gezüchteten Kreuzungen der Mutanten nach Wachstum auf Kontrollmedium (linke Reihe) und Medium mit 0,5  $\mu$ M FB<sub>1</sub> (rechte Reihe) für 12 Tage. Maßstabsbalken = 1 cm.



**Abbildung A8: Effekt von Fumonisin B<sub>1</sub>-Behandlung auf Sphingolipid-Spiegel und Zelltod in Blattscheiben von Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus.** (A) Spiegel von t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit 50  $\mu$ M FB<sub>1</sub> zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS (vergleiche Abbildung 11 B für Sphingobasen-Spiegel in den Blattscheiben). (B) Spiegel von t18:0, t18:0-P sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) nach 72 h gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. (C) Phänotyp von Blattscheiben (Durchmesser 5 mm) der verschiedenen Genotypen 72 h nach Behandlung mit Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) oder 50  $\mu$ M FB<sub>1</sub> (vergleiche Abbildung 11 A für Zelltodwerte in den Blattscheiben).



**Abbildung A9: Zelltodinduktion in Blattscheiben von Mutanten des LCB/LCB-P-Metabolismus nach Behandlung mit Fumonisin B<sub>1</sub>.** Blattscheiben der angegebenen Genotypen wurden in Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) oder 10  $\mu$ M FB<sub>1</sub> eingelegt. Der Zelltod wurde durch Leitfähigkeitsmessung der Lösung bei den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und bezieht sich auf die Leitfähigkeit der gekochten Probe am Ende des Experiments, welche als 100 % Zelltod gesetzt wurde. Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. Sternchen zeigen Signifikanzniveaus  $< 0,05$  des jeweiligen Genotyps und wurden mittels ANOVA für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate berechnet.



**Abbildung A10: Effekt von Fumonisin B<sub>1</sub>-Behandlung auf Spingolipid-Spiegel und Zelltod in Blattscheiben der *knockout*-Mutanten *dpl1*.** (A) Spiegel von d18:1-P, t18:1-P sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit 10 µM FB<sub>1</sub> zu den angegebenen Zeitpunkten, gemessen mit HPLC-MS/MS (vergleiche Abbildung 12 B für Sphingobasen-Spiegel in den Blattscheiben). (B) Spiegel von t18:0 sowie t18:0 und t18:1 enthaltenden Ceramiden in den Blattscheiben nach Behandlung mit Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) nach 72 h gemessen mit HPLC-MS/MS. Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Proben mit je 5 Blattscheiben und der Standardabweichung als Fehlerbalken. (C) Phänotyp von Blattscheiben (Durchmesser 5 mm) der verschiedenen Genotypen 72 h nach Behandlung mit Kontrolllösung (1 % Methanol in Wasser) oder 10 µM FB<sub>1</sub> (vergleiche Abbildung 12 A für Zelltodwerte in den Blattscheiben).

**Tabelle A3: Verhältnisse von LCB-Ps zu LCBs aus den Experimenten der Abbildungen 9, 10, 11, 12.** Die Verhältnisse wurden aus den Mittelwerten der Spiegel von d18:0-P/d18:0, t18:0-P/t18:0 und der Summe aus d18:0-P und t18:0-P zu der Summe aus d18:0 und t18:0 berechnet.

Abb. [Nr.]	Zeit [h]	Genotyp	Verhältnis		
			d18:0-P/d18:0	t18:0-P/t18:0	LCB-Ps/LCBs
9	2	Col-0	–	0,08	0,08
		<i>SPHK1</i> -KD	–	0,03	0,03
		<i>SPHK1</i> -OE	–	0,86	0,86
		<i>spp1-1</i>	–	0,35	0,35
		<i>spp1-2</i>	–	0,21	0,21
		<i>SPP1</i> -OE	–	0,04	0,04
	6	Col-0	–	0,09	0,09
		<i>SPHK1</i> -KD	–	0,01	0,01
		<i>SPHK1</i> -OE	–	0,74	0,74
		<i>spp1-1</i>	–	0,37	0,37
		<i>spp1-2</i>	–	0,25	0,25
		<i>SPP1</i> -OE	–	0,05	0,05
	24	Col-0	–	0,23	0,23
		<i>SPHK1</i> -KD	–	0,07	0,07
		<i>SPHK1</i> -OE	–	0,94	0,94
		<i>spp1-1</i>	–	0,35	0,35
		<i>spp1-2</i>	–	0,32	0,32
		<i>SPP1</i> -OE	–	0,14	0,14
10	–	Col-0	6,06	1,07	1,84
		<i>SPHK1</i> -KD	0,14	0,05	0,07
		<i>SPHK1</i> -OE	8,26	5,51	6,40
		<i>spp1-1</i>	13,27	3,39	4,72
		<i>spp1-2</i>	11,12	2,70	3,91
		<i>SPP1</i> -OE	0,34	0,05	0,09
		<i>dpl1-1</i>	10,07	2,68	4,47
		<i>dpl1-2</i>	11,59	3,06	5,09
		11	4	Col-0	0,76
<i>SPHK1</i> -KD	0,01			0,08	0,08
<i>SPHK1</i> -OE	0,32			0,18	0,18
<i>spp1-1</i>	1,61			2,34	2,32
<i>spp1-2</i>	1,76			2,53	2,50
<i>SPP1</i> -OE	0,05			0,02	0,02
26	Col-0		0,78	0,97	0,94
	<i>SPHK1</i> -KD		0,02	0,10	0,06
	<i>SPHK1</i> -OE		0,23	0,35	0,32
	<i>spp1-1</i>		1,62	3,23	2,94
	<i>spp1-2</i>		1,49	3,30	2,95
	<i>SPP1</i> -OE		0,03	0,03	0,03
50	Col-0		0,82	0,87	0,85
	<i>SPHK1</i> -KD		0,03	0,05	0,04
	<i>SPHK1</i> -OE		0,42	0,70	0,58
	<i>spp1-1</i>		4,08	5,97	5,18
	<i>spp1-2</i>		4,27	7,25	5,82
	<i>SPP1</i> -OE		0,04	0,03	0,03
72	Col-0	1,84	1,35	1,53	
	<i>SPHK1</i> -KD	0,05	0,07	0,06	
	<i>SPHK1</i> -OE	0,24	0,21	0,22	
	<i>spp1-1</i>	8,91	10,86	9,94	
	<i>spp1-2</i>	9,37	10,96	10,17	
	<i>SPP1</i> -OE	0,09	0,07	0,08	
12	4	Col-0	0,52	1,21	1,17
		<i>dpl1-1</i>	2,40	3,75	3,64
		<i>dpl1-2</i>	1,73	3,27	3,14
	26	Col-0	0,78	3,94	3,29
		<i>dpl1-1</i>	2,32	6,65	5,19
		<i>dpl1-2</i>	1,59	6,76	4,93
	50	Col-0	1,05	4,82	3,38
		<i>dpl1-1</i>	4,78	13,41	9,90
		<i>dpl1-2</i>	2,02	6,03	4,21
	72	Col-0	1,65	4,68	3,66
		<i>dpl1-1</i>	8,30	24,97	18,03
		<i>dpl1-2</i>	6,17	16,93	12,34



**Statistik für Abbildung 9A**  
**Univariate Varianzanalyse**

SPHK1-KD

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
t180Behandlung	0	40	
	1	40	
SPHK1KD	0	40	
	1	40	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1700,555	4	425,139	85,814	,000
Konstanter Term	94,735	1	94,735	19,122	,000
Zeit	574,009	1	574,009	115,864	,000
t180Behandlung	1113,078	1	1113,078	224,676	,000
SPHK1KD	6,483	1	6,483	1,309	,256
t180Behandlung * SPHK1KD	6,984	1	6,984	1,410	,239
Fehler	371,562	75	4,954		
Gesamt	4093,884	80			
Korrigierte Gesamtvariation	2072,116	79			

