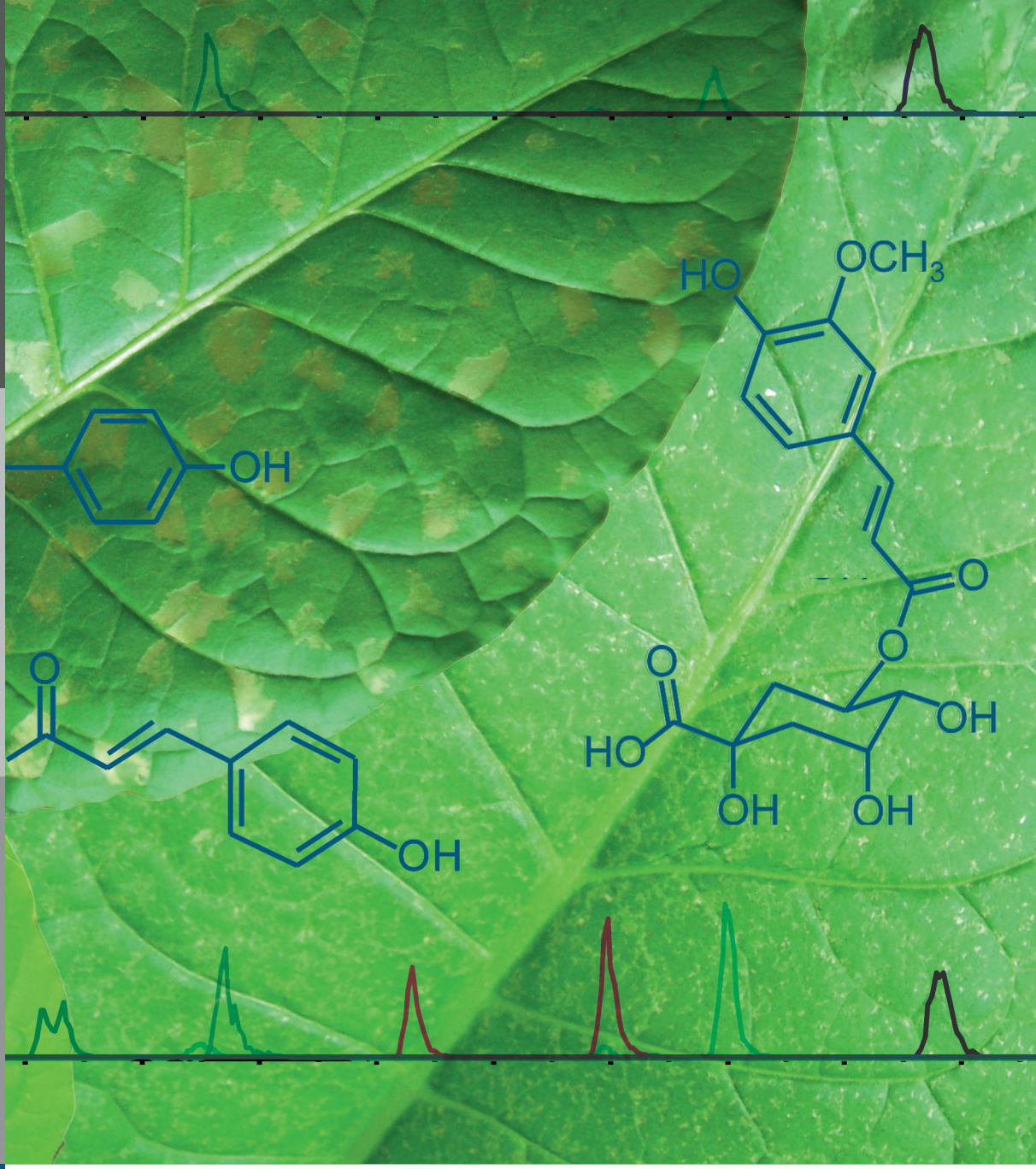


Analytik von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 mittels LC-MS

Imke Koch

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Energie & Umwelt / Energy & Environment Band / Volume 26

Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH)
Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, Phytosphäre (ICG-3)

Analytik von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 mittels LC-MS

Imke Koch

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Energie & Umwelt / Energy & Environment Band / Volume 26

ISSN 1866-1793 ISBN 978-3-89336-553-1

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: http://www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2008

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Energie & Umwelt / Energy & Environment Band / Volume 26

ISSN 1866-1793
ISBN 978-3-89336-553-1

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2008)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter http://www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Zusammenfassung i
Abkürzungsverzeichnis iii
1 Einleitung 1
1.1 Eigenschaften und Vorkommen von Ozon 1
1.2 Wirkung von Ozon auf Pflanzen 2
1.3 Auswirkungen eines akuten Ozonstresses 4
1.4 Induktion der PAL und von phenolischen Sekundärmetaboliten unter einem akuten Ozonstress 5
1.5 Untersuchung der Veränderungen des Metabolitenprofils 6
1.6 Zielsetzung der Arbeit 8
2 Material und Methoden 10
2.1 Chemikalien 10
2.2 Pflanzenmaterial 11
2.3 Ozonbehandlung 11
2.4 Behandlung mit Bakterien und Viren 12
2.4.1 Behandlung mit Bakterien 12
2.4.2 Behandlung mit Tabakmosaikviren 13
2.5 Behandlung mit Paraquat 13
2.6 Probenvorbereitung 13
2.7 HPLC-DAD: Geräte und Parameter 14
2.7.1 Methode für die Auswahl der stationären und mobilen Phase 14
2.7.2 HPLC-Methode für die Entwicklung der Extraktionsmethode: 15
2.8 LC-MS: Geräte und Parameter 16
2.8.1 Chromatographische Trennung 16
2.8.2 EMS-Methode für die Ermittlung der ozoninduzierten Metabolite 17
2.8.3 MRM-Methoden für die relative Quantifizierung von phenolischen Sekundärmetaboliten 18
2.8.4 Fragmentierung der ermittelten ozoninduzierten Metabolite 19
2.9 Messungen der akkuraten Masse 19
2.10 Isomerisierung der 5-FQA und der 5-CQA 19
2.11 Standardadditionsverfahren 20
2.12 Northern Analyse 20
2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial 20
2.12.2 Bestimmung der RNA-Konzentration 20
2.12.3 Denaturierende RNA-Agarosegelelektroporese 21
2.12.4 Northern Blotting 21
2.12.5 Markierung von Sonden 22
2.12.6 Methylenblaufärbung 22
2.12.7 Northern-Hybridisierung und Immunodetektion 22
2.13 TOSC-Assay 23
2.14 Dekonvolution der EMS-Rohdaten 24
2.15 Statistik 24
3 Entwicklung und Optimierung der analytischen Methoden 26
3.1 HPLC-Methode: Vorversuche mit einer HPLC-DAD-Anlage 26
3.1.1 Auswahl der stationären Phase und mobilen Phase 26
3.1.2 Probenvorbereitung 29
3.2 Entwicklung einer HPLC-MS-Methode mit der Ionenfalle im EMS-Modus als Übersichtsscan 31
3.2.1 EMS-Modus 31

3.2.2 Anpassung der Säulendimension und der mobilen Phase an die Anforderungen der massenspektrometrischen Detektion ... 32
3.2.3 HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung ... 34
3.2.4 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion ... 34
3.2.4.1 Optimierung des Declustering Potentials ... 35
3.2.4.2 Optimierung der ESI-Parameter ... 36
3.2.4.3 Optimierung der Bedingungen des Ionentransfers ... 37
3.3 Entwicklung von zwei HPLC-MS/MS-Methoden mit dem Triple Quadrupol im MRM Modus zur relativen Quantifizierung ... 39
3.3.1 MRM-Modus ... 39
3.3.2 Optimierung der substanzspezifischen Parameter im MRM-Modus zur relativen Quantifizierung von Salicylsäureglucosid und Tryptophan ... 41
3.3.3 Optimierung der substanzspezifischen Parameter im MRM-Modus zur relativen Quantifizierung der ozoninduzierten Sekundärmetabolite und der Sekundärmetabolite, die eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen ... 42
3.3.4 Relative Quantifizierung und Matrixeffekte ... 45
3.4 Kenndaten der entwickelten Methoden ... 48
3.4.1 HPLC-Methode ... 48
3.4.2 Vergleich der Mess- und Methodenpräzisionen der EMS- und MRM-Methode ... 48
3.4.3 Validierung der MRM-Methode ... 50
3.5 Optimierung der substanzspezifischen Fragmentierungsparameter für die Strukturaufklärung der phenolischen Metabolite im EPI Scan ... 54
3.6 Probenahme: Wahl des geeigneten Blattalters ... 55
4 Untersuchung der ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetabolite in Tabak ... 59
4.1 Ermittlung von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in Tabak ... 59
4.2 Strukturaufklärung von Metaboliten in Tabak mit LC-MS/MS ... 61
4.2.1 Ozoninduzierte Metabolite ... 63
4.2.1.1 Isomere der Feruloylchinasäure ... 63
4.2.1.2 Isomere der p-Coumaroylchinasäure ... 66
4.2.1.3 Isomere der p-Coumaroylshikimisäure ... 67
4.2.1.4 Salicylsäure und Salicylsäure-β-D-glucopyranosid ... 69
4.2.1.5 Feruloyltyramine ... 69
4.2.2 Metabolite mit einer hohen antioxidativen Kapazität, die aber nicht unter Ozonstress verstärkt gebildet werden ... 71
4.2.2.1 Isomere der Caffeoylchinasäure ... 71
4.2.2.2 Isomere der Dicaffeoylchinasäure ... 72
4.2.3 *E*- und *Z*-Konfiguration der Hydroxyzimtsäurederivate ... 73
4.2.4 Strukturell aufgeklärte Metabolite in Tabak ... 74
4.3 Ozonstress: Zeitlicher Verlauf der Metabolite ... 75
4.4 Bestimmung der antioxidativen Kapazität ... 82
4.5 Vergleich von Ozonstress mit Pathogenstress und oxidativem Stress ... 83
4.5.1 Infektion mit Pathogenen ... 84
4.5.2 Behandlung mit Paraquat ... 85
4.5.3 Expression der basischen ß-1,3-Glucanase ... 87
4.5.4 Vergleich von Ozonstress und Pathogenstress ... 89
4.5.5 Vergleich von Ozonstress mit Paraquat-Stress ... 93
4.5.6 Verhalten der ozoninduzierten Metabolite in Einzelblättern, die einem Pathogenstress oder PQ-Stress ausgesetzt wurden ... 98

5 Einordnung der Ergebnisse in den biologischen Kontext 102
5.1 Induktion von phenolischen Substanzen unter Ozonstress 102
5.2 Die HCA-Isomere kommen in *N. tabacum* L. cv Bel W3 in *E*- und *Z*-Konfiguration vor 104
5.3 Verhalten der ozoninduzierten Metabolite unter einem Ozonstress, Pathogenstress sowie unter einem Paraquatstress 105
5.3.1 Ozonstress 105
5.3.2 Pathogenstress 108
5.3.3 Paraquatstress 109
5.3.4 Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Stressoren 112
5.4 Die ozoninduzierten Metabolite haben unterschiedliche Funktionen 116
5.4.1 Metabolite des Metabolitentyps 1 116
5.4.2 Metabolite des Metabolitentyps 2 116
5.4.3 Metabolite des Metabolitentyps 3 118
5.4.4 Metabolite des Metabolitentyps 4 128
5.5 Metabolite des Metabolitentyps 5 130
6 Literaturverzeichnis 137
Danksagung 152

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche löslichen, phenolischen Sekundärmetabolite unter einem akuten Ozonstress verstärkt oder neu in der ozonsensitiven Tabakvarietät *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 gebildet werden. Allgemein wurde für phenolische Substanzen bisher sowohl eine Rolle in der durch einen akuten Ozonstress hervorgerufenen antioxidativen Abwehr als auch in der ozoninduzierten Pathogenabwehr diskutiert. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte detaillierte Analyse der induzierten Metabolite, sollte eine klarere Definition der möglichen Funktion von löslichen, induzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in der Antwort auf einen Ozonstress erzielt werden.

Für die Ermittlung der ozoninduzierten Metabolite wurden zunächst eine Probenvorbereitung und eine LC-ESI-MS-Methode mit der Ionenfalle im Full Scan für typische Vertreter der phenolischen Substanzen entwickelt. Nach Messungen mit der LC-ESI-MS-Methode wurden, mit Unterstützung des Algorithmus CODA der Software ACD/MS Manager (ACD/Labs, Toronto, Canada), durch vergleichende Analyse der Chromatogramme von ozonbehandelten Proben und den entsprechenden Kontrollproben 25 ozoninduzierte Substanzen ermittelt.