SPHK1-OE

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
t180Behandlung	0	40	
	1	40	
SPHK1OE	0	40	
	1	40	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1304,791	4	326,198	93,226	,000
Konstanter Term	90,604	1	90,604	25,894	,000
Zeit	435,123	1	435,123	124,356	,000
t180Behandlung	865,371	1	865,371	247,319	,000
SPHK1OE	2,600	1	2,600	,743	,391
t180Behandlung * SPHK1OE	1,698	1	1,698	,485	,488
Fehler	262,426	75	3,499		
Gesamt	3232,299	80			
Korrigierte Gesamtvariation	1567,217	79			

spp1-1

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
t180Behandlung	0	40	
	1	40	
spp11	0	40	
	1	40	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1323,570	4	330,893	93,360	,000
Konstanter Term	83,501	1	83,501	23,560	,000
Zeit	457,125	1	457,125	128,976	,000
t180Behandlung	862,120	1	862,120	243,243	,000
spp11	2,480	1	2,480	,700	,406
t180Behandlung * spp11	1,845	1	1,845	,521	,473
Fehler	265,820	75	3,544		
Gesamt	3257,548	80			
Korrigierte Gesamtvariation	1589,390	79			

spp1-2

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
t180Behandlung	0	40	
	1	40	
spp12	0	40	
	1	40	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1291,783	4	322,946	94,239	,000
Konstanter Term	76,718	1	76,718	22,387	,000
Zeit	476,690	1	476,690	139,103	,000
t180Behandlung	807,137	1	807,137	235,530	,000
spp12	2,619	1	2,619	,764	,385
t180Behandlung * spp12	5,336	1	5,336	1,557	,216
Fehler	257,017	75	3,427		
Gesamt	3213,400	80			
Korrigierte Gesamtvariation	1548,800	79			

SPP1-OE

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
t180Behandlung	0	40	
	1	40	
SPP1OE	0	40	
	1	40	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1509,459	4	377,365	81,012	,000
Konstanter Term	72,761	1	72,761	15,620	,000
Zeit	554,423	1	554,423	119,023	,000
t180Behandlung	954,985	1	954,985	205,015	,000
SPP1OE	,017	1	,017	,004	,953
t180Behandlung * SPP1OE	,033	1	,033	,007	,933
Fehler	349,359	75	4,658		
Gesamt	3669,050	80			
Korrigierte Gesamtvariation	1858,817	79			

**Statistik für Abbildung 9B  
Allgemeines lineares Modell**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
SPHK1KD	0	12
	1	12

**SPHK1-KD**

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,937	147,516	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,063	147,516	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	14,752	147,516	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	14,752	147,516	2,000	20,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,602	15,127	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,398	15,127	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	1,513	15,127	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	1,513	15,127	2,000	20,000	,000
SPHK1KD	Pillai-Spur	,598	14,849	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,402	14,849	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	1,485	14,849	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	1,485	14,849	2,000	20,000	,000

**Tests der Zwischensubjektffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	t18:0	7455,762	2	3727,881	1,589	,228
	t18:0-P	7270,461	2	3635,231	29,505	,000
Konstanter Term	t18:0	722165,503	1	722165,503	307,880	,000
	t18:0-P	734,118	1	734,118	5,958	,024
Zeit	t18:0	1275,196	1	1275,196	,544	,469
	t18:0-P	3894,301	1	3894,301	31,608	,000
SPHK1KD	t18:0	6180,566	1	6180,566	2,635	,119
	t18:0-P	3376,161	1	3376,161	27,403	,000
Fehler	t18:0	49257,767	21	2345,608		
	t18:0-P	2587,320	21	123,206		
Gesamt	t18:0	1779235,734	24			
	t18:0-P	21989,209	24			
Korrigierte Gesamtvariation	t18:0	56713,529	23			
	t18:0-P	9857,781	23			

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
SPHK1OE	0	12
	1	12

**SPHK1-OE**

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,941	158,903	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,059	158,903	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	15,890	158,903	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	15,890	158,903	2,000	20,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,240	3,150	2,000	20,000	,065
	Wilks-Lambda	,760	3,150	2,000	20,000	,065
	Hotelling-Spur	,315	3,150	2,000	20,000	,065
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	,315	3,150	2,000	20,000	,065
SPHK1OE	Pillai-Spur	,860	61,180	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,140	61,180	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	6,118	61,180	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	6,118	61,180	2,000	20,000	,000

**Tests der Zwischensubjektffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	t18:0	1821,316	2	910,658	,316	,733
	t18:0-P	212756,797	2	106378,398	65,636	,000
Konstanter Term	t18:0	653641,655	1	653641,655	226,726	,000
	t18:0-P	117354,973	1	117354,973	72,409	,000
Zeit	t18:0	1447,409	1	1447,409	,502	,486
	t18:0-P	9123,597	1	9123,597	5,629	,027
SPHK1OE	t18:0	373,907	1	373,907	,130	,722
	t18:0-P	203633,200	1	203633,200	125,644	,000
Fehler	t18:0	60542,120	21	2882,958		
	t18:0-P	34035,143	21	1620,721		
Gesamt	t18:0	1632796,062	24			
	t18:0-P	630578,209	24			
Korrigierte Gesamtvariation	t18:0	62363,436	23			
	t18:0-P	246791,940	23			

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
spp11	0	12
	1	12

**spp1-1**

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,904	94,530	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,096	94,530	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	9,453	94,530	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	9,453	94,530	2,000	20,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,238	3,123	2,000	20,000	,066
	Wilks-Lambda	,762	3,123	2,000	20,000	,066
	Hotelling-Spur	,312	3,123	2,000	20,000	,066
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	,312	3,123	2,000	20,000	,066
spp11	Pillai-Spur	,634	17,348	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,366	17,348	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	1,735	17,348	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	1,735	17,348	2,000	20,000	,000

**Tests der Zwischensubjektffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	t18:0	6019,559	2	3009,779	1,036	,372
	t18:0-P	21032,833	2	10516,417	17,760	,000
Konstanter Term	t18:0	575623,695	1	575623,695	198,160	,000
	t18:0-P	23816,237	1	23816,237	40,265	,000
Zeit	t18:0	5870,340	1	5870,340	2,021	,170
	t18:0-P	3775,855	1	3775,855	6,384	,020
spp11	t18:0	149,218	1	149,218	,051	,823
	t18:0-P	17256,978	1	17256,978	29,175	,000
Fehler	t18:0	61001,553	21	2904,836		
	t18:0-P	12421,267	21	591,489		
Gesamt	t18:0	1559368,869	24			
	t18:0-P	123222,242	24			
Korrigierte Gesamtvariation	t18:0	67021,112	23			
	t18:0-P	33454,100	23			

spp1-2

Zwischensubjektfa  
kto  
ren

		N	
spp12	0	0	12
	1	0	12

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,917	110,262	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,083	110,262	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	11,026	110,262	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	11,026	110,262	2,000	20,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,654	18,909	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,346	18,909	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	1,891	18,909	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	1,891	18,909	2,000	20,000	,000
spp12	Pillai-Spur	,688	22,017	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,312	22,017	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	2,202	22,017	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	2,202	22,017	2,000	20,000	,000

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	t18:0	3673,115	2	1836,557	,611	,552
	t18:0-P	14642,610	2	7321,305	40,450	,000
Konstanter Term	t18:0	667486,148	1	667486,148	222,037	,000
	t18:0-P	12107,305	1	12107,305	66,893	,000
Zeit	t18:0	2055,420	1	2055,420	,684	,418
	t18:0-P	6807,818	1	6807,818	37,613	,000
spp12	t18:0	1617,695	1	1617,695	,538	,471
	t18:0-P	7834,792	1	7834,792	43,288	,000
Fehler	t18:0	63129,923	21	3006,187		
	t18:0-P	3800,881	21	180,994		
Gesamt	t18:0	1690013,915	24			
	t18:0-P	84370,147	24			
Korrigierte Gesamtvariation	t18:0	66803,038	23			
	t18:0-P	18443,491	23			