Mit Fragmentierungsreaktionen in der Ionenfalle wurden anschließend 14 ozoninduzierte phenolische Substanzen anhand ihrer Fragmentspektren strukturell aufgeklärt. Eine Absicherung der Strukturaufklärung erfolgte unter anderem durch die Ermittlung der Summenformeln der jeweiligen Sekundärmetabolite anhand der durch FTICR-MS-Messungen ermittelten akkuraten Massen.

Bei zwei der strukturell aufgeklärten Substanzen handelt es sich um Salicylsäure (SA) und Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid (SA-G), deren Induktion unter einem akuten Ozonstress damit bestätigt wurde. Die weiteren strukturell aufgeklärten Metabolite wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals unter einem akuten Ozonstress als induziert beschrieben. Bei diesen Substanzen handelt es sich um *E*-/*Z*-5-Feruloylchinasäure (FQA), *E*-/*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure (CoQA), *E*-/*Z*-5-p-CoQA, *E*-/*Z*-3-p-Comaroylshikimisäure (CoShiA) sowie vier Isomere des Feruloyltyramins (FT).

Für die Durchführung einer relativen Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite wurde eine Multiple Reaction Monitoring- (MRM-) Methode mit einem Triple Quadrupol entwickelt. Mit dieser MRM-Methode wurden zunächst die zeitlichen Verläufe der ozoninduzierten Metabolite 10 h sowie 30 h nach Beginn der Ozonexposition ermittelt. Dabei wurde als einzige Substanz mit einem transienten Verhalten die SA bestimmt, so dass vermutlich keine weiteren phenolischen Substanzen unter einem akuten Ozonstress eine Rolle als Signalsubstanz spielen. Alle anderen ozoninduzierten Metabolite zeigten eine Akkumulation im zeitlichen Verlauf, weswegen diese Substanzen wahrscheinlicher eine Rolle in der Pflanzenabwehr spielen könnten.

Um Hinweise zu erhalten, welcher Pflanzenabwehr die ozoninduzierten Metabolite vermutlich zugeordnet werden können, wurden Blätter von *N. tabacum* L. cv Bel W3 mit einer anderen Art eines oxidativen Stresses durch eine Behandlung mit Paraquat® (PQ) in Konzentrationen von 10 und 100 µM l^{-1} behandelt. Des Weiteren wurde in Blättern von *N. tabacum* L. cv Bel W3 ein Pathogenstress durch eine Infektion mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*) hervorgerufen. Durch eine relative Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite der mit PQ und *Pss* behandelten Blätter sowie der entsprechenden Kontrollen mit der entwickelten MRM-Methode wurde gezeigt, dass alle 25 ozoninduzierten Metabolite auch unter dem Pathogenstress mit *Pss* induziert werden. Unter einem oxidativen Stress, wie er unter der Behandlung mit PQ in einer Konzentration von 10 µM l^{-1} auftritt, wurde dagegen nur einer der ozoninduzierten Metabolite induziert, so dass alle anderen ozoninduzierten Metabolite vermutlich überwiegend der Pathogenabwehr zugeordnet werden können. So könnten z. B. die strukturell aufgeklärten FT-Isomere durch eine Vernetzung mit Lignin zu einer Verstärkung der Zellwand beitragen. Des Weiteren könnten sie zugleich auch antimikrobiell wirksam sein. Die p-CoShiA- und p-CoQA-Isomere sind wichtige Zwischenprodukte der Phenylpropanoidbiosynthese und spielen auch eine wichtige Rolle in der Synthese der Ligninmonomerbausteine. Diese löslichen, phenolischen Sekundärmetabolite könnten somit in der ozoninduzierten Pathogenabwehr zu einer Verstärkung der Zellwände führen. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine Umprogrammierung im Ligninstoffwechsel, sowohl in Folge der Reaktion auf einen akuten Ozonstress als auch in Folge der Reaktion auf einen Pathogenbefall, hin.

Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AOT	Accumulated Dose Over a Threshold of 40 nl l^{-1}
BG	Bestimmungsgrenze
Bl	Blatt
4CL	4-HydroxycinnamoylCoA-Ligase
C3H	p-Coumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CAD	Cinnamoylalkohol-Dehydrogenase
CCoAOMT	CaffeoylCoA-O-Methyltransferase
CCR	CinnamoylCoA-Reduktase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	Kollisionsenergie
cfu	colony forming units
CoA	Coenzym A
CODA®	Component Detection Algorithm®
COMT I	Kaffeat-O-Methyltransferase
CQA	Caffeoylchinasäure
CShiA	Caffeoylshikimisäure
p-CoShiA	p-Coumaroylshikimisäure
p-CoQA	p-Coumaroylchinasäure
cv	Kultivar
CXP	Collision Cell Exit Potential
DAD	Diodenarray-Detektion
diCQA	diCaffeoylchinasäure
DIG	Digoxigenin
DP	Declustering Potential
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
EMS	Enhanced Mass Spectrometry Scan
EP	Eingangspotential
EPI	Enhanced Product Ion Scan
ESI	Elektrosprayionisation
FG	Frischgewicht
FIA	Fließinjektionsanalyse
FQA	Feruloylchinasäure

FT	Feruloyltyramin
FTICR-MS	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie
F5H	Ferulasäure-5-Hydroxylase
G-Einheit	Guajacyl-Einheit
GC	Gaschromatographie
H-Einheit	p-Hydroxyphenyl-Einheit
HCA	Hydroxyzimtsäure-Derivat
HCOOH	Ameisensäure
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCT	Hydroxycinnamoyl-Transferase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	Hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
KMBA	2-Keto-4-methylthiobuttersäure
Kon	Kontrolle
LC-MS	Kopplung von HPLC und MS
LC-ESI-MS	Kopplung von HPLC und MS mit Elektrosprayionisation
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MCQ	Massenchromatogrammqualitäts-Index
ME	Matrixeffekt
MeSA	Methylsalicylsäure
MeOH	Methanol
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Fragmentierung im MS
N_2	Stickstoff
N. tabacum	*Nicotiana tabacum*
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NG	Nachweisgrenze
nb	nicht bestimmbar
NL	Neutral Loss
NMR-Spektroskopie	magnetische Kernresonanzspektroskopie
nn	nicht nachweisbar
$O_2^{\cdot-}$	Superoxidanion
O_3	Ozon
$OH^{\cdot}$	Hydroxylradikal
$OOH^{\cdot}$	Perhydroxylradikal

PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCD	Programmierter Zelltod
PCR	Polymerasekettenreaktion
PQ	Paraquat
PR-Protein	Pathogen assoziiertes Protein
pv	Pathovar
Psj	*Pseudomonas syringae* pv *japonica*
Pss	*Pseudomonas syringae* pv *syringae*
Q	Quadrupol
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Retentionszeit
S-Einheit	Syringyl-Einheit
S/N-Verhältnis	Signal-Rausch-Verhältnis
SA	Salicylsäure
SA-G	Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid
SAD	Sinapylalkohol-Dehydrogenase
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SPE	Festphasenextraktion
Tab.	Tabelle
TIC	Total Ion Chromatogram
THT	Tyramin-HydroxycinnamoylCoA-Transferase
TMV	Tabakmosaikvirus
TOSC	Total Oxidant Scavenging Capacity
TRP	Tryptophan
VK	Variationskoeffizient
XIC	Extracted Ion Chromatogram
Xtc	*Xanthomonas translucens* pv *cerealis*
Xtt	*Xanthomonas translucens* pv *translucens*

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften und Vorkommen von Ozon

Ozon ist ein bläuliches Gas mit einem charakteristischen, süßlichen Geruch, dessen Name sich von dem griechischen Wort ozein (riechen) ableitet. Aufgrund des hohen Redoxpotentials mit + 2,07 eV ist Ozon eines der stärksten bekannten Oxidationsmittel (Iriti & Faoro 2008). Bei einer Aufnahme von Ozon durch einen Organismus weist das Gas in Abhängigkeit von der Dosis eine hohe Toxizität auf, da es zu einem oxidativen Stress auf zellulärer Ebene durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen kann (Rao et al. 2000a). Für Ozon werden die Einheiten nl l^{-1} und µg m^{-3} verwendet, wobei bei 20 °C und 1013 mbar 1 nl l^{-1} ungefähr 2 µg m^{-3} entspricht (Elstner 1984).

In der Atmosphäre kommt das Ozon sowohl in der Stratosphäre als auch in der Troposphäre vor. In der Stratosphäre absorbiert die Ozonschicht schädliche UV-B- und UV-C-Strahlung und schützt somit die Organismen. In der Troposphäre dagegen fungiert Ozon als oxidativ wirksamer Bestandteil des Sommersmogs. Das Ozon ist in der Troposphäre ein sekundärer Luftschadstoff, der nicht direkt emittiert wird, sondern erst durch photochemische Reaktionen in der Atmosphäre gebildet wird. Das Ozon entsteht dabei durch komplexe photochemische Reaktionen der primären, anthropogenen Luftschadstoffe unter Einwirkung von Sonnenlicht. Bei den primären, anthropogenen Luftschadstoffen handelt es sich um Stickstoffoxide (NO_x), Kohlenmonooxid und flüchtige organische Verbindungen (Kley et al. 1999; Iriti & Faoro 2008). Ozon sammelt sich somit insbesondere an sonnigen Tagen in der Troposphäre in Bereichen mit hohen Gehalten an primären Luftschadstoffen an. Unter entsprechenden Wetterbedingungen kann das Ozon in Bereiche mit geringerer Luftverschmutzung, wie beispielsweise in ländliche Gebiete, verlagert werden und dort Schäden an Wild- und Kulturpflanzen hervorrufen (Iriti & Faoro 2008). In diesen ländlichen Gebieten sowie in Vorstädten liegt das Ozon dann häufig in höheren Konzentrationen und über einen längeren Zeitraum vor als in Großstädten. In den ländlichen Gebieten und Vorstädten wird das Ozon viel schlechter abgebaut, da für den Ozonabbau Stickstoffmonoxid erforderlich ist, das in den Städten aufgrund der stärkeren anthropogenen Belastung in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegt (Klumpp et al. 2006). In der 33. Bundes-Immissionsschutz-Verordnung vom 13.7.2004 wurde für Ozon zum Schutz der menschlichen Gesundheit ein

Informationsschwellenwert von 180 µg m^{-3} (90 nl l^{-1}) und ein Alarmschwellenwert von 240 µg m^{-3} (120 nl l^{-1}) als 1-Stunden-Mittelwerte festgelegt. Im Jahr 2007 wurden der Informationsschwellenwert an 13 und der Alarmschwellenwert an einem Tag überschritten (Umweltbundesamt 2007). Dies deutet darauf hin, dass die in den letzten Jahren getroffenen Maßnahmen zu einer erfolgreichen Verringerung des Gehalts an bodennahem Ozon in Deutschland geführt haben. Sowohl in Europa als auch in Nordamerika wurde eine Abnahme der Ozongehalte festgestellt, jedoch kommt es in anderen Regionen der Welt, insbesondere in Asien, zu einer schnellen Zunahme der Ozonkonzentrationen in der Troposphäre (Ashmore 2005). Da bei Pflanzen bereits geringere bodennahe Ozonkonzentrationen zu Schäden führen können als beim Menschen, wurden Zielwerte zum Schutz der Vegetation sowie der Wälder festgelegt. Bei den Zielwerten handelt es sich um kumulative Dosen, bei der die Summe aller 1-Stundenmittelwerte, die oberhalb einer Konzentration von 40 nl l^{-1} über einen Zeitraum von Mai bis Juli (Vegetation) bzw. von April bis September (Wälder) berechnet werden (AOT 40 = accumulated dose over a threshold of 40 nl l^{-1}). Zum Schutz der Vegetation wurde ein AOT 40 von 18000 µg m^{-3} (9000 nl l^{-1}) und zum Schutz der Wälder ein AOT 40 von 20000 µg m^{-3} (10000 nl l^{-1}) festgelegt. Im Jahr 2007 wurde der Zielwert zum Schutz der Vegetation an 16 % und der Zielwert zum Schutz der Wälder an 57 % der Stationen überschritten (Umweltbundesamt 2007). Diese Werte machen deutlich, dass die Abnahme der Ozongehalte in Deutschland noch nicht weit genug fortgeschritten ist.

1.2 Wirkung von Ozon auf Pflanzen

1951 wurden erstmals punktförmige Flecken auf den Blättern von Tabakpflanzen im Connecticut Valley, USA festgestellt. Die Tabakblätter waren für die Herstellung der Deckblätter von Zigarren vorgesehen, so dass sie für diesen Zweck unbrauchbar wurden. Das Auftreten dieser punktförmigen Flecken führte auch noch in den darauf folgenden Jahren zu großen Ernteeinbußen. Als Verursacher für die so genannten „Wetterflecken“ wurden 1959 erhöhte Ozonkonzentrationen ermittelt. In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass es sich bei der Ausbildung der „Wetterflecken“ um ein erbliches Merkmal handelt und somit bestimmte Arten und Varietäten betroffen waren. Für die Zucht von ozontoleranten Pflanzen wurden Züchtungsstudien durchgeführt. Durch einen Vergleich verschiedener Standardvarietäten wurden Pflanzen der Varietät W3 ausgewählt, die eine besonders starke Ausprägung der „Wetterflecken“ zeigten und damit eine hohe Empfindlichkeit gegenüber

Ozon aufwiesen. Des Weiteren wurden für die Zucht ozontoleranter Pflanzen aus der Varietät B Pflanzen mit einer hohen Ozontoleranz ausgewählt. Aus den Nachkommenschaften dieser Pflanzen wurden jeweils die Varietäten *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 (ozonempfindlich) und *N. tabacum* L. cv Bel B (ozontolerant) entwickelt. Das Bel im Namen der Varietäten leitet sich von dem Ort der Studien, Beltsville, ab (Heggestad 1991). *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 entwickelt bereits bei niedrigen Ozonbelastungen (> 60 nl l^{-1}) schwache, jedoch charakteristische Ozonschädigungen in Form von punktförmigen Nekrosen (Klumpp et al. 2004). Aufgrund der hohen Ozonempfindlichkeit wird diese Pflanze auch als biologischer Indikator für erhöhte Ozongehalte in der Troposphäre, die zu einem phytotoxischen Effekt führen, eingesetzt. Eine Anwendung von *N. tabacum* L. cv Bel W3 als Bioindikator findet sowohl in Europa (Klumpp et al. 2006; Laffray et al. 2007; Calatayud et al. 2007) und Nordamerika (Heggestad 1991) als auch in Südamerika (Sant' Anna et al. 2008) statt. Bei der Phytotoxizität von Ozon wird zwischen chronischen und akuten Ozonexpositionen unterschieden, die zu unterschiedlichen Auswirkungen bei den Pflanzen führen (Schraudner et al. 1997). Durch Bioindikatoren werden chronische und akute Auswirkungen eines Ozonstresses sichtbar (Klumpp et al. 2004). Ein chronischer Ozonstress wird hervorgerufen, wenn die Pflanzen über einen längeren Zeitraum einer schwach erhöhten Ozonkonzentration ausgesetzt sind. Ozonempfindliche Pflanzen reagieren darauf mit einer Reduktion der Photosyntheserate, welche wiederum zu einer Verminderung des Wachstums führt. Eine weitere häufige Folge einer chronischen Ozonexposition ist eine frühzeitige Blattseneszenz. Diese Auswirkungen führen direkt zu verminderten Ernteerträgen und können indirekt, durch eine verringerte Toleranz gegenüber Pathogenen und anderen möglichen ökologischen Veränderungen, zu weiteren Ernteeinbußen führen (Schraudner et al. 1997; Heath & Taylor 1997; Kangasjärvi et al. 2005). Bei einem akuten Ozonstress sind die Pflanzen über einen kurzen Zeitraum einer hohen Ozonkonzentration ausgesetzt, wie sie auch in der Natur bei sehr starker Ozonbelastung auftreten kann. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise die ozonsensitive Tabakvarietät L. cv Bel W3 mit einer Ozonkonzentration von 170 nl l^{-1} 5 h lang exponiert. Im Gegensatz zu den schleichenden Auswirkungen des chronischen Ozonstresses führt ein akuter Ozonstress zu schnell sichtbaren Symptomen in Form von punktförmigen Nekrosen auf den Blättern der exponierten Pflanzen. Die Auswirkungen eines akuten Ozonstresses werden im Folgenden näher erläutert.

1.3 Auswirkungen eines akuten Ozonstresses

Das Ozon gelangt über die geöffneten Stomata in den Apoplasten des Blattes. Ein Eintreten des Ozons über die Kutikula ist dagegen vernachlässigbar, da die Kutikula für Ozon eine außerordentlich geringe Permeabilität aufweist (Kerstiens & Lendzian 1989). Im Apoplasten des Blattes wird das Ozon schnell zu reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikalen ($OH^{\cdot}$) und Perhydroxylradikalen ($OOH^{\cdot}$) (Grimes et al. 1983) abgebaut. Entsprechend ist die Ozonkonzentration innerhalb des Blattes während der Ozonexposition bereits fast null (Laisk et al. 1989). Üblicherweise treten keine erheblichen Schäden durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Apoplasten der Pflanze auf, da der Pegel an ROS durch die im Apoplasten enthaltenen Antioxidantien unter einem kritischen Grenzwert gehalten wird. Wenn jedoch unter einem akuten Ozonstress aufgrund des starken Zustroms an Ozon und dem damit verbundenen erhöhten ROS-Spiegel die Kapazität der Antioxidantien überschritten wird, kann es zu einer Störung des zellulären Redoxgleichgewichts kommen, wodurch ein oxidativer Stress in der Pflanze ausgelöst wird (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005). Der oxidative Stress kann, insbesondere durch die hochreaktiven $OH^{\cdot}$, zu einer Schädigung der Membranlipide durch Lipidperoxidation sowie zu einer Schädigung der Nukleinsäuren, Proteine und der Chlorophylle führen (Iriti & Faoro 2008). Des Weiteren werden durch das eindringende Ozon und den damit einhergehenden erhöhten ROS-Spiegel in ozonsensitiven Pflanzen vermutlich Signalkaskaden induziert, wie sie normalerweise bei der Wahrnehmung eines avirulenten Pathogens von der Pflanze als Pathogenabwehr hervorgerufen werden. Ein avirulentes Pathogen in einer inkompatiblen Interaktion infiziert zwar die Pflanze, jedoch wird das Pathogen vor der Ausprägung von Symptomen durch Pathogenabwehrreaktionen im Wachstum gehemmt oder abgetötet. Typische Pathogenabwehrreaktionen sind dabei z. B. die Bildung von Pathogenabwehr assoziierten (PR) Proteinen und die Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion (HR). Solche Reaktionen werden auch unter einem akuten Ozonstress bei ozonempfindlichen Pflanzen ausgelöst (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005). Die ozonbedingte HR wird unter anderem mit der Ausbildung eines oxidativen Bursts mit einem biphasischen Verlauf im Apoplasten assoziiert. Der oxidative Burst führt zu einer Akkumulation von ROS im Apoplasten, bei denen es sich in *Nicotiana* um H_2O_2 handelt, wohingegen z. B. in *Arabidopsis* (Ackerschmalwand) eine Akkumulation von $O_2^{\cdot-}$ sowie H_2O_2 erfolgt (Wohlgemuth et al. 2002). Die erste Phase des oxidativen Bursts erfolgt während der Ozonexposition mit einem Peakmaximum 2-3 h nach Beginn der Ozonexposition.

Die zweite Phase des oxidativen Bursts äußert sich in einer stärker und länger andauernden Akkumulation, die üblicherweise erst nach Beendigung der Ozonbehandlung beginnt und ein Peakmaximum 5-10 h nach Beendigung der Ozonbehandlung aufweist (Schraudner et al. 1998). Die zweite Phase des oxidativen Bursts ist dabei ein unerlässlicher Faktor für die Ausbildung eines programmierten Zelltods (PCD) in der HR, an der außerdem die Phytohormone SA und Ethylen beteiligt sind. Im PCD wird ein kontrolliertes Absterben von zueinander benachbarten Zellen eingeleitet, wodurch die Ausbildung der typischen punktförmigen Nekrosen unter einem akuten Ozonstress erfolgt. Ein übermäßig starkes Ausbreiten des PCDs wird durch die Induktion der Jasmonsäure (JA) verhindert, die dem Prozess als Antagonist entgegenwirkt (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005).

1.4 Induktion der PAL und von phenolischen Sekundärmetaboliten unter einem akuten Ozonstress

Neben der Induktion der HR und der Bildung von PR Proteinen wird in ozonsensitiven Pflanzen unter einem akuten Ozonstress auch das Eingangsenzym der Phenylpropanoidbiosynthese, die Phenylalaninammoniumlyase (PAL), auf der Ebene der Transkription sowie der Translation induziert (Langebartels et al. 2002). Die PAL katalysiert die Bildung der Zimtsäure aus L-Phenylalanin, aus der sich in der Phenylpropanoidbiosynthese viele der Polyphenole ableiten. Bei den Polyphenolen handelt es sich um sekundäre Metabolite, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind, wobei die vorkommenden Verbindungen und deren Gehalte in Pflanzen verschiedener Familien und Varietäten stark variieren können (Dixon et al. 2002). Anhand ihrer Struktur werden die Polyphenole in Klassen unterteilt, wie beispielsweise die Klasse der Phenolcarbonsäuren, der Hydroxyzimtsäurederivate (HCA), der Flavonoide und der Lignine. In der Pflanze spielen die phenolischen Sekundärmetabolite in der Reaktion auf eine sich verändernde biotische oder abiotische Umwelt eine wichtige Rolle in der Verteidigung sowie in der morphologischen und biochemischen Anpassung der Pflanze (Boudet 2007). In einer Studie von Pasqualini et al. (2003) wurde auch nach einer akuten Ozonexposition von *N. tabacum* L. cv Bel W3, aufgrund der erhöhten Aktivität der PAL, eine signifikante Erhöhung des Gesamtphenolgehalts in den behandelten Blättern gegenüber den Kontrollblättern ermittelt. Des Weiteren wurden auch signifikant erhöhte Gehalte an phenolischen Sekundärmetaboliten nach einem akuten Ozonstress in den Blättern von Sojabohnen (*Glycine max*)

(Booker & Miller 1998) und in den Blättern einer ozonempfindlichen Varietät des weißen Klees (*Trifolium repens*) (Severino et al. 2007; Francini et al. 2007) ermittelt. Die Funktion der induzierten Metabolite bleibt jedoch unklar. Sie können sowohl eine Rolle in der antioxidativen Abwehr als auch in der unter einem Ozonstress induzierten Pathogenabwehr in der Pflanze spielen (Langebartels et al. 2002). In der antioxidativen Abwehr könnten Substanzen mit einer hohen antioxidativen Kapazität als Radikalfänger fungieren und damit die unter einem Ozonstress gebildeten ROS abfangen (Grace & Logan 2000). In der Pathogenabwehr könnten die ozoninduzierten phenolischen Substanzen als Phytoalexine fungieren oder auch in die Ligninbiosynthese und damit in die Verstärkung der Zellwände involviert sein (Kangasjärvi et al. 1994; Sandermann et al. 1998). Viele Polyphenole könnten prinzipiell beide Funktionen erfüllen, ihre spezifische Funktion ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt. In *N. tabacum* L. cv Bel W3 wurden bisher SA und Salicylsäureglucosid (SA-G) als induzierte phenolische Metabolite unter einem akuten Ozonstress ermittelt (Pasqualini et al. 2002; Janzik et al. 2005). Bei beiden Substanzen handelt es sich um Metabolite, die auch unter einem Pathogenstress in der Pflanze gebildet werden, wobei die SA als Signalsubstanz in der HR fungiert. Beide Metabolite sind somit unter einem akuten Ozonstress vermutlich aufgrund der Pathogenabwehr induziert. Weitere lösliche ozoninduzierte Metabolite sind in *N. tabacum* L. cv Bel W3 bisher noch nicht bekannt.

1.5 Untersuchung der Veränderungen des Metabolitenprofils

Die Primär- und Sekundärmetabolite sind die Produkte zellulärer Regulationsprozesse. Veränderungen dieser Metabolite sind damit die letzte Reaktion eines biologischen Systems auf Umwelteinflüsse, wie beispielsweise einen akuten Ozonstress, oder genetische Veränderungen. Diese Reaktion des biologischen Systems kann durch die Untersuchung der Veränderungen des Metabolitenprofils im biologischen System untersucht werden (Fiehn 2002). Ziel dieser Untersuchungen ist es, ein besseres Verständnis der molekularen Biochemie des zu untersuchenden Systems zu erhalten (Seger & Sturm 2007).