Zwischensubjektfa  
kto  
ren

		N	
SPP1OE	0	0	12
	1	0	12

SPP1-OE

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,913	104,891	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,087	104,891	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	10,489	104,891	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	10,489	104,891	2,000	20,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,732	27,334	2,000	20,000	,000
	Wilks-Lambda	,268	27,334	2,000	20,000	,000
	Hotelling-Spur	2,733	27,334	2,000	20,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	2,733	27,334	2,000	20,000	,000
SPP1OE	Pillai-Spur	,483	9,329	2,000	20,000	,001
	Wilks-Lambda	,517	9,329	2,000	20,000	,001
	Hotelling-Spur	,933	9,329	2,000	20,000	,001
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	,933	9,329	2,000	20,000	,001

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	t18:0	15513,911	2	7756,955	2,002	,160
	t18:0-P	6343,441	2	3171,721	30,123	,000
Konstanter Term	t18:0	848712,773	1	848712,773	219,095	,000
	t18:0-P	1337,123	1	1337,123	12,699	,002
Zeit	t18:0	424,797	1	424,797	,110	,744
	t18:0-P	5296,507	1	5296,507	50,303	,000
SPP1OE	t18:0	15089,114	1	15089,114	3,895	,062
	t18:0-P	1046,934	1	1046,934	9,943	,005
Fehler	t18:0	81348,185	21	3873,723		
	t18:0-P	2211,144	21	105,293		
Gesamt	t18:0	1937415,883	24			
	t18:0-P	27020,989	24			
Korrigierte Gesamtvariation	t18:0	96862,096	23			
	t18:0-P	8554,585	23			

Abbildung A11: Univariate Varianzanalyse zu Abbildung 9. Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Für Zellodmessungen (Abbildung 9 A) wurden die Daten mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „t18:0-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Für Sphingobasen-Spiegel (Abbildung 9 B) wurden die Daten mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für den Faktor oder die Interaktion der Faktoren wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

**Statistik für Abbildung 10C  
Allgemeines lineares Modell**

**SPHK1-KD**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
FB1Behandlung	0	8
	1	8
SPHK1KD	0	8
	1	8

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,937	33,678	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,063	33,678	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	14,968	33,678	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	14,968	33,678	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,937	33,375	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,063	33,375	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	14,833	33,375	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	14,833	33,375	4,000	9,000	,000
SPHK1KD	Pillai-Spur	,928	29,129	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,072	29,129	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	12,946	29,129	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	12,946	29,129	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * SPHK1KD	Pillai-Spur	,928	29,058	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,072	29,058	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	12,915	29,058	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	12,915	29,058	4,000	9,000	,000

**SPHK1-OE**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
FB1Behandlung	0	8
	1	8
SPHK1OE	0	8
	1	8

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,958	51,920	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,042	51,920	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	23,076	51,920	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	23,076	51,920	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,959	52,992	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,041	52,992	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	23,552	52,992	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	23,552	52,992	4,000	9,000	,000
SPHK1OE	Pillai-Spur	,966	64,558	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,034	64,558	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	28,692	64,558	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	28,692	64,558	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * SPHK1OE	Pillai-Spur	,966	63,462	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,034	63,462	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	28,205	63,462	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	28,205	63,462	4,000	9,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	69079,353	3	23026,451	96,992	,000
	t18:0	432188,173	3	144062,724	59,872	,000
	d18:0-P	114003,766	3	38001,255	48,759	,000
	t18:0-P	106315,100	3	35438,367	36,721	,000
Konstanter Term	d18:0	37401,276	1	37401,276	157,541	,000
	t18:0	347652,947	1	347652,947	144,484	,000
	d18:0-P	50033,026	1	50033,026	64,196	,000
	t18:0-P	45114,050	1	45114,050	46,747	,000
FB1Behandlung	d18:0	37045,257	1	37045,257	156,042	,000
	t18:0	334114,285	1	334114,285	138,857	,000
	d18:0-P	50033,026	1	50033,026	64,196	,000
	t18:0-P	45114,050	1	45114,050	46,747	,000
SPHK1KD	d18:0	16044,114	1	16044,114	67,581	,000
	t18:0	49076,301	1	49076,301	20,396	,001
	d18:0-P	31985,370	1	31985,370	41,040	,000
	t18:0-P	30600,525	1	30600,525	31,708	,000
FB1Behandlung * SPHK1KD	d18:0	15989,982	1	15989,982	67,353	,000
	t18:0	48997,586	1	48997,586	20,363	,001
	d18:0-P	31985,370	1	31985,370	41,040	,000
	t18:0-P	30600,525	1	30600,525	31,708	,000
Fehler	d18:0	2848,876	12	237,406		
	t18:0	28874,001	12	2406,167		
	d18:0-P	9352,490	12	779,374		
	t18:0-P	11580,727	12	965,061		
Gesamt	d18:0	109329,505	16			
	t18:0	808715,121	16			
	d18:0-P	173389,281	16			
	t18:0-P	163009,877	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	71928,229	15			
	t18:0	461062,174	15			
	d18:0-P	123356,256	15			
	t18:0-P	117895,827	15			

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	7637,288	3	2545,763	58,302	,000
	t18:0	91080,557	3	30360,186	42,652	,000
	d18:0-P	481771,618	3	160590,539	88,981	,000
	t18:0-P	905619,812	3	301873,271	102,269	,000
Konstanter Term	d18:0	7123,106	1	7123,106	163,131	,000
	t18:0	84995,877	1	84995,877	119,408	,000
	d18:0-P	386033,100	1	386033,100	213,896	,000
	t18:0-P	602833,456	1	602833,456	204,228	,000
FB1Behandlung	d18:0	7011,298	1	7011,298	160,570	,000
	t18:0	79688,301	1	79688,301	111,952	,000
	d18:0-P	386033,100	1	386033,100	213,896	,000
	t18:0-P	602833,456	1	602833,456	204,228	,000
SPHK1OE	d18:0	312,221	1	312,221	7,150	,020
	t18:0	5859,716	1	5859,716	8,232	,014
	d18:0-P	47869,259	1	47869,259	26,524	,000
	t18:0-P	151393,178	1	151393,178	51,289	,000
FB1Behandlung * SPHK1OE	d18:0	313,770	1	313,770	7,186	,020
	t18:0	5532,541	1	5532,541	7,773	,016
	d18:0-P	47869,259	1	47869,259	26,524	,000
	t18:0-P	151393,178	1	151393,178	51,289	,000
Fehler	d18:0	523,981	12	43,665		
	t18:0	8541,702	12	711,809		
	d18:0-P	21657,214	12	1804,768		
	t18:0-P	35421,217	12	2951,768		
Gesamt	d18:0	15284,375	16			
	t18:0	184618,136	16			
	d18:0-P	889461,931	16			
	t18:0-P	1543874,485	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	8161,269	15			
	t18:0	99622,260	15			
	d18:0-P	503428,831	15			
	t18:0-P	941041,030	15			

spp1-1

Zwischensubjektfaktoren

		N
FB1Behandlung	0	8
	1	8
spp11	0	8
	1	8

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	.931	30,539	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,069	30,539	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	13,573	30,539	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	13,573	30,539	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,933	31,310	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,067	31,310	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	13,915	31,310	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	13,915	31,310	4,000	9,000	,000
spp11	Pillai-Spur	,937	33,425	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,063	33,425	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	14,856	33,425	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	14,856	33,425	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * spp11	Pillai-Spur	,933	31,219	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,067	31,219	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	13,875	31,219	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	13,875	31,219	4,000	9,000	,000

spp1-2

Zwischensubjektfaktoren

		N
FB1Behandlung	0	8
	1	8
spp12	0	8
	1	8

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,943	37,479	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,057	37,479	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	16,657	37,479	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	16,657	37,479	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,943	37,377	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,057	37,377	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	16,612	37,377	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	16,612	37,377	4,000	9,000	,000
spp12	Pillai-Spur	,933	31,272	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,067	31,272	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	13,899	31,272	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	13,899	31,272	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * spp12	Pillai-Spur	,927	28,641	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,073	28,641	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	12,729	28,641	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	12,729	28,641	4,000	9,000	,000

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	2923,727	3	974,576	60,838	,000
	t18:0	86393,665	3	28797,888	46,888	,000
	d18:0-P	146048,916	3	48682,972	38,299	,000
	t18:0-P	254899,695	3	84966,565	46,646	,000
Konstanter Term	d18:0	2215,736	1	2215,736	138,317	,000
	t18:0	75193,400	1	75193,400	122,428	,000
	d18:0-P	145117,305	1	145117,305	114,165	,000
	t18:0-P	242649,509	1	242649,509	133,214	,000
FB1Behandlung	d18:0	2151,958	1	2151,958	134,335	,000
	t18:0	68603,734	1	68603,734	111,698	,000
	d18:0-P	145117,305	1	145117,305	114,165	,000
	t18:0-P	234437,896	1	234437,896	128,706	,000
spp11	d18:0	386,403	1	386,403	24,121	,000
	t18:0	8812,545	1	8812,545	14,348	,003
	d18:0-P	465,805	1	465,805	,366	,556
	t18:0-P	11080,495	1	11080,495	6,083	,030
FB1Behandlung * spp11	d18:0	385,366	1	385,366	24,056	,000
	t18:0	8977,386	1	8977,386	14,617	,002
	d18:0-P	465,805	1	465,805	,366	,556
	t18:0-P	9381,304	1	9381,304	5,150	,042
Fehler	d18:0	192,232	12	16,019		
	t18:0	7370,245	12	614,187		
	d18:0-P	15253,485	12	1271,124		
	t18:0-P	21858,051	12	1821,504		
Gesamt	d18:0	5331,694	16			
	t18:0	168957,310	16			
	d18:0-P	306419,706	16			
	t18:0-P	519407,255	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	3115,958	15			
	t18:0	93763,910	15			
	d18:0-P	161302,400	15			
	t18:0-P	276757,746	15			

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	2956,047	3	985,349	50,590	,000
	t18:0	87126,129	3	29042,043	46,282	,000
	d18:0-P	141084,486	3	47028,162	58,617	,000
	t18:0-P	196882,206	3	65627,402	58,573	,000
Konstanter Term	d18:0	2407,657	1	2407,657	123,615	,000
	t18:0	78036,852	1	78036,852	124,362	,000
	d18:0-P	139380,600	1	139380,600	173,727	,000
	t18:0-P	199067,572	1	199067,572	177,669	,000
FB1Behandlung	d18:0	2328,551	1	2328,551	119,554	,000
	t18:0	71170,698	1	71170,698	113,420	,000
	d18:0-P	139380,600	1	139380,600	173,727	,000
	t18:0-P	190954,745	1	190954,745	170,429	,000
spp12	d18:0	311,905	1	311,905	16,014	,002
	t18:0	7874,528	1	7874,528	12,549	,004
	d18:0-P	851,943	1	851,943	1,062	,323
	t18:0-P	3462,046	1	3462,046	3,090	,104
FB1Behandlung * spp12	d18:0	315,591	1	315,591	16,203	,002
	t18:0	8080,904	1	8080,904	12,878	,004
	d18:0-P	851,943	1	851,943	1,062	,323
	t18:0-P	2465,415	1	2465,415	2,200	,164
Fehler	d18:0	233,725	12	19,477		
	t18:0	7529,976	12	627,498		
	d18:0-P	9627,533	12	802,294		
	t18:0-P	13445,251	12	1120,438		
Gesamt	d18:0	5597,429	16			
	t18:0	172692,956	16			
	d18:0-P	290092,619	16			
	t18:0-P	409395,029	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	3189,772	15			
	t18:0	94656,104	15			
	d18:0-P	150712,019	15			
	t18:0-P	210327,457	15			

**SPP1-OE**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
FB1Behandlung	0	8	
	1	8	
SPP1OE	0	8	
	1	8	

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,972	78,397	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,028	78,397	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	34,843	78,397	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	34,843	78,397	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,972	78,166	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,028	78,166	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	34,740	78,166	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	34,740	78,166	4,000	9,000	,000
SPP1OE	Pillai-Spur	,966	64,408	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,034	64,408	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	28,626	64,408	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	28,626	64,408	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * SPP1OE	Pillai-Spur	,966	64,430	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,034	64,430	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	28,635	64,430	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	28,635	64,430	4,000	9,000	,000

**dpl1-1**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
FB1Behandlung	0	8	
	1	8	
dpl11	0	8	
	1	8	

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,977	97,076	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,023	97,076	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	43,145	97,076	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	43,145	97,076	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,977	94,984	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,023	94,984	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	42,215	94,984	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	42,215	94,984	4,000	9,000	,000
dpl11	Pillai-Spur	,958	51,802	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,042	51,802	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	23,023	51,802	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	23,023	51,802	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * dpl11	Pillai-Spur	,957	49,874	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,043	49,874	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	22,166	49,874	4,000	9,000	,000
	Größe charakteristische Wurzel nach Roy	22,166	49,874	4,000	9,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	29475,263	3	9825,088	172,146	,000
	t18:0	770564,941	3	256854,980	60,502	,000
	d18:0-P	110986,751	3	36995,584	46,883	,000
	t18:0-P	104850,023	3	34883,341	35,850	,000
Konstanter Term	d18:0	19263,453	1	19263,453	337,517	,000
	t18:0	528092,698	1	528092,698	124,391	,000
	d18:0-P	56117,233	1	56117,233	71,115	,000
	t18:0-P	47926,519	1	47926,519	49,254	,000
FB1Behandlung	d18:0	19081,388	1	19081,388	334,327	,000
	t18:0	512783,138	1	512783,138	120,785	,000
	d18:0-P	56117,233	1	56117,233	71,115	,000
	t18:0-P	47926,519	1	47926,519	49,254	,000
SPP1OE	d18:0	5193,236	1	5193,236	90,991	,000
	t18:0	128601,537	1	128601,537	30,292	,000
	d18:0-P	27434,759	1	27434,759	34,767	,000
	t18:0-P	28361,752	1	28361,752	29,147	,000
FB1Behandlung * SPP1OE	d18:0	5200,639	1	5200,639	91,121	,000
	t18:0	129180,267	1	129180,267	30,428	,000
Fehler	d18:0-P	27434,759	1	27434,759	34,767	,000
	t18:0-P	28361,752	1	28361,752	29,147	,000
	d18:0	694,888	12	57,074		
	t18:0	50944,919	12	4245,410		
Gesamt	d18:0-P	9469,277	12	789,106		
	t18:0-P	11676,517	12	973,043		
	d18:0	49423,605	16			
	t18:0	1349602,559	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0-P	176573,261	16			
	t18:0-P	164253,060	16			
	d18:0	30160,151	15			
	t18:0	821509,860	15			
	d18:0-P	120456,028	15			
	t18:0-P	116326,541	15			

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	11470,513	3	3823,504	67,901	,000
	t18:0	143300,039	3	47766,680	55,079	,000
	d18:0-P	1127821,42	3	375940,474	69,865	,000
	t18:0-P	780479,105	3	260159,702	58,512	,000
Konstanter Term	d18:0	9607,634	1	9607,634	170,621	,000
	t18:0	150933,150	1	150933,150	174,037	,000
	d18:0-P	724863,583	1	724863,583	134,710	,000
	t18:0-P	539457,281	1	539457,281	121,329	,000
FB1Behandlung	d18:0	9501,878	1	9501,878	168,743	,000
	t18:0	142452,557	1	142452,557	164,259	,000
	d18:0-P	724863,583	1	724863,583	134,710	,000
	t18:0-P	539457,281	1	539457,281	121,329	,000
dpl11	d18:0	979,052	1	979,052	17,387	,001
	t18:0	416,644	1	416,644	480	,501
	d18:0-P	201478,920	1	201478,920	37,443	,000
	t18:0-P	120510,912	1	120510,912	27,104	,000
FB1Behandlung * dpl11	d18:0	989,583	1	989,583	17,574	,001
	t18:0	430,839	1	430,839	497	,494
	d18:0-P	201478,920	1	201478,920	37,443	,000
	t18:0-P	120510,912	1	120510,912	27,104	,000
Fehler	d18:0	675,717	12	56,310		
	t18:0	10406,948	12	867,246		
	d18:0-P	64571,251	12	5380,938		
	t18:0-P	53354,999	12	4446,250		
Gesamt	d18:0	21753,864	16			
	t18:0	304640,137	16			
	d18:0-P	1917256,256	16			
	t18:0-P	1373291,385	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	12146,230	15			
	t18:0	153706,987	15			
	d18:0-P	1192392,673	15			
	t18:0-P	833834,104	15			