Dabei wird zwischen verschiedenen Vorgehensweisen unterschieden. Bei den *Metabolomics*-Untersuchungen ist das Ziel, die Gesamtheit aller enthaltenen Metabolite eines biologischen Systems, das Metabolom, zu ermitteln und zu quantifizieren. (Dunn & Ellis 2005). Ein weiterer Ansatz ist das *Metabolite Profiling*. Bei diesem Ansatz wird die Veränderung des

Metabolitenprofils bezüglich solcher Substanzen untersucht, die sich von einem bestimmten Stoffwechsel ableiten oder einer bestimmten Substanzklasse angehören (Fiehn 2002). Ziel dieser Untersuchungen ist es, ein besseres Verständnis über die Ursachen der verstärkten Bildung einzelner Substanzen unter einer Veränderung der Umwelt oder genetischer Veränderungen zu erhalten (Dunn et al. 2005). Im *Metabolite Profiling* kann nach der Ermittlung von Metaboliten, die aufgrund einer Veränderung verstärkt oder neu gebildet werden, sowohl eine Identifizierung als auch eine relative Quantifizierung dieser Metabolite erfolgen. Dabei wird eine relative Quantifizierung durchgeführt, da die Ermittlung von signifikanten Unterschieden der Peakflächen der einzelnen Metabolite in den behandelten Proben gegenüber den entsprechenden Kontrollen der wichtigste Ansatz dieser Untersuchung ist. Eine absolute Quantifizierung ist damit nicht unbedingt erforderlich (Fernie et al. 2004). Im *Metabolite Profiling* wird üblicherweise eine Probenvorbereitung ohne aufwändige Aufreinigungsschritte durchgeführt. Nach der Probenvorbereitung erfolgt eine chromatographische Trennung der Substanzen, bei deren anschließender Detektion am häufigsten ein Massenspektrometer (MS) angewendet wird (Dunn et al. 2005). Die chromatographische Trennung kann dabei sowohl mittels HPLC als auch GC erfolgen. Aufgrund der Massenselektivität des MS ist eine Detektion von co-eluierenden Substanzen unterschiedlicher Masse möglich, so dass die Ermittlung einer großen Anzahl von Metaboliten in einer komplexen Probe nach einer chromatographischen Trennung und anschließender MS-Detektion möglich ist (Villas-Boas et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit kann somit das *Metabolite Profiling* für die Ermittlung, Identifizierung und relative Quantifizierung der unter einem akuten Ozonstress induzierten phenolischen Substanzen angewendet werden. Für die chromatographische Trennung und anschließende Detektion dieser Metabolite ist die LC-MS-Analytik die Methode der Wahl (de Rijke et al. 2006). Bei den Polyphenolen handelt es sich um polare, nicht flüchtige sowie thermisch instabile Substanzen (Sanchez-Rabaneda et al. 2004). Bei einer GC-MS-Analyse wäre somit eine Derivatisierung der phenolischen Substanzen erforderlich. Durch die Derivatisierung können aus einem Metaboliten mehrere Derivate entstehen, wodurch die anschließende Ermittlung von ozoninduzierten Metaboliten erschwert wird (de Rijke et al. 2006). Des Weiteren werden aufgrund der Derivatisierung komplexere Fragmentspektren erhalten, wodurch auch die strukturelle Aufklärung der ozoninduzierten Metabolite erschwert sein kann (Villas-Boas et al. 2005).

Für die Ermittlung der ozoninduzierten phenolischen Substanzen ist dagegen die LC-MS-Analytik mit Elektrosprayionisation (ESI) sehr gut geeignet. Der ESI-Prozess ist sehr schonend. Die während des Ionisierungsprozesses gebildeten Ionen weisen nur geringe innere Energien auf, so dass eine Ionisierung der intakten Moleküle ohne Fragmentierung möglich ist (Parejo et al. 2004; Stobiecki et al. 2006). Für die Analytik von phenolischen Substanzen wird die LC-ESI-MS daher häufig angewendet (Parejo et al. 2004; Sanchez-Rabaneda et al. 2004; Papagiannopoulos et al. 2004; Clifford et al. 2007). Durch gezielte Fragmentierungsreaktionen können Metabolite mit LC-ESI-MS/MS strukturell aufgeklärt werden bzw. deren Identität bestätigt werden (Villas-Boas et al. 2005). Mit der LC-ESI-MS/MS-Technik im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus ist der Nachweis von Analyten in geringen Konzentrationen in einer komplexen Matrix möglich, da dieser Modus eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität aufweist (Hernando et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die schädigende Wirkung von Ozon bei akuter oder chronischer Exposition ist seit über 50 Jahren bekannt. Allerdings sind viele der biochemischen Reaktionen von ozonsensitiven Pflanzen auf einen Ozonstress noch nicht vollständig geklärt und daher immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Severino et al. 2007; Francini et al. 2007). Unter einem akuten Ozonstress führt die verstärkte Aktivität der PAL auf der Ebene der Transkripte sowie der Enzyme zu einem erhöhten Gehalt an phenolischen Sekundärmetaboliten in den Blättern der ozonbehandelten Pflanzen gegenüber den entsprechenden Kontrollen (Pasqualini et al. 2003; Janzik et al. 2005). Bisher sind jedoch nur wenige dieser ozoninduzierten Substanzen bekannt. Des Weiteren ist es bisher noch nicht gekärt, ob die phenolischen Substanzen unter einem akuten Ozonstress eine Rolle in der antioxidativen Abwehr (Grace & Logan 2000) oder in der ozoninduzierten Pathogenabwehr (Kangasjärvi et al. 1994; Langebartels et al. 2002) spielen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher das *Metabolite Profiling* angewandt werden, um ein besseres Verständnis über die möglichen Funktionen der phenolischen Substanzen aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel zu erhalten, die unter einem akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls in den ozonempfindlichen Tabakpflanzen der Varietät L cv. Bel W3 verstärkt oder neu gebildet werden. Für diese Untersuchungen sollte zunächst eine Probenvorbereitung

entwickelt sowie das geeignete Blattalter für die LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Untersuchungen festgelegt werden. Für die Ermittlung der löslichen, ozoninduzierten phenolischen Metabolite in den ozonbehandelten Blättern von *N. tabacum* L. cv Bel W3 sollte danach eine LC-ESI-MS-Methode mit der Ionenfalle entwickelt und optimiert werden. Anschließend sollten möglichst viele der ozoninduzierten Metabolite durch Fragmentierungsreaktionen durch LC-ESI-MS/MS-Untersuchungen mit der Ionenfalle strukturell aufgeklärt werden. Anhand der Strukturen der aufgeklärten Substanzen könnten wichtige Rückschlüsse auf ihre möglichen Funktionen gezogen werden. Des Weiteren sollte in Abhängigkeit von der Zeit eine relative Quantifizierung der ozoninduzierten, phenolischen Substanzen in den Blättern der ozonbehandelten Pflanzen im Vergleich zu den Blättern der Kontrollpflanzen durchgeführt werden. Dafür sollte eine LC-ESI-MS/MS-Methode mit dem Triple Quadrupol im *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Modus (MRM-Methode) entwickelt werden. Mit der MRM-Methode sollte das Verhalten der ozoninduzierten Metabolite im zeitlichen Verlauf, 10 h und 30 h nach Behandlungsbeginn, in den ozonbehandelten Proben im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen untersucht werden. Das Verhalten der Metabolite könnte Hinweise darauf geben, ob es sich bei dem jeweiligen Metaboliten wahrscheinlicher um eine Abwehrsubstanz oder eine Signalsubstanz handelt. Um Hinweise zu erhalten, ob die ozoninduzierten Substanzen wahrscheinlicher eine Rolle in der antioxidativen Abwehr oder in der ozoninduzierten Pathogenabwehr spielen, sollten Tabakpflanzen der Varietät L. cv Bel W3 einem anderen oxidativen Stressor als Ozon sowie einem Pathogenstress ausgesetzt werden. Mit der entwickelten MRM-Methode sollte anschließend ermittelt werden, welche der ozoninduzierten Metabolite auch unter einem anderen oxidativen Stressor als Ozon oder einem Pathogenstress im Vergleich zu den jeweils entsprechenden Kontrollen induziert werden.

Die so erzielten Ergebnisse sollten das Wissen um die Art der ozoninduzierten, löslichen phenolischen Metabolite signifikant erweitern und zu einem Verständnis ihrer Funktion im pflanzlichen Metabolismus beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

TABELLE 2.1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acetonitril, LC-MS-Qualität	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Agarose	Bio-Rad, München
Ameisensäure für die Massenspektrometrie	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
5-Caffeoylchinasäure	Sigma, Taufkirchen
Catechin	Sigma, Taufkirchen
CDP-Star®	Roche Diagnostics, Karlsruhe
Chinasäure	Sigma, Taufkirchen
p-Coumarsäure	Sigma, Taufkirchen
DIG Easy Hyb	Roche Diagnostics, Karlsruhe
DIG Wash und Block Puffer Set	Roche Diagnostics, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Ferulasäure	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	KMF Laborchemie Handels GmbH, Leipzig
Formamid	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Sigma, Taufkirchen
Methanol, LC-MS-Qualität	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Methylenblau	SERVA, Heidelberg
3-Methylsalicylsäure	Acros Organics, Geel, Belgien
3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Rutin	Sigma, Taufkirchen
Shikimisäure	Sigma, Taufkirchen
Siliciumcarbid, 300 mesh	Sigma, Taufkirchen
SSC 20 x	Eppendorf, Hamburg
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe

L-Tryptophan	Sigma, Taufkirchen
L-Tyrosin	Sigma, Taufkirchen
Wasser, deionisiert	Hergestellt mit Milli Q Anlage (Millipore Ltd., Watford, GB)
Wasserstoffperoxidlösung (3 %)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Leipzig
Xylen Cyanol FF	Bio-Rad, München

Salicylsäureglucosid wurde von Prof. Dr. H. Kneifel, Jülich nach der Synthesevorschrift von Grynkiewicz et al. (1993) hergestellt. Die *Z*-Isomere der Hydroxyzimtsäurederivate wurden durch Exposition mit UV-Licht aus den entsprechenden *E*-Isomeren erhalten. Die Bildung der 4- und 3-Caffeoylchinasäure (CQA) aus einem 5-CQA-Standard durch Isomerisierung in einer wässrigen Natriumcarbonatlösung wird in Kap. 2.10 vorgestellt.

2.2 Pflanzenmaterial

Für alle Experimente wurde der Virginische Tabak *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3, der der Familie der *Solanaceaen* angehört, verwendet. Die Samen wurden von der LAP Forchheim, Rheinstetten bezogen.

Die Anzucht der Tabakpflanzen erfolgte in einem Anzuchtraum bei einer Temperatur von 25 °C, einer relativen Luftfeuchte von 40 % und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus (8.00-20.00 Uhr Licht mit einer Intensität von 250-300 µmol m^{-2} s^{-1}). Die Samen wurden auf Einheitserde® ED 73 (Ferdinand Irnich GmbH und Co. KG, Jülich) ausgesät, nach zwei Wochen wurden die Pflanzen pikiert und zwei Wochen später wurden die Einzelpflanzen in Töpfe mit einer Größe von 11x11x12 cm umgetopft. Die Pflanzen wurden täglich mit deionisiertem Wasser von unten gegossen. Die im Folgenden vorgestellten Behandlungen der Tabakpflanzen erfolgten etwa acht Wochen nach Aussaat.

2.3 Ozonbehandlung

Für die Ozonexpositionsexperimente wurden die acht Wochen alten Tabakpflanzen in Ozonexpositionskammern mit einem Gesamtvolumen von 630 l überführt. Der Luftstrom wurde in den Kammern auf 30 l min^{-1} eingestellt. Die Erzeugung des Ozons erfolgte in einer Glaszelle durch die Photolyse von Sauerstoff unter UV-Licht (Double Bore Lamp, Jelight Company, CA, USA). Während der Ozonexposition wurde der in die Kammer einströmende

Luftstrom vor dem Eintritt in die Kammer mit dem vom Ozongenerator kommenden Luftstrom, der das Ozon enthält, vermischt. Die Ozonkonzentration in der Kammer wurde dabei konstant gehalten, indem die Ozonkonzentration durch einen Ozonanalysator (Ozone Monitor 450, Advanced Pollution Instrumentation, San Diego, USA) bestimmt wurde. Die Parameter der Temperatur, der Lichtbedingungen sowie der relativen Luftfeuchte in der Ozonexpositionskammer wiesen vergleichbare Werte wie im Anzuchtraum auf.