**dpt1-2**

**Zwischensubjektfaktoren**

	N
FB1Behandlung	0
	8
1	8
dpl12	0
	8
1	8

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,985	145,802	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,015	145,802	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	64,801	145,802	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	64,801	145,802	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung	Pillai-Spur	,986	154,826	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,014	154,826	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	68,812	154,826	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	68,812	154,826	4,000	9,000	,000
dpl12	Pillai-Spur	,975	88,942	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,025	88,942	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	39,530	88,942	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	39,530	88,942	4,000	9,000	,000
FB1Behandlung * dpl12	Pillai-Spur	,975	87,896	4,000	9,000	,000
	Wilks-Lambda	,025	87,896	4,000	9,000	,000
	Hotelling-Spur	39,065	87,896	4,000	9,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	39,065	87,896	4,000	9,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	13105,315	3	4368,438	49,602	,000
	t18:0	162257,428	3	54085,809	41,030	,000
	d18:0-P	1742174,50	3	580724,833	26,427	,000
	t18:0-P	1242938,53	3	414312,842	37,941	,000
Konstanter Term	d18:0	10613,289	1	10613,289	120,510	,000
	t18:0	167457,285	1	167457,285	127,035	,000
	d18:0-P	1012842,747	1	1012842,747	46,091	,000
	t18:0-P	766415,066	1	766415,066	70,186	,000
FB1Behandlung	d18:0	10470,211	1	10470,211	118,885	,000
	t18:0	158815,150	1	158815,150	120,479	,000
	d18:0-P	1012842,747	1	1012842,747	46,091	,000
	t18:0-P	766415,066	1	766415,066	70,186	,000
dpl12	d18:0	1317,116	1	1317,116	14,955	,002
	t18:0	1691,360	1	1691,360	1,283	,279
	d18:0-P	364665,877	1	364665,877	16,595	,002
	t18:0-P	238261,730	1	238261,730	21,819	,001
FB1Behandlung * dpl12	d18:0	1317,988	1	1317,988	14,965	,002
	t18:0	1750,918	1	1750,918	1,328	,272
	d18:0-P	364665,877	1	364665,877	16,595	,002
	t18:0-P	238261,730	1	238261,730	21,819	,001
Fehler	d18:0	1056,841	12	88,070		
	t18:0	15818,327	12	1318,194		
	d18:0-P	263700,747	12	21975,062		
	t18:0-P	131037,744	12	10919,812		
Gesamt	d18:0	24775,445	16			
	t18:0	345533,041	16			
	d18:0-P	301817,995	16			
	t18:0-P	2140391,336	16			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	14162,156	15			
	t18:0	178075,756	15			
	d18:0-P	2005875,248	15			
	t18:0-P	1373976,270	15			

**Abbildung A12: Allgemeines lineares Modell zu Abbildung 10 C.** Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Daten wurden mittels allgemeinem linearem Modell für die Interaktion der Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ für jede der vier Sphingobasen analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für die Interaktion der Faktoren wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

**Statistik für Abbildung 11A**  
**Univariate Varianzanalyse**

SPHK1-KD

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPHK1KD	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	5881,105	4	1470,276	26,517	,000
Konstanter Term	169,283	1	169,283	3,053	,084
Zeit	2809,750	1	2809,750	50,676	,000
FB1Behandlung	2096,988	1	2096,988	37,821	,000
SPHK1KD	399,396	1	399,396	7,203	,009
FB1Behandlung * SPHK1KD	574,972	1	574,972	10,370	,002
Fehler	5045,553	91	55,446		
Gesamt	14698,179	96			
Korrigierte Gesamtvariation	10926,659	95			

SPHK1-OE

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPHK1OE	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	2326,626	4	581,656	30,158	,000
Konstanter Term	40,951	1	40,951	2,123	,149
Zeit	1285,232	1	1285,232	66,637	,000
FB1Behandlung	940,886	1	940,886	48,784	,000
SPHK1OE	22,016	1	22,016	1,142	,288
FB1Behandlung * SPHK1OE	78,491	1	78,491	4,070	,047
Fehler	1755,113	91	19,287		
Gesamt	6208,791	96			
Korrigierte Gesamtvariation	4081,738	95			

spp1-1

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
spp11	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1207,978	4	301,995	39,320	,000
Konstanter Term	5,564	1	5,564	,724	,397
Zeit	733,321	1	733,321	95,480	,000
FB1Behandlung	471,175	1	471,175	61,348	,000
spp11	3,471	1	3,471	,452	,503
FB1Behandlung * spp11	,012	1	,012	,002	,969
Fehler	698,913	91	7,680		
Gesamt	3472,260	96			
Korrigierte Gesamtvariation	1906,891	95			

spp1-2

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
spp12	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1223,310	4	305,827	37,534	,000
Konstanter Term	2,540	1	2,540	,312	,578
Zeit	723,893	1	723,893	88,842	,000
FB1Behandlung	498,679	1	498,679	61,202	,000
spp12	,470	1	,470	,058	,811
FB1Behandlung * spp12	,267	1	,267	,033	,857
Fehler	741,478	91	8,148		
Gesamt	3624,722	96			
Korrigierte Gesamtvariation	1964,788	95			

SPP1-OE

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPP1OE	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	3885,520	4	971,380	25,694	,000
Konstanter Term	119,409	1	119,409	3,159	,079
Zeit	2130,333	1	2130,333	56,350	,000
FB1Behandlung	1362,887	1	1362,887	36,050	,000
SPP1OE	164,201	1	164,201	4,343	,040
FB1Behandlung * SPP1OE	228,100	1	228,100	6,034	,016
Fehler	3440,292	91	37,805		
Gesamt	10267,996	96			
Korrigierte Gesamtvariation	7325,812	95			



**Statistik für Abbildung 11B  
Allgemeines lineares Modell**

**SPHK1-KD**

**Zwischensubjektfaktore  
n**

		N
SPHK1KD	0	16
	1	16

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,894	54,642	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,106	54,642	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	8,406	54,642	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	8,406	54,642	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,912	67,097	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,088	67,097	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	10,323	67,097	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	10,323	67,097	4,000	26,000	,000
SPHK1KD	Pillai-Spur	,918	72,789	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,082	72,789	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	11,198	72,789	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	11,198	72,789	4,000	26,000	,000

**SPHK1-OE**

**Zwischensubjektfaktore  
n**

		N
SPHK1OE	0	16
	1	16

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,854	37,920	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,146	37,920	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	5,834	37,920	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	5,834	37,920	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,829	31,479	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,171	31,479	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	4,843	31,479	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	4,843	31,479	4,000	26,000	,000
SPHK1OE	Pillai-Spur	,587	9,230	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,413	9,230	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	1,420	9,230	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	1,420	9,230	4,000	26,000	,000