Die Tabakpflanzen wurden einer fünfstündigen Ozonexposition bei einer Ozonkonzentration von durchschnittlich 150 nl l^{-1} ausgesetzt (9.00-14.00 Uhr) und anschließend im Anzuchtraum weiterkultiviert. Eine Ernte der Blätter 4 der ozonbehandelten Pflanzen sowie der unter denselben Bedingungen angezogenen Kontrollpflanzen erfolgte 10 h bzw. 30 h nach Behandlungsbeginn. Bei einer Versuchsreihe wurden zusätzlich zu den Blättern 4 auch die Blätter 3 und 5 geerntet. Festgelegt als Blatt 1 wurde jeweils das erste, vom Sprossscheitel aus gezählte, Blatt, das von der Blattspitze bis zum Blattgrund länger als 8 cm ist. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Poolproben, bestehend aus acht Blättern 4 von ozonbehandelten Pflanzen sowie den entsprechenden Kontrollpoolproben, und Einzelblattproben geerntet.

2.4 Behandlung mit Bakterien und Viren

2.4.1 Behandlung mit Bakterien

Stammkulturen von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig erhalten.

Zur Vermehrung der Bakterien wurde ein DSMZ-Medium 54 (20 g Glucose, 10 g Hefeextrakt in 1 l deionisiertem Wasser) mit den entsprechenden Bakterien angeimpft und anschließend bei einer Temperatur von 28 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) zwischen 0,6 und 0,8 in einem Schüttler kultiviert. Für die bakterielle Infiltration wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet zweimal mit 100 mM $MgCl_2$ gewaschen und in 100 mM $MgCl_2$ resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Bakteriensuspension mit 100 mM $MgCl_2$ bis zum Erreichen der Konzentration von 1 x 10^7 *colony forming units* (cfu) ml^{-1}. Eine Infiltration der Bakteriensuspension in die

Blätter 4 der acht Wochen alten Tabakpflanzen erfolgte mit einer Kunststoffspritze (V=1 ml) ohne Nadel. Bei den Kontrollpflanzen wurde auf die gleiche Weise eine Mock-Infiltration mit $MgCl_2$ durchgeführt. Die Infiltration der Blätter erfolgte um 9.00 Uhr und eine Ernte der Blätter erfolgte 30 h später.

2.4.2 Behandlung mit Tabakmosaikviren

Eine Stammlösung von Tabakmosaikvirus (TMV) mit einer Konzentration an TMV-Hüllprotein von 9,5 mg ml^{-1} in Phosphatpuffer (pH 7) wurde von Prof. Dr. U. Conrath, Aachen zur Verfügung gestellt.

Für die Behandlung der acht Wochen alten Tabakblätter mit TMV wurde die Stammlösung 1:100 mit Phosphatpuffer verdünnt (=Infektionslösung). Auf die Blätter 4 wurde auf die Oberseite Siliciumcarbid gestreut. Anschließend wurde ein Wattebausch mit 5 ml der Infektionslösung getränkt und damit sanft über das Blatt gestrichen. Nach 20 min wurde das Blatt mit Leitungswasser abgewaschen und im Anzuchtraum bis zur Ernte weiter kultiviert. Die Kontrollblätter 4 wurden anstelle der Infektionslösung mit dem reinen Phosphatpuffer auf die gleiche Weise behandelt wie die mit TMV behandelten Blätter. Die Behandlung wurde um 9.00 Uhr begonnen und eine Ernte der Blätter erfolgte, nach Ausbildung von Symptomen, 1 Woche nach Behandlungsbeginn.

2.5 Behandlung mit Paraquat

Eine Behandlung mit Paraquat® (Methylviologen) erfolgte in Konzentrationen von 10 µM l^{-1} und 100 µM l^{-1}. Das Paraquat (PQ) wurde dafür in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend in den entsprechenden Konzentrationen auf die Ober- und Unterseite der Blätter 4 der acht Wochen alten Tabakpflanzen gesprüht. Die Blätter 4 der Kontrollpflanzen wurden anstelle der PQ-Lösung mit deionisiertem Wasser besprüht. Die Behandlung der Pflanzen erfolgte um 9.00 Uhr und eine Ernte der Blätter 4 erfolgte 30 h nach Behandlungsbeginn.

2.6 Probenvorbereitung

Nach der Ernte der Blätter wurden diese direkt in flüssigem Stickstoff (N_2) eingefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C gelagert. Das Zerkleinern der Blattproben erfolgte in

einem Mörser unter flüssigem N_2. Die Blattproben wurden dabei so lange unter flüssigem N_2 gemörsert bis die Proben eine möglichst kleine Partikelgröße sowie eine homogene Partikelgrößenverteilung aufwiesen. Die Aufbewahrung der pulverisierten Proben erfolgte bei -80 °C. Für die Extraktion des Pflanzenmaterials wurden 200 mg des gefrorenen Probenmaterials mit 100 mg gereinigtem Seesand in einem gekühlten Mörser (T=4 °C) mit 1,2 ml eines gekühlten (T=4 °C) Extraktionslösungsmittels (60 % MeOH mit 0,1 % Ameisensäure und 20 µg 100 ml^{-1} des internen Standards 3-Methylsalicylsäure) für die Dauer von 2 min kräftig gemörsert. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde der Mörser mit 0,8 ml Extraktionslösungsmittel gespült. Nach Vereinigung der beiden Lösungen wurde der Extrakt bei einer Temperatur von 4 °C und einer Umdrehung von 14000 rpm für die Dauer von 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5417 C, Standardrotor F 45-30-11, Eppendorf, Hamburg). Der Extrakt wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter mit GHP-Membran und einer Porengröße von 0,45 µm (Pall Acrodisc, VWR, Darmstadt) filtriert und anschließend mit dem Extraktionslösungsmittel in einem Messkolben auf 2,0 ml aufgefüllt. Für die HPLC- und LC-MS-Untersuchungen wurden die Proben vor der Analyse 1:1 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

2.7 HPLC-DAD: Geräte und Parameter

2.7.1 Methode für die Auswahl der stationären und mobilen Phase

Für die Auswahl der stationären und mobilen Phase wurde eine HPLC-DAD-Anlage von Waters, Eschborn verwendet (Tab. 2.2).

TABELLE 2.2: Geräteteile der HPLC-DAD-Anlage von Waters, Eschborn:

Pumpe	2225 Binary Gradient Module
Autosampler	2767 Sample Manager
Detektor	2996 Diode Array Detector
Software	MassLynx

In der vorliegenden Arbeit wurden Säulen bezüglich ihrer chromatographischen Trenneigenschaften von phenolischen Substanzen untersucht. Alle Säulen wiesen eine Länge von 150 mm und einen Durchmesser von 4,6 mm auf. Die Säulen Prontosil C18 H, Prontosil C18 SH, Prontosil C8 SH sowie Prontosil C18 ace EPS (Bischoff Chromatographiservice,

Leonberg) hatten alle eine Partikelgröße von 3µm. Die Säule Monochrom 5 µ MS (Varian, Darmstadt) wies eine Partikelgröße von 5 µm auf. Als mobile Phasen wurde als Eluent A Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (HCOOH) verwendet. Als Eluent B wurden sowohl Acetonitril mit 0,1 % HCOOH als auch Methanol mit 0,1 % HCOOH bezüglich ihrer Eignung für die Trennung der phenolischen Substanzen untersucht. In Tabelle 2.3 sind weitere Parameter der chromatographischen Trennung für die Auswahl der stationären und mobilen Phase aufgeführt.

TABELLE 2.3: Weitere Parameter der HPLC-Methode für die Auswahl der stationären und mobilen Phase

Injektionsvolumen	40 µl
Wellenlängen	190-400 nm, 279 nm, 320 nm
Flussrate	1,5 ml min^{-1}
Gradient	0 min 5 % B; 4 min 5 % B; 24 min 95 % B; 30 min 95 % B; 31 min 5 % B; 35 min 5 % B.

2.7.2 HPLC-Methode für die Entwicklung der Extraktionsmethode:

Für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde eine HPLC-DAD-Anlage von Merck-Hitachi, Darmstadt verwendet. Die Geräteteile der Merck-Hitachi-Anlage sowie die Parameter der entwickelten HPLC-Methode sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

TABELLE 2.4: Geräteteile der HPLC-DAD-Anlage von Merck-Hitachi, Darmstadt und Parameter der entwickelten HPLC-Methode

Interface	D-6000 Interface
Pumpe	L-6220 Intelligent Pump
Injektion	Rheodyne-Ventil
Detektor	L-4500A Diode Array Detector
Säule	Prontosil 120-3-C8 SH, 150 x 4,6mm, Partikelgröße: 3 µm
Injektionsvolumen	40 µl
Detektionswellenlängen	190-400 nm, 320 nm
Flussrate	1,5 ml min^{-1}
Gradient	0 min 1 % B; 4 min 1 % B; 24 min 20 % B; 30 min 40 % B; 31 min 99 % B; 37 min 99 % B; 38 min 1 % B; 44 min 1 % B.

2.8 LC-MS: Geräte und Parameter

Bei den LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Untersuchungen erfolgte die chromatographische Trennung mit einer HPLC 1100 (Agilent, Waldbronn). Als Massenspektrometer (MS) wurde eine QTrap 4000® (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer, das als Massenanalysator sowohl einen Triple Quadrupol als auch eine lineare Ionenfalle enthält. Bei der Anwendung der Ionenfalle fungiert der dritte Quadrupol als lineare Ionenfalle. In Tab. 2.5 wird das LC-ESI-MS-System vorgestellt.

TABELLE 2.5: Aufbau des LC-ESI-MS-Systems

HPLC 1100 (Agilent, Waldbronn):	
Degasser	G1379A Degasser
Pumpe	G1312A Quarternary Pump
Autosampler	G1367B HIP-ALS Autosampler
Autosampler Thermostat	G1330B Autosampler Thermostat
Säulenofen	G1316A Column Oven
Detektor	G1315B Diode Array Detector
Hybridmassenspektrometer QTrap 4000® (Applied Biosystems, Darmstadt):	
Ionenquelle	Elektrosprayionisation (ESI) mit TurboIonSpray®-Ionenquelle
Massenanalysatoren	Triple Quadrupol und Lineare Ionenfalle
Software	Analyst 1.4.1 und 1.4.2

2.8.1 Chromatographische Trennung

Für die chromatographische Trennung der Tabakblattextrakte wurde für die LC-MS-Kopplung eine Methode entwickelt, die für alle LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Messungen angewendet wurde. Die Parameter der HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung sind in Tab. 2.6 aufgeführt.

TABELLE 2.6: Parameter der HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung

Säule	Prontosil 120-3-C8 SH, 150 x 2,0 mm, Partikelgröße: 3 µm
Säulenofentemperatur	20 °C
Temperatur des Autosamplers	4 °C
Injektionsvolumen	40 µl, nach 1:1-Verdünnung mit deionisiertem Wasser
Eluent A	0,1 % HCOOH
Eluent B	ACN mit 0,1 % HCOOH
Flussrate	300 µl min^{-1}
Gradient	0 min 5 % B; 2 min 5 % B, 35 min 55 % B; 40 min 95 % B, 46 min 95 % B; 47 min 5 % B; 57 min 5 % B.
Detektoren	Diodenarraydetektor (λ=190-400nm) und Massenspektrometer

2.8.2 EMS-Methode für die Ermittlung der ozoninduzierten Metabolite

Für die Ermittlung der ozoninduzierten Metabolite wurde eine LC-ESI-MS-Methode im Full Scan mit der linearen Ionenfalle (EMS-Modus) entwickelt. Die optimierten Parameter der Elektrosprayionisation sowie des Ionentransfers sind in Tab. 2.7 aufgeführt. Die Parameter der Elektrosprayionisation wurden für die im Folgenden vorgestellten MRM-Methoden beibehalten, da diese weitgehend unabhängig von den zu bestimmenden Metaboliten sind.

TABELLE 2.7: Parameter der EMS-Methode

Declustering Potential	-60 V
Parameter der Elektrosprayionisation:	
Ionspray Voltage	-3,9 kV
Nebulizer Gas	50 Einheiten
Auxiliary Gas	20 Einheiten
Curtain Gas	14 Einheiten
Parameter des Ionentransfers:	
Eingangspotential	-8 V
Kollisionsenergie	-8 V
Q3-Entry Barrier	3 V
CAD Gas	Einstellung: Medium

2.8.3 MRM-Methoden für die relative Quantifizierung von phenolischen Sekundärmetaboliten

Im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus wird der Triple Quadrupol als Massenanalysator eingesetzt. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei MRM-Methoden entwickelt.

Zunächst wurde eine MRM-Methode für die relative Quantifizierung von Tryptophan (TRP), Salicylsäureglucosid (SA-G) und 3-Methylsalicylsäure entwickelt. Die MRM-Methode wurde in zwei Perioden mit unterschiedlicher Polarität eingeteilt, wobei die Periode 1 von 0-8 min im positiven Modus und die Periode 2 von 8-57 min im negativen Modus gewählt wurde. Die Parameter der Elektrosprayionisation der EMS-Methode (Kap. 2.8.2) wurden für Periode 1 und 2 beibehalten. Für die Periode 1 wurde allerdings für den Parameter der Elektrosprayionisation der Ionspray Voltage ein Wert von + 3,9 kV gewählt. Für die Dwell Time wurde für beide Perioden ein Wert von 100 msec festgelegt. Die für die jeweilige Substanz optimierten Parameter des Declustering Potentials (DP), des Eingangspotentials (EP), der Kollisionsenergie (CE) und des Collision Exit Potentials (CXP) sowie der entsprechenden Übergänge der MRM-Methode sind in Tab. 3.5 des Kap. 3.3.2 aufgeführt.

Für die relative Quantifizierung der 25 ozoninduzierten Metabolite sowie sieben der Metabolite, die eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, jedoch nicht unter einem akuten Ozonstress induziert werden, wurde eine weitere MRM-Methode entwickelt. Für die MRM-Methode wurde eine Dwell Time von 100 msec festgelegt. Die Parameter der Elektrosprayionisation der EMS-Methode wurden beibehalten. In Tab. 3.6 des Kap. 3.3.3 sind die entsprechenden Übergänge sowie die jeweils für einen bestimmten Metaboliten optimierten Parameter des DPs, des EPs, der CE und des CXPs aufgeführt.

Eine relative Quantifizierung der Metabolite erfolgte durch den Vergleich der ermittelten Peakflächen des jeweiligen Metaboliten in der ozonbehandelten Probe im Vergleich zur Kontrollprobe. Jede biologisch unabhängige Probe wurde dabei in einer Doppelbestimmung untersucht.

2.8.4 Fragmentierung der ermittelten ozoninduzierten Metabolite

Die Fragmentierung der Metabolite erfolgte mit dem Enhanced Product Ion (EPI) Scan. Eine Optimierung des Fragmentierungsparameters der Kollisionsenergie (CE) erfolgte für jeden der zu bestimmenden Metabolite aus einer ozonbehandelten Tabakprobe. Die ermittelten CE für die strukturell aufgeklärten Metabolite sowie die jeweils erhaltenen Fragmentspektren sind in Tab. 4.1 des Kap. 4.2 aufgeführt.

2.9 Messungen der akkuraten Masse

Messungen der akkuraten Masse wurden an einem LTQ-FT Ultra mit ESI (Thermo Fisher, Bremen) durchgeführt. Die chromatographische Trennung des Pflanzenextrakts erfolgte dabei unter den in Kap. 2.8.1 beschriebenen Bedingungen an einer HPLC 1200 (Agilent Waldbronn). Eine Optimierung der Parameter des FTICR-MS erfolgte mit dem Standard *E*-5-Caffeoylchinasäure. Die Messungen am FTICR-MS wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. B. Santiago-Schübel, ZCH/BioSpec, Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

2.10 Isomerisierung der 5-FQA und der 5-CQA

In wässriger Natriumcarbonat-Lösung erfolgt eine Isomerisierung von 5-Isomeren der Hydroxyzimtsäurederivate zunächst in die 4- und danach in die 3-Isomere (Kiehne 1996). Für die Isomerisierung der in der Probe enthaltenen 5-Feruloylchinasäure (5-FQA) wurden acht Extrakte einer ozoninduzierten Mischprobe durch Festphasenextraktion auf C18-Material (Chromabond C18, 500 mg, 3 ml, Macherey-Nagel, Düren) aufkonzentriert. Die Festphasenextraktion erfolgte mit dem Festphasensystem SPE 12-G (J. T. Baker, Griesheim), das an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde. Nach Konditionierung des Festphasenmaterials mit 15 ml Methanol und anschließendem Waschen mit 15 ml Wasser wurden die mit Wasser 1:50 verdünnten Proben aufgetragen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt mit 15 ml Wasser bevor die Analyten mit 1,0 ml 50 %igem MeOH in Wasser eluiert wurden. Nach dem Einengen des Eluats in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) wurde der Rückstand in 100 µl Wasser aufgenommen. Eine Messung der Proben mit LC-ESI-MS/MS erfolgte im EPI-Modus 0 min, 5 min und 30 min nach der Zugabe von 30 µl wässriger Natriumcarbonatlösung (2g l^{-1}) zu 30 µl des wässrigen Probenextrakts.

Für die Isomerisierung der 5-CQA wurden jeweils zu 30 µl einer Standardlösung der 5-CQA in Wasser (5 mg 100 ml^{-1}) 30 µl der wässrigen Natriumcarbonatlösung gegeben. Die Proben wurden anschließend 0 min, 5 min und 30 min nach Zugabe der Natriumcarbonatlösung mit der LC-ESI-MS im EPI-Modus gemessen.

2.11 Standardadditionsverfahren

Das Standardadditionsverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit für die absolute Quantifizierung von SA, SA-G und *E*-5-CQA in einer ozonbehandelten Poolprobe sowie in einer Kontrollpoolprobe angewandt. Für die Ermittlung der Größenordnung der Gehalte an SA, SA-G und *E*-5-CQA wurde zunächst eine externe Kalibrierung durchgeführt. Anhand dieser Größenordnungen wurden die Konzentrationen der Standardzusätze für die jeweiligen Substanzen ausgewählt. Eine absolute Quantifizierung erfolgte durch das Dotieren der Standardlösungen in bekannten, abgestuften Konzentrationen jeweils zu einem konstanten Gesamtvolumen der matrixbelasteten Probe. Aus den erhaltenen Kalibrierdaten wurden die jeweiligen linearen Kalibrierfunktionen ermittelt und daraus die Konzentrationen an SA, SA-G und *E*-5-CQA in den matrixbelasteten Proben bestimmt.

2.12 Northern Analyse

2.12.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus 400 mg tiefgefrorenem Pflanzenmaterial erfolgte mit Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Gesamt-RNA wurde in 100 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

2.12.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit einem Photometer ($Uvikon_{XL}$, Bio-Tek Instruments, Neufahm) in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Sambrook und Russel (2001). Die Reinheit der Präpärationen wurde durch den Quotienten der Extinktionen (E) E 260 nm/E 280 nm bestimmt.

2.12.3 Denaturierende RNA-Agarosegelelektroporese

Für die Gelelektrophorese und das Northern Blotting wurden vor Gebrauch Glasgeräte 2-3 h bei 200 °C gebacken, Lösungen wurden autoklaviert und sonstige Geräte, wie Gelkammern, Wannen und Pinzetten, in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung sterilisiert.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

10 x MOPS:	200 mM Morpholin-3-propansulfonsäure/Natriumhydroxid (MOPS-Puffer, pH 7,0), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA
RNA-Ladepuffer:	50 % Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene Cyanol FF

Vor dem Gelauftrag wurden je Probe 6 µg Gesamt-RNA in Lösepuffer (x µl RNA-Lösung (entsprechend 6 µg RNA), (5,5-x µl) deionisiertes Wasser, 1 µl 10 x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid) 15 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach ca. 2 min wurden die Proben kurz abzentrifugiert (Centrifuge 5417 C, Standardrotor F 45-30-11, Eppendorf, Hamburg) und anschließend 2 µl Ladepuffer hinzugegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Agarose-Formaldehyd-Gel (3 g Agarose, 146 ml deionisiertes Wasser, 20 ml 10 x MOPS, 34 ml 37 %ige Formaldehydlösung) in 1x MOPS als Laufpuffer für 4 h bei 3 V cm^{-1}.

2.12.4 Northern Blotting

Zur Untersuchung der Gen-Expression wurden Northern Blot-Analysen nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Dafür wurde nach der denaturierenden Gelelektrophorese das Gel mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend in 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Tri-natriumcitrat-dihydrat, pH 7) inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA über Nacht bei Raumtemperatur von der Gelmatrix über Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran (Hybond N^+, Roche Diagnostics, Mannheim) unter Verwendung des Turboblotters (Schleicher & Schuell, BioScience, Dassel) transferiert. Als Transferpuffer wurde dabei 20 x SSC verwendet. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratgene, Heidelberg) mit der Membran quervernetzt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.12.5 Markierung von Sonden

Die Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden für die Detektion der basischen ß-1,3-Glucanase wurden durch eine Poymerasekettenreaktion (PCR) (Robocycler® Gradient 96, Stratagene, Heidelberg) mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Karlsruhe) nach Herstellerangaben aus 10 ng cDNA hergestellt. Folgende Primer wurden für die Herstellung der Sonden verwendet: Als 5`-Primer 5NTGLC (TGGGAATGAAATCAGCCCTG) und als 3`-Primer 3NTGLC (TGTCCCAAACACCACCAGAGA). Die Bedingungen der PCR sind in Tab. 2.8 aufgeführt.

TABELLE 2.8: Bedingungen der PCR

	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	5	1 x
Denaturierung	94	1	35 x
Annealing	56	1	
Amplifikation	72	1	
Amplifikation	72	5	1 x

2.12.6 Methylenblaufärbung

Zur Prüfung, ob die verwendeten RNA-Mengen vergleichbar waren, wurde ein Methylenblaufärbung der RNA auf der Membran nach Herrin und Schmidt (1988) durchgeführt. Die erhaltene Färbung wurde durch Einscannen dokumentiert und die Membran anschließend durch Wasser entfärbt.

2.12.7 Northern-Hybridisierung und Immunodetektion

Der RNA-Nachweis erfolgte über eine Immunodetektion mit den DIG-markierten Sonden. Hybridisierung und Immunodetektion wurde mit dem DIG Easy Hyb, dem DIG Wash und Block Set sowie CDP-Star® (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls.

Eine Prähybridisierung erfolgte durch die Behandlung der Membran mit DIG-Easy-Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim). Die anschließende Hybridisierung mit den DIG-markierten

Transkriptsonden erfolgte mit 40 ng Sonde pro ml DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim).

Eine Lokalisierung und Quantifizierung der DIG-markierten Sonden erfolgt durch einen gegen das DIG gerichteten Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dafür wurde die Membran mit dem DIG Wash und Block Set (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Während der Inkubation des hybridisierten Blots mit dem Lumineszenz-Reagenz Substrat CDP-Star® (Roche Diagnostics, Mannheim) katalysiert die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase eine Umsetzung des Lumineszenz-Reagenz, wodurch dieses eine Chemilumineszenz emittiert. Die dadurch erhaltenen Hybridisierungssignale wurden in einem Luminiscent Image Analyser (LAS-3000, Raytest, Straubenhardt) aufgenommen.

2.13 TOSC-Assay

Mit dem Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) Assay wurde die antioxidative Kapazität der Tabakblattextrakte sowie der HPLC-Fraktionen gegen Peroxylradikale ermittelt.

Für die Untersuchungen mit dem TOSC Assay wurden jeweils 20 µl von je zwei Extrakten einer ozoninduzierten Mischprobe sowie einer Kontrollmischprobe verwendet. Zusätzlich wurden von allen 4 Extrakten mit der HPLC-Methode der LC-MS-Messungen (Injektionsvolumen 20 µl) das HPLC-Eluat im Zeitfenster von 9-30 min aufgefangen und für den TOSC Assay eingesetzt. Alle Proben wurden vor der Analyse gefriergetrocknet und anschließend in 500 µl deionisiertem Wasser aufgenommen, so dass für alle Proben ein Verdünnungsfaktor von 25 vorlag. Die Proben wurden mit dem TOSC Assay in einer Doppelbestimmung untersucht.

Der TOSC-Assay wurde von Frau Dr. R. B. Rodrigues und Frau T. Dimmer im Arbeitskreis von Herrn PD Dr. F. Marx, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Bereich Lebensmittelchemie I, Universität Bonn, durchgeführt. Die Bestimmung der TOSC-Werte erfolgte dabei mit der von Lichtenthäler et al. (2003 und 2005) sowie von Rodrigues et al. (2006) entwickelten Methode.