**Tests der Zwischensubjektffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18.0	224667,574	2	112333,787	39,024	,000
	t18.0	83289,554	2	41644,777	48,604	,000
	d18.0-P	1893,506	2	946,753	63,172	,000
t18.0-P	d18.0	5911,443	2	2955,721	38,111	,000
	d18.0	5490,314	1	5490,314	1,907	,178
	t18.0	116747,105	1	116747,105	136,257	,000
Konstanter Term	d18.0-P	8,521	1	8,521	,569	,457
	t18.0-P	7084,471	1	7084,471	91,348	,000
	d18.0	53664,911	1	53664,911	18,643	,000
Zeit	t18.0	1583,542	1	1583,542	1,848	,184
	d18.0-P	1455,186	1	1455,186	97,097	,000
	t18.0-P	37,895	1	37,895	,489	,490
SPHK1KD	d18.0	171002,663	1	171002,663	59,405	,000
	t18.0	81706,012	1	81706,012	95,360	,000
	d18.0-P	438,320	1	438,320	29,247	,000
Fehler	t18.0-P	5873,548	1	5873,548	75,734	,000
	d18.0	83479,501	29	2878,603		
	t18.0	24847,737	29	856,819		
Gesamt	d18.0-P	434,622	29	14,987		
	t18.0-P	2249,096	29	77,555		
	d18.0	536893,105	32			
Korrigierte Gesamtvariation	t18.0	415011,578	32			
	d18.0-P	4992,550	32			
	t18.0-P	26295,364	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18.0	308147,075	31			
	t18.0	108137,291	31			
	d18.0-P	2328,128	31			
t18.0-P	8160,539	31				

**Tests der Zwischensubjektffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18.0	20755,424	2	10377,712	28,781	,000
	t18.0	33186,515	2	16593,258	16,857	,000
	d18.0-P	2565,811	2	1282,905	20,960	,000
t18.0-P	d18.0	38,786	2	19,393	,032	,969
	d18.0	172,328	1	172,328	,478	,495
	t18.0	84834,710	1	84834,710	86,182	,000
Konstanter Term	d18.0-P	3,192	1	3,192	,052	,821
	t18.0-P	13732,266	1	13732,266	22,457	,000
	d18.0	9662,415	1	9662,415	26,797	,000
Zeit	t18.0	2933,363	1	2933,363	2,980	,095
	d18.0-P	2533,594	1	2533,594	41,393	,000
	t18.0-P	37,855	1	37,855	,062	,805
SPHK1OE	d18.0	11093,008	1	11093,008	30,765	,000
	t18.0	30253,152	1	30253,152	30,733	,000
	d18.0-P	32,217	1	32,217	,526	,474
Fehler	t18.0-P	,931	1	,931	,002	,969
	d18.0	10456,583	29	360,572		
	t18.0	28546,759	29	984,371		
Gesamt	d18.0-P	1775,050	29	61,209		
	t18.0-P	17733,306	29	611,493		
	d18.0	60136,724	32			
Korrigierte Gesamtvariation	t18.0	257145,057	32			
	d18.0-P	10460,811	32			
	t18.0-P	65952,858	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18.0	31212,007	31			
	t18.0	61733,274	31			
	d18.0-P	4340,860	31			
t18.0-P	17772,092	31				

spp1-1

Zwischensubjektfa  
kto  
ren

N	
spp11	0 16
	1 16

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,967	188,114	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,033	188,114	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	28,941	188,114	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	28,941	188,114	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,947	116,490	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,053	116,490	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	17,922	116,490	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	17,922	116,490	4,000	26,000	,000
spp11	Pillai-Spur	,869	43,063	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,131	43,063	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	6,625	43,063	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	6,625	43,063	4,000	26,000	,000

spp1-2

Zwischensubjektfa  
kto  
ren

N	
spp12	0 16
	1 16

Multivariate Tests

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,966	184,205	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,034	184,205	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	28,339	184,205	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	28,339	184,205	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,959	151,472	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,041	151,472	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	23,303	151,472	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	23,303	151,472	4,000	26,000	,000
spp12	Pillai-Spur	,897	56,367	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,103	56,367	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	8,672	56,367	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	8,672	56,367	4,000	26,000	,000

Tests der Zwischensubjektffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	757,406	2	378,703	11,700	,000
	t18:0	13606,372	2	6803,186	125,498	,000
	d18:0-P	3466,808	2	1733,404	112,647	,000
	t18:0-P	9642,706	2	4821,353	21,267	,000
Konstanter Term	d18:0	95,691	1	95,691	2,956	,096
	t18:0	30697,510	1	30697,510	566,274	,000
	d18:0-P	8,274	1	8,274	,538	,469
	t18:0-P	46649,880	1	46649,880	205,775	,000
Zeit	d18:0	299,423	1	299,423	9,251	,005
	t18:0	7194,768	1	7194,768	132,721	,000
	d18:0-P	3385,649	1	3385,649	220,020	,000
	t18:0-P	3950,685	1	3950,685	17,427	,000
spp11	d18:0	457,983	1	457,983	14,149	,001
	t18:0	6411,604	1	6411,604	118,274	,000
	d18:0-P	81,158	1	81,158	5,274	,029
	t18:0-P	5692,021	1	5692,021	25,108	,000
Fehler	d18:0	938,663	29	32,368		
	t18:0	1572,080	29	54,210		
	d18:0-P	446,251	29	15,388		
	t18:0-P	6574,386	29	228,703		
Gesamt	d18:0	3575,186	32			
	t18:0	50540,210	32			
	d18:0-P	10565,568	32			
	t18:0-P	102642,387	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	1696,068	31			
	t18:0	15178,451	31			
	d18:0-P	3913,058	31			
	t18:0-P	16217,093	31			

Tests der Zwischensubjektffekte

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	760,618	2	380,309	11,953	,000
	t18:0	13982,713	2	6991,357	123,996	,000
	d18:0-P	4203,560	2	2101,780	116,444	,000
	t18:0-P	8867,040	2	4433,520	20,010	,000
Konstanter Term	d18:0	92,600	1	92,600	2,910	,099
	t18:0	29116,694	1	29116,694	516,403	,000
	d18:0-P	26,658	1	26,658	1,477	,234
	t18:0-P	45386,053	1	45386,053	204,842	,000
Zeit	d18:0	310,378	1	310,378	9,755	,004
	t18:0	6799,436	1	6799,436	120,592	,000
	d18:0-P	4037,510	1	4037,510	223,688	,000
	t18:0-P	3959,472	1	3959,472	17,870	,000
spp12	d18:0	450,240	1	450,240	14,151	,001
	t18:0	7183,277	1	7183,277	127,400	,000
	d18:0-P	166,050	1	166,050	9,200	,005
	t18:0-P	4907,568	1	4907,568	22,149	,000
Fehler	d18:0	922,676	29	31,816		
	t18:0	1635,127	29	56,384		
	d18:0-P	523,442	29	18,050		
	t18:0-P	6425,417	29	221,566		
Gesamt	d18:0	3578,196	32			
	t18:0	49240,747	32			
	d18:0-P	12027,024	32			
	t18:0-P	98576,846	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	1683,294	31			
	t18:0	15617,840	31			
	d18:0-P	4727,002	31			
	t18:0-P	15292,457	31			

**SPP1-OE**

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
SPP1OE	0		16
	1		16

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,827	31,001	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,173	31,001	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	4,769	31,001	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	4,769	31,001	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,880	47,618	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,120	47,618	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	7,326	47,618	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	7,326	47,618	4,000	26,000	,000
SPP1OE	Pillai-Spur	,880	47,786	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,120	47,786	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	7,352	47,786	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	7,352	47,786	4,000	26,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18.0	120129,667	2	60064,834	27,011	,000
	t18.0	306378,471	2	153189,235	26,529	,000
	d18.0-P	1956,371	2	978,186	66,724	,000
	t18.0-P	7287,425	2	3643,713	56,245	,000
Konstanter Term	d18.0	2382,686	1	2382,686	1,072	,309
	t18.0	170482,302	1	170482,302	29,524	,000
	d18.0-P	11,683	1	11,683	,797	,379
	t18.0-P	4543,077	1	4543,077	70,127	,000
Zeit	d18.0	33268,558	1	33268,558	14,961	,001
	t18.0	2742,892	1	2742,892	,475	,496
	d18.0-P	1573,722	1	1573,722	107,347	,000
	t18.0-P	71,603	1	71,603	1,105	,302
SPP1OE	d18.0	86861,109	1	86861,109	39,062	,000
	t18.0	303635,579	1	303635,579	52,584	,000
	d18.0-P	382,650	1	382,650	26,101	,000
	t18.0-P	7215,822	1	7215,822	111,384	,000
Fehler	d18.0	64486,978	29	2223,689		
	t18.0	167454,804	29	5774,304		
	d18.0-P	425,144	29	14,660		
	t18.0-P	1878,716	29	64,783		
Gesamt	d18.0	313836,346	32			
	t18.0	1144841,791	32			
	d18.0-P	5189,740	32			
	t18.0-P	27012,513	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18.0	184616,646	31			
	t18.0	473833,275	31			
	d18.0-P	2381,515	31			
	t18.0-P	9166,141	31			