2.14 Dekonvolution der EMS-Rohdaten

Eine Dekonvolution der EMS-Rohdaten wurde mit dem Component Detection Algorithm (CODA) der Software ACD/MS Manager (ACD/Labs, Toronto, Canada) durchgeführt. Die Totalionenchromatogramme der komplexen Blattextrakte weisen ein hohes Hintergrundrauschen auf, so dass für die Ermittlung von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten eine Dekonvolution dieser EMS-Rohdaten erforderlich war.

Eine Dekonvolution der Daten erfolgt mit dem ACD/MS Manager durch die Anwendung eines Algorithmus, der einen Ähnlichkeitsindex zwischen jedem ursprünglichen Massenchromatogramm und dem entsprechenden Chromatogramm nach Smoothing und Mean-Subtracting ermittelt. Massenchromatogramme weisen eine hohe Qualität auf, wenn die berechnete, modifizierte Version einen hohen Ähnlichkeitsindex gegenüber dem ursprünglichen Massenchromatogramm aufweist. Mit Hilfe von CODA können daher Massenchromatogramme mit einem niedrigen Hintergrundrauschen ausgewählt werden, ohne dabei wichtige chemische Informationen zu verlieren (Windig et al. 1996). Nach der Dekonvolution der Rohdaten wird durch die Software ACD/MS Manager ein reduziertes Totalionenchromatogramm generiert, das Massenchromatogramme hoher Qualität enthält. Des Weiteren wird eine Tabelle aller Massenchromatogramme mit dem jeweiligen berechneten Massenchromatogrammqualitäts-Index (MCQ) angegeben. Die Liste der Massenchromatogramme ermöglichte eine vergleichende Analyse der EMS-Chromatogramme der ozonbehandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben. Dabei wurden Massenchromatogramme berücksichtigt, die mindestens einen MCQ von 0,85 aufwiesen. Für die Dekonvolution der Daten wurde eine Smoothing Window Width von 3 gewählt.

2.15 Statistik

In der vorliegenden Arbeit sind die Diagramme jeweils mit den Mittelwerten ± Standardfehler biologisch unabhängiger Proben aufgeführt. Für den Vergleich von zwei Mittelwerten unabhängiger Stichproben wurde ein t-Test ($P < 0,05$) durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten unabhängiger Stichproben wurde eine ANOVA und anschließend ein Multipler Mittelwertsvergleich mit dem Bonferroni-Test ($P < 0,05$) durchgeführt. Daten, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, wurden vor dem t-Test bzw. der ANOVA

logarithmisch transformiert, da ihre Varianzen nicht homogen waren und/oder die Daten keine Normalverteilung aufwiesen. Für die statistischen Analysen wurde die Software SigmaStat 2.03 (SPSS, Chicago, USA) angewendet.

3 Entwicklung und Optimierung der analytischen Methoden

Für das *Metabolite Profiling* der phenolischen Substanzen in ozonbehandelten Tabakproben war es erforderlich, verschiedene LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Methoden zu entwickeln. Als Massenspektrometer wurde eine QTrap 4000® (Applied Biosystems, Darmstadt) angewendet. Dabei handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer, das sowohl Messungen mit einer linearen Ionenfalle als auch mit einem Triple Quadrupol ermöglicht. Für die Untersuchungen der ozoninduzierten, phenolischen Sekundärmetabolite wurden beide Massenanalysatoren eingesetzt. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Methoden zu erhalten, war die Auswahl und Optimierung vieler Parameter notwendig, die im Folgenden vorgestellt werden.

3.1 HPLC-Methode: Vorversuche mit einer HPLC-DAD-Anlage

3.1.1 Auswahl der stationären Phase und mobilen Phase

Die HPLC-Methode der LC-ESI-MS-Messungen hat einen großen Einfluss auf die Empfindlichkeit, Selektivität und Reproduzierbarkeit der gesamten Methode. Diese drei Parameter werden durch die Wahl der stationären Phase, der mobilen Phase und des Modifiers beeinflusst.

Die Wahl der stationären und mobilen Phase sowie des Modifiers wurde in Vorversuchen an einer HPLC-DAD-Anlage mit einem Standardgemisch aus phenolischen Substanzen, von denen bereits bekannt ist, dass sie in Blättern von *N. tabacum* L. cv. Bel W3 vorkommen (Pasqualini et al. 2003; Janzik et al. 2005), durchgeführt. Die Standards gehörten außerdem unterschiedlichen Klassen der phenolischen Substanzen an: Catechin (Flavan-3-ole), Rutin (Flavonole), *E*-5-Caffeoylchinasäure (Hydroxyzimtsäurederivate), Salicylsäure und Salicylsäureglucosid (Phenolcarbonsäuren). Als Vertreter des primären Metabolismus der Pflanze waren L-Tryptophan und L-Tyrosin (aromatische Aminosäuren) enthalten. Durch Exposition des Standards mit UV-Licht wurde des Weiteren die *Z*-5-Caffeoylchinasäure als weitere Standardsubstanz erhalten.

Für die Analytik von phenolischen Substanzen werden in der Literatur üblicherweise Umkehrphasen-Materialien mit einem binären wässrigen Gradientensystem verwendet. Hierbei kommen als stationäre Phase insbesondere C18- und C8-Phasen mit hydrophobem Endcapping (Swatsitang et al. 2000; Ye et al. 2005; Obied et al. 2005; Clifford et al. 2006) sowie C18- oder C8-Phasen mit einer polar eingebundenen Gruppe (Euerby & Petersson 2005) oder mit hydrophilem Endcapping (Schütz et al. 2004; Papagiannopoulos et al. 2004) zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tab. 3.1 aufgelisteten Säulen bezüglich ihrer Eignung zur Trennung von phenolischen Substanzen untersucht.

TABELLE 3.1: Verwendete Säulen

Säule	Eigenschaften der stationären Phase	Dimension
Prontosil 120-3-C18 H (Bischoff)	C18-Phase mit hydrophobem Endcapping	Korngröße 3µm, 150 x 4,6 mm
Prontosil 120-3-C18 SH (Bischoff)	C18-Phase mit maximaler Belegungsdichte und hydrophobem Endcapping	Korngröße 3µm, 150 x 4,6 mm
Prontosil 120-3-C8 SH (Bischoff)	C8-Phase mit maximaler Belegungsdichte und hydrophobem Endcapping	Korngröße 3µm, 150 x 4,6 mm
Prontosil 120-3-C18 ace EPS (Bischoff)	C18-Phase mit polar eingebundener Gruppe und hydrophobem Encapping	Korngröße 3µm, 150 x 4,6 mm
Monochrom 5 µ MS (Varian)	Pentafluorphenylphase mit hydrophobem Endcapping	Korngröße 5 µm, 150 x 4,6 mm

Alle Säulen wurden unter denselben chromatographischen Bedingungen mit einem Standardgemisch aus phenolischen Substanzen (s. oben) an einer HPLC-DAD-Anlage (Waters, Eschborn) getestet. Es zeigte sich, dass insbesondere bei der Säule Prontosil 120-3-C8 SH die phenolischen Substanzen schmale, symmetrische und basisliniengetrennte Peaks aufwiesen. Bei den Säulen Prontosil C18 H und Prontosil C18 SH konnten zwar auch schmale, symmetrische Peaks erhalten werden, jedoch waren nicht alle Substanzen basisliniengetrennt. Ein Vergleich der C18 SH-Phase mit maximaler Belegungsdichte gegenüber der C18 H-Phase zeigte, dass die höhere Belegungsdichte zu einer besseren Selektivität führt. Die Säulen Prontosil 120-3-C18 ace EPS und Monochrom 5 µ MS wiesen unter den gewählten Gradientenbedingungen ein deutliches Peaktailing auf, so dass eine weitere Optimierung der Trennbedingungen mit der Säule Prontosil 120-3-C8 SH durchgeführt wurde. In Abb. 3.1 ist ein Chromatogramm dargestellt, das mit der Säule Prontosil 120-3-C8 SH erhalten wurde.

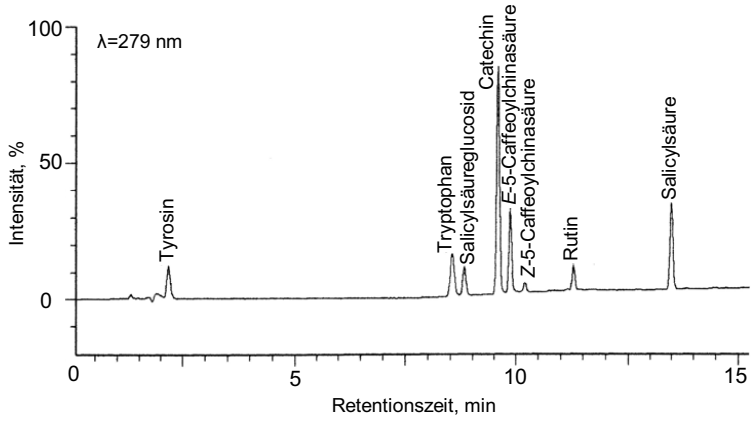


ABBILDUNG 3.1: Trennung eines phenolischen Standardgemisches auf einer Prontosil 120-3-C8 SH mit einer HPLC-DAD-Anlage.

In der Literatur werden als wässrige binäre Gradientensyteme für die Analytik von phenolischen Substanzen mit Umkehrphasen-Chromatographie mobile Phasen aus Wasser/MeOH (Olsson et al. 1998; Justesen 2000) oder Wasser/ACN (Papagiannopoulos et al. 2004; Almela et al. 2006; Lai et al. 2007) eingesetzt. Als Modifier werden Säuren wie Ameisensäure (HCOOH) (Justesen 2000; Almela et al. 2006; Lai et al. 2007), Essigsäure (Papagiannopoulos et al. 2004) oder Phosphorsäure (Olsson et al. 1998) verwendet. Der Zusatz einer Säure zur mobilen Phase hat einen positiven Einfluss auf die Peakform und die Retentionszeit der Metabolite, da aufgrund des niedrigen pH-Werts die phenolischen Substanzen in ihrer undissoziierten Form vorliegen (Cuyckens & Claeys 2002). Phosphorsäure eignet sich nicht für die massenspektrometrische Detektion, da sie schwer verdampfbar ist. Eine Verwendung von Phosphorsäure würde daher zu unerwünschten Ablagerungen in der ESI-Quelle führen (de Rijke et al. 2006).

Neben ACN/Wasser mit jeweils 0,1 % HCOOH wurde auch getestet ob MeOH/Wasser mit jeweils 0,1 % HCOOH als mobile Phase bessere Trenneigenschaften bezüglich der Chromatographie der phenolischen Substanzen auf der Säule Prontosil RP 8 SH zeigt. Es wurden beide mobilen Phasen unter denselben chromatographischen Bedingungen mit dem Standardgemisch an phenolischen Substanzen an der HPLC-DAD-Anlage angewendet. Im Gegensatz zur mobilen Phase mit ACN/Wasser, lagen mit MeOH/Wasser nicht alle Peaks basisliniengetrennt vor, so dass eine Chromatographie mit MeOH/Wasser unter den hier

angewendeten Bedingungen eine schlechtere Selektivität aufwies. Daher wurde für die Optimierung der Extraktion der phenolischen Substanzen aus Tabakblättern eine HPLC-DAD-Gradientenmethode mit ACN/Wasser und 0,1 % HCOOH als Modifier auf einer Prontosil 120-3-C8 SH an einer HPLC-DAD-Anlage (Merck-Hitachi, Darmstadt) entwickelt. Die Auswahl von 0,1 % HCOOH als Modifierzusatz wird unter 3.2.2 erläutert.

3.1.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen: Die Behandlung der Blattproben nach der Ernte, das Zerkleinern der Blattproben, die Lagerung der Blattproben und die Extraktion der löslichen phenolischen Sekundärmetabolite aus den Blattproben. Die gesamte Probenvorbereitung sollte unter möglichst schonenden Bedingungen erfolgen, um einer Oxidation, einem thermischen Abbau oder anderen biochemischen oder chemischen Veränderungen der zu untersuchenden phenolischen Substanzen entgegenzuwirken (Antolovich et al. 2000). Die Blattproben sollten daher während der gesamten Probenvorbereitung möglichst kurzen Behandlungszeiten unterliegen und vor starker Lichteinstrahlung geschützt werden. Des Weiteren sollten alle Schritte der Probenvorbereitung bei möglichst niedrigen Temperaturen erfolgen (Long et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tabakblätter unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff (N_2) eingefroren und bis zu einer weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert, um einen möglichen enzymatischen Abbau von phenolischen Sekundärmetaboliten zu verhindern (Escribano-Bailón & Santos-Buelga 2003).