**Abbildung A13: Univariate Varianzanalyse zu Abbildung 11.** Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Für Zelltodmessungen (Abbildung 11 A) wurden die Daten mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Für SpHINGOBASEN-Spiegel (Abbildung 11 B) wurden die Daten mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für den Faktor oder die Interaktion der Faktoren wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

**Statistik für Abbildung 12A**  
**Univariate Varianzanalyse**

dpl1-1

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
FB1Behandlung	0		48
	1		48
dpl11	0		48
	1		48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	14743,878	4	3685,970	22,655	,000
Konstanter Term	881,308	1	881,308	5,417	,022
Zeit	7968,039	1	7968,039	48,973	,000
FB1Behandlung	2862,868	1	2862,868	17,596	,000
dpl11	1809,187	1	1809,187	11,120	,001
FB1Behandlung * dpl11	2103,784	1	2103,784	12,930	,001
Fehler	14805,969	91	162,703		
Gesamt	37393,605	96			
Korrigierte Gesamtvariation	29549,847	95			

**Zwischensubjektfaktoren**

dpl1-2

		N	
FB1Behandlung	0		48
	1		48
dpl12	0		48
	1		48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	6468,421	4	1617,105	16,514	,000
Konstanter Term	525,060	1	525,060	5,362	,023
Zeit	4697,491	1	4697,491	47,972	,000
FB1Behandlung	841,533	1	841,533	8,594	,004
dpl12	472,700	1	472,700	4,827	,031
FB1Behandlung * dpl12	456,696	1	456,696	4,664	,033
Fehler	8910,935	91	97,922		
Gesamt	19972,416	96			
Korrigierte Gesamtvariation	15379,356	95			

**Statistik für Abbildung 12B  
Allgemeines lineares Modell**

dp11-1

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
dp11	0		16
	1		16

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,768	21,457	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,232	21,457	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	3,301	21,457	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	3,301	21,457	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,712	16,077	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,288	16,077	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	2,473	16,077	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	2,473	16,077	4,000	26,000	,000
dp11	Pillai-Spur	,712	16,042	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,288	16,042	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	2,468	16,042	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	2,468	16,042	4,000	26,000	,000

dp11-2

**Zwischensubjektfaktoren**

		N	
dp12	0		16
	1		16

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,864	41,201	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,136	41,201	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	6,339	41,201	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	6,339	41,201	4,000	26,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,776	22,574	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,224	22,574	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	3,473	22,574	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	3,473	22,574	4,000	26,000	,000
dp12	Pillai-Spur	,688	14,342	4,000	26,000	,000
	Wilks-Lambda	,312	14,342	4,000	26,000	,000
	Hotelling-Spur	2,206	14,342	4,000	26,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	2,206	14,342	4,000	26,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18.0	13214,272	2	6607,136	18,255	,000
	t18.0	29985,703	2	14992,851	15,021	,000
	d18.0-P	405899,249	2	202949,625	39,187	,000
	t18.0-P	7223100,62	2	3611550,308	44,430	,000
Konstanter Term	d18.0	1800,480	1	1800,480	4,975	,034
	t18.0	17150,615	1	17150,615	17,183	,000
	d18.0-P	625,831	1	625,831	,121	,731
	t18.0-P	133746,314	1	133746,314	1,645	,210
Zeit	d18.0	1294,853	1	1294,853	3,578	,069
	t18.0	33,134	1	33,134	,033	,857
	d18.0-P	118531,544	1	118531,544	22,887	,000
	t18.0-P	1666024,204	1	1666024,204	20,496	,000
dp11	d18.0	11919,419	1	11919,419	32,933	,000
	t18.0	29952,569	1	29952,569	30,009	,000
	d18.0-P	287367,706	1	287367,706	55,487	,000
	t18.0-P	5557076,413	1	5557076,413	68,364	,000
Fehler	d18.0	10495,943	29	361,929		
	t18.0	28945,024	29	998,104		
	d18.0-P	150190,279	29	5178,975		
	t18.0-P	2357295,566	29	81286,054		
Gesamt	d18.0	40556,545	32			
	t18.0	118289,023	32			
	d18.0-P	867510,357	32			
	t18.0-P	16238034,31	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18.0	23710,215	31			
	t18.0	58930,727	31			
	d18.0-P	556089,528	31			
	t18.0-P	9580396,183	31			

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18.0	8365,157	2	4182,579	16,848	,000
	t18.0	11139,236	2	5569,618	16,417	,000
	d18.0-P	103506,344	2	51753,172	37,261	,000
	t18.0-P	1441040,26	2	720520,131	40,130	,000
Konstanter Term	d18.0	609,501	1	609,501	2,455	,128
	t18.0	7346,715	1	7346,715	21,656	,000
	d18.0-P	188,799	1	188,799	,136	,715
	t18.0-P	40987,676	1	40987,676	2,283	,142
Zeit	d18.0	1557,177	1	1557,177	6,273	,018
	t18.0	204,134	1	204,134	,602	,444
	d18.0-P	40097,106	1	40097,106	28,869	,000
	t18.0-P	362881,371	1	362881,371	20,211	,000
dp12	d18.0	6807,981	1	6807,981	27,424	,000
	t18.0	10935,102	1	10935,102	32,233	,000
	d18.0-P	63409,238	1	63409,238	45,653	,000
	t18.0-P	1078158,891	1	1078158,891	60,048	,000
Fehler	d18.0	7199,326	29	248,253		
	t18.0	9838,333	29	339,253		
	d18.0-P	40279,052	29	1388,933		
	t18.0-P	520690,180	29	17954,834		
Gesamt	d18.0	26199,828	32			
	t18.0	51651,069	32			
	d18.0-P	218749,616	32			
	t18.0-P	3552454,346	32			
Korrigierte Gesamtvariation	d18.0	15564,484	31			
	t18.0	20977,570	31			
	d18.0-P	143785,396	31			
	t18.0-P	1961730,442	31			

**Abbildung A14: Univariate Varianzanalyse zu Abbildung 12.** Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Für Zeltodmessungen (Abbildung 12 A) wurden die Daten mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) für die Interaktion der festgesetzten Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Für SpHINGOBASEN-Spiegel (Abbildung 12 B) wurden die Daten mittels allgemeinem linearem Modell für den Faktor „Genotyp“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für den Faktor oder die Interaktion der Faktoren wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

**Statistik für Abbildung 14A  
Univariate Variananalyse**

Est + FB<sub>1</sub>

**Zwischensubjektfa  
ctoren**

		N	
Est	0	20	
	1	20	

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1491,078	2	745,539	282,162	,000
Konstanter Term	4,428	1	4,428	1,676	,204
Zeit	1467,368	1	1467,368	555,351	,000
Est	23,710	1	23,710	8,973	,005
Fehler	97,763	37	2,642		
Gesamt	3703,366	40			
Korrigierte Gesamtvariation	1588,840	39			

**Statistik für Abbildung 14C  
Allgemeines lineares Modell**

Est + FB<sub>1</sub>

**Zwischensubjektfa  
ctoren**

		N	
Est	0	11	
	1	11	

**Multivariate Tests**

Effekt		Wert	F	Hypothese df	Fehler df	Sig.
Konstanter Term	Pillai-Spur	,818	17,958	4,000	16,000	,000
	Wilks-Lambda	,182	17,958	4,000	16,000	,000
	Hotelling-Spur	4,489	17,958	4,000	16,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	4,489	17,958	4,000	16,000	,000
Zeit	Pillai-Spur	,892	32,976	4,000	16,000	,000
	Wilks-Lambda	,108	32,976	4,000	16,000	,000
	Hotelling-Spur	8,244	32,976	4,000	16,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	8,244	32,976	4,000	16,000	,000
Est	Pillai-Spur	,884	30,557	4,000	16,000	,000
	Wilks-Lambda	,116	30,557	4,000	16,000	,000
	Hotelling-Spur	7,639	30,557	4,000	16,000	,000
	Größte charakteristische Wurzel nach Roy	7,639	30,557	4,000	16,000	,000

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Quelle	Abhängige Variable	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	d18:0	6146,191	2	3073,096	30,606	,000
	t18:0	19102,002	2	9551,001	25,594	,000
	d18:0-P	3768,517	2	1884,258	67,333	,000
	t18:0-P	3834,304	2	1917,152	58,119	,000
Konstanter Term	d18:0	33,289	1	33,289	,332	,572
	t18:0	12916,830	1	12916,830	34,613	,000
	d18:0-P	10,754	1	10,754	,384	,543
	t18:0-P	765,717	1	765,717	23,213	,000
Zeit	d18:0	4400,251	1	4400,251	43,824	,000
	t18:0	8921,362	1	8921,362	23,907	,000
	d18:0-P	1880,680	1	1880,680	67,205	,000
	t18:0-P	1342,994	1	1342,994	40,713	,000
Est	d18:0	1745,940	1	1745,940	17,388	,001
	t18:0	10180,640	1	10180,640	27,281	,000
	d18:0-P	1887,836	1	1887,836	67,461	,000
	t18:0-P	2491,309	1	2491,309	75,525	,000
Fehler	d18:0	1907,758	19	100,408		
	t18:0	7090,355	19	373,177		
	d18:0-P	531,697	19	27,984		
	t18:0-P	626,746	19	32,987		
Gesamt	d18:0	29004,265	22			
	t18:0	300716,541	22			
	d18:0-P	13499,270	22			
	t18:0-P	30205,264	22			
Korrigierte Gesamtvariation	d18:0	8053,950	21			
	t18:0	26192,357	21			
	d18:0-P	4300,214	21			
	t18:0-P	4461,050	21			

**Abbildung A15: Univariate Variananalyse zu Abbildung 14.** Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Für Zelltodmessungen (Abbildung 14 A) wurden die Daten mittels univariater Variananalyse (ANOVA), für Sphingobasen-Spiegel (Abbildung 14 C) mittels allgemeinem linearem Modell, für den Faktor „Est-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für den Faktor wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

**Statistik für Abbildung A9  
Univariate Varianzanalyse**

SPHK1-KD

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPHK1KD	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	5617,599	4	1404,400	24,219	,000
Konstanter Term	278,562	1	278,562	4,804	,031
Zeit	3740,739	1	3740,739	64,509	,000
FB1Behandlung	843,633	1	843,633	14,549	,000
SPHK1KD	607,910	1	607,910	10,483	,002
FB1Behandlung * SPHK1KD	425,317	1	425,317	7,335	,008
Fehler	5276,864	91	57,988		
Gesamt	15471,752	96			
Korrigierte Gesamtvariation	10894,463	95			

**Zwischensubjektfaktoren**

SPHK1-OE

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPHK1OE	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1375,758	4	343,939	72,912	,000
Konstanter Term	27,620	1	27,620	5,855	,018
Zeit	1228,794	1	1228,794	260,492	,000
FB1Behandlung	123,618	1	123,618	26,206	,000
SPHK1OE	16,077	1	16,077	3,408	,068
FB1Behandlung * SPHK1OE	7,269	1	7,269	1,541	,218
Fehler	429,266	91	4,717		
Gesamt	4014,906	96			
Korrigierte Gesamtvariation	1805,024	95			

spp1-1

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
spp11	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1279,254	4	319,813	90,446	,000
Konstanter Term	29,912	1	29,912	8,459	,005
Zeit	1186,288	1	1186,288	335,492	,000
FB1Behandlung	85,495	1	85,495	24,179	,000
spp11	6,791	1	6,791	1,921	,169
FB1Behandlung * spp11	,679	1	,679	,192	,662
Fehler	321,773	91	3,536		
Gesamt	3680,915	96			
Korrigierte Gesamtvariation	1601,027	95			

spp1-2

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
spp12	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1258,539	4	314,635	88,046	,000
Konstanter Term	17,656	1	17,656	4,941	,029
Zeit	1170,122	1	1170,122	327,442	,000
FB1Behandlung	66,795	1	66,795	18,692	,000
spp12	21,560	1	21,560	6,033	,016
FB1Behandlung * spp12	,062	1	,062	,017	,895
Fehler	325,190	91	3,574		
Gesamt	3853,597	96			
Korrigierte Gesamtvariation	1583,730	95			

SPP1-OE

**Zwischensubjektfaktoren**

N		
FB1Behandlung	0	48
	1	48
SPP1OE	0	48
	1	48

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Zelltod

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	2095,020	4	523,755	37,084	,000
Konstanter Term	82,888	1	82,888	5,869	,017
Zeit	1761,027	1	1761,027	124,687	,000
FB1Behandlung	227,257	1	227,257	16,091	,000
SPP1OE	62,476	1	62,476	4,424	,038
FB1Behandlung * SPP1OE	44,261	1	44,261	3,134	,080
Fehler	1285,241	91	14,124		
Gesamt	5971,475	96			
Korrigierte Gesamtvariation	3380,261	95			

**Abbildung A16: Univariate Varianzanalyse zu Abbildung A9.** Dargestellt ist die Ausgabe der statistischen Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics. Daten wurden mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) für die Interaktion der Faktoren „Genotyp“ und „FB<sub>1</sub>-Behandlung“ mit dem Faktor „Zeit“ als Kovariate analysiert. Signifikanzniveaus < 0,05 für die Interaktion der Faktoren wurden in der entsprechenden Abbildung mit einem Sternchen markiert.

## Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich PD Dr. Frank Waller für die Betreuung meiner Arbeit danken. Mit seiner freundlichen und geduldigen Art war er jederzeit und in allen Belangen auch über die Arbeit hinaus für mich ansprechbar. Die vielen Diskussionen und seine Anregungen haben mir immer wieder neue Impulse gegeben und maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Dirk Becker für die Übernahme des Zweitgutachtens der Arbeit.

Prof. Dr. Martin J. Müller danke ich recht herzlich dafür, dass ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen durfte und für die vielen anregenden Diskussionen.

Bei Dr. Markus Krischke bedanke ich mich besonders für die Einführung in die Metabolitanalyse mittels HPLC-MS/MS und für die technische Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Dr. Agnes Fekete sowie Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser und Dr. Christoph Weiste danke ich für ihr *know-how* und ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Fragestellungen.

Mein großer Dank geht außerdem an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für die angenehme und lockere Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Besonders auch allen, die hier namentlich nicht genannt werden, gilt mein ausdrücklicher Dank. Für den freundschaftlichen Beistand im Büro bedanke ich mich bei Elena Ferber, Stephanie Müller, Manuel Lange, Stefan Schäbler und Benjamin Lambour.

Ein Dank gilt auch den Praktikanten und Studenten, die mich bei der praktischen Arbeit im Labor tatkräftig unterstützt haben und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Dorette Schmalhaus, Carmen Förner, Nicholas Stromer. Ihr wart eine große Hilfe für mich.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung ganz herzlich danken. Rosi und Bernd, danke für Euren kritischen Blick von außen. Ihr wart immer mit Rat und Tat für mich da.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Die Rolle von Sphingobasen in der pflanzlichen Zelltodreaktion“, eigenständig, das heißt insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen beziehungsweise Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den 20. Mai 2019

René Glenz