Das Zerkleinern der Blattproben erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit einem Mörser unter flüssigem N_2. Die Blattproben wurden so lange unter flüssigem N_2 gemörsert, bis die Proben eine möglichst kleine Partikelgröße sowie eine homogene Partikelgrößenverteilung aufwiesen. Eine geringe Partikelgröße verbessert den Extraktionsprozess und führt somit zu höheren Extraktionsausbeuten. Durch die geringe Partikelgröße sowie die homogene Partikelgrößenverteilung werden außerdem homogene und damit repräsentative Einzelproben erhalten (Escribano-Bailón & Santos-Buelga 2003). Die fein pulverisierten Proben wurden bis zu ihrer weiteren Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

Ziel der Extraktion der Tabakblätter war es, die in den Vakuolen lokalisierten löslichen phenolischen Sekundärmetabolite möglichst vollständig freizusetzen. Für die Extraktion der löslichen phenolischen Sekundärmetaboliten aus pflanzlichen Materialien werden als Extraktionslösungsmittel häufig MeOH, Ethanol und Aceton mit variierenden Anteilen an Wasser verwendet (Tura & Robards 2002; Bedgood et al. 2005), wobei MeOH/Wasser-Gemische besonders häufig benutzt werden (Escribano-Bailón & Santos-Buelga 2003). Die organischen Lösungsmittel führen zu einer Inaktivierung der Enzyme (Bedgood et al. 2005), so dass nach Zugabe des organischen Lösungsmittels ein enzymatischer Abbau der phenolischen Sekundärmetabolite nicht mehr erfolgen kann. Die Extraktion der Probe wird beispielsweise im Ultraschallbad, durch Schütteln mit einem Schüttler oder durch Mörsern durchgeführt (Tura & Robards 2002; Bedgood et al. 2005; Janzik et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit 60 % MeOH gearbeitet, um festzustellen, mit welchem der genannten Extraktionsverfahren die höchsten Ausbeuten für die *E*-5-CQA im UV-Chromatogramm (λ=320 nm) mit einer HPLC-DAD-Anlage (Kap. 3.1.1) erhalten werden. Da für die LC-MS-Analytik nur ein geringes Probenvolumen benötigt wird, wurden Extraktionsverfahren ausgewählt, bei denen es möglich war mit einem geringen Lösungsmittelvolumen zu arbeiten, um den Verbrauch an Probenmaterial und Lösungsmittel möglichst gering zu halten. Bei den Extraktionen wurde mit einem Lösungsmittelvolumen von 1,0 ml und einer Probenmenge von 200 mg gearbeitet. Alle Extraktionen wurden zweifach durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Extraktion mit einem Schüttler (t=1 h) bei 4 °C zu den geringsten Extraktionsausbeuten führte. Eine Extraktion der Proben im Ultraschallbad mit Eiswasser (t=15 min) führte zu besseren Ergebnissen. Die höchsten Extraktionsausbeuten wurden jedoch durch das Mörsern der Pflanzenproben in einem gekühlten Mörser (T=4 °C) mit 100 mg gereinigtem Seesand (t=2 min) erhalten. Die höheren Extraktionsausbeuten könnten darauf zurückzuführen sein, dass durch das Mörsern mit Seesand eine weitere Verringerung der Partikelgröße und damit eine größere Oberfläche des Probenmaterials erreicht wurde. Da die Proben während des Mörserns außerdem den kürzesten Behandlungszeiten bei einer niedrigen Temperatur ausgesetzt waren, wurde dieses Extraktionsverfahren in der vorliegenden Arbeit angewendet. Die höchsten Verluste beim Extrahieren mit dem Mörser wurden durch die Rückstände im Mörser nach der Extraktion verursacht. Ein Spülen des Mörsers führte zu deutlich geringeren Verlusten der Extraktionsausbeute, so dass nach Beendigung des Extrahierens der Mörser mit Extraktionslösungsmittel gespült wurde und anschließend die Spüllösung mit der

Extraktionslösung vor Zentrifugation und Filtration vereinigt wurde. Unter diesen Extraktionsbedingungen wurde anschließend untersucht, welches der oben genannten Extraktionslösungsmittel (mit Anteilen an den organischen Lösungsmitteln von 50 %, 60 %, 70 % und 80 %) die besten Extraktionsausbeuten für die löslichen phenolischen Sekundärmetabolite zeigt. Dabei wies 60 % MeOH mit einem Zusatz von 0,1 % HCOOH die höchsten Extraktionsausbeuten auf, so dass dieses Extraktionslösungsmittel in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

3.2 Entwicklung einer HPLC-MS-Methode mit der Ionenfalle im EMS-Modus als Übersichtsscan

3.2.1 EMS-Modus

Im Enhanced MS-Modus (EMS-Modus) wird der dritte Quadrupol als lineare Ionenfalle verwendet. Die Ionen werden von der ESI-Quelle direkt in den dritten Quadrupol überführt, dort gesammelt und anschließend ausgelesen. Durch das Sammeln der Ionen in der Ionenfalle wird eine höhere Empfindlichkeit im Full Scan erreicht als durch einen Quadrupol Full Scan, bei dem ein Sammeln der Ionen nicht möglich ist.

Ziel war es, eine EMS-Methode zu entwickeln, die es ermöglicht die phenolischen Sekundärmetabolite zu ermitteln, die im Vergleich zu Kontrolltabakblättern durch einen akuten Ozonpuls (c=170 nl l^{-1}, t=5 h) verstärkt oder neu gebildet werden. Dafür sollte eine EMS-Methode im üblichen Massenbereich von m/z 100-1000 als Übersichtsscan entwickelt werden. Durch die Auswahl der Parametereinstellungen sollte der Übersichtsscan so optimiert werden, dass eine hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit erhalten wird. Dabei ist ein stabiles Spray besonders wichtig, da dann die Ionisierung sehr gleichmäßig und damit reproduzierbar erfolgt und außerdem eine hohe Ionisationsausbeute erreicht wird. Einen großen Einfluss auf die Ionisationsausbeute hat des Weiteren die Wahl der Polarität der Ionisierung. In anderen Arbeiten (Fang et al. 2002; Sanchez-Rabaneda et al. 2003; Lin & Harnly 2007) wurde festgestellt, dass phenolische Substanzen im negativen Modus eine höhere Ionisationsausbeute sowie ein besseres Signal/Rausch (S/N) -Verhältnis zeigen als im positiven Modus, so dass für die Entwicklung der EMS-Methode zur Ermittlung der ozoninduzierten Sekundärmetabolite insbesondere der negative Modus berücksichtigt wurde.

Für eine hohe Reproduzierbarkeit und Ionisationsausbeute der Methode war es zunächst erforderlich, die Säulendimension sowie die mobile Phase der HPLC-DAD-Methode an die Anforderungen des Massenspektrometers anzupassen. Des Weiteren mussten die ESI-spezifischen sowie die substanzspezifischen Parameter der massenspektrometrischen Detektion optimiert werden.

3.2.2 Anpassung der Säulendimension und der mobilen Phase an die Anforderungen der massenspektrometrischen Detektion

In der LC-MS-Analytik werden üblicherweise Flüsse bis maximal 500 µl min^{-1} angewendet, da bei höheren Flussraten die Ionisationsausbeute deutlich verringert ist. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn ein hoher Wasseranteil in der mobilen Phase vorhanden ist. Wasser weist eine größere Verdampfungsenthalpie und Oberflächenspannung auf als die in der LC-MS-Analytik verwendeten organischen Lösungsmittel ACN und MeOH. Die höhere Verdampfungsenthalpie und die hohe Oberflächenspannung stehen einer effizienten Vernebelung der mobilen Phase in der ESI-Quelle und damit einer effektiven Ionisierung entgegen.

Daher wurde die Säulendimension der Prontosil 120-3-C8 SH an die deutlich niedrigeren Flussraten der LC-MS-Methode gegenüber der HPLC-DAD-Methode angepasst. Bei der HPLC-DAD-Methode wurde bei einer Flussrate von 1,5 ml min^{-1} eine Säule mit einem Durchmesser von 4,6 mm verwendet. Für die LC-MS-Methode wurde der Säulendurchmesser mit 2,0 mm der geringeren Flussrate angepasst. Eine Flussrate von 1,5 ml min^{-1} auf einer Säule mit 4,6 mm im Durchmesser entspricht einer Flussrate von 0,28 ml min^{-1} auf einer Säule mit einem Durchmesser von 2,0 mm, so dass für die LC-MS-Methode eine Flussrate von 0,3 ml min^{-1} gewählt wurde.

Neben der Wahl des Säulendurchmessers war es erforderlich die Partikelgröße der stationären Phase sowie die Länge der Säule festzulegen. Aufgrund des kleineren Partikeldurchmessers weist eine Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm eine höhere Leistungsfähigkeit bezüglich ihrer Trenneigenschaften auf als eine Säule mit einer Partikelgröße von 5 µm, da bei gleicher Säulenlänge eine höhere Anzahl an theoretischen Böden vorliegt (Marston 2007). So wird bei der Verwendung einer stationären Phase mit einer Partikelgröße von 3 µm bei kürzerer

Säulenlänge eine vergleichbare Bodenhöhe H erhalten wie bei einer stationären Phase mit einer Partikelgröße von 5 µm. Dies führt zu einer Verkürzung der Dauer der Chromatographie sowie zu einem geringeren Verbrauch an mobiler Phase. Bei der Prontosil 120-3-C8 SH-Säule für die LC-MS-Methode wurde folglich eine Partikelgröße der stationären Phase von 3 µm und eine Säulenlänge von 150 mm gewählt.

Die Wahl der mobilen Phase hat bei LC-MS-Messungen einen starken Einfluss auf die Ionisationsausbeute in der ESI-Quelle. In einer Studie von Chuyckens und Claeys (2002) wurde gezeigt, dass Flavonoidglycoside mit Wasser/ACN eine höhere Ionisationsausbeute im negativen ESI-Modus aufweisen als mit einer mobilen Phase bestehend aus Wasser/MeOH. Die bei der HPLC-DAD-Methode verwendete mobile Phase mit Wasser/ACN war somit auch gut geeignet für die LC-MS-Messungen der zu untersuchenden Substanzen im negativen ESI-Modus.

Neben dem bereits erwähnten positiven Effekt des Modifiers in der mobilen Phase auf die chromatographische Trennung der phenolischen Substanzen, hat auch der Modifier selbst Auswirkungen auf die Ionisationsausbeute der Substanzen in der ESI-Quelle. Bei der Untersuchung von Cuyckens und Claeys (2002) wurde festgestellt, dass für Rutin die höchste Ionisationsausbeute im negativen ESI-Modus mit einer mobilen Phase von 50 % ACN erhalten wird, die eine Konzentration an HCOOH als Modifierzusatz von 0,1 % aufweist. Höhere Konzentrationen an HCOOH führen dagegen zu einer niedrigeren ESI-MS-Empfindlichkeit. Die leichter flüchtige HCOOH weist außerdem deutlich höhere Ionisationsausbeuten auf als Essigsäure. Auch Rauha et al. (2001) zeigte, dass mit 0,1 % HCOOH in der wässrigen Phase die höchste Ionisationsausbeute für Catechin im negativen Modus erreicht wird. Ebenfalls wurde von Sanchez-Rabaneda et al. (2003) festgestellt, dass im negativem Modus für phenolische Substanzen eine Konzentration an 0,1 % HCOOH in der mobilen Phase zu einer höheren Ionisationsausbeute führt als Essigsäure oder höhere Konzentrationen an HCOOH. Die genannten Untersuchungen wurden an LC-MS-Geräten von unterschiedlichen Herstellern durchgeführt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass HCOOH als Modifierzusatz in einer Konzentration von 0,1 % generell sehr gut geeignet ist. Für den zu entwickelnden Gradienten für die HPLC-DAD-Methode und die LC-MS-Methode wurde daher ein Modifierzusatz von 0,1 % HCOOH gewählt.

3.2.3 HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung

Nach der Anpassung der Säulendimension sowie der Auswahl der mobilen Phase und des Modifiers wurde mit einem Standardgemisch ein Gradient für die LC-MS-Messung mit Hilfe des DADs entwickelt. Eine direkte Übertragung der HPLC-DAD-Gradientenmethode der HPLC-Anlage von Merck (Kap. 3.1.1) war nicht möglich, stattdessen wurde ausgehend von dieser Gradientenmethode ein geeigneter Gradient für die HPLC-Anlage von Agilent entwickelt. Mit diesem Gradienten wurde auch das optimale Injektionsvolumen für die Probenextrakte ermittelt. Die Probenextrakte wiesen mit etwa 50 % MeOH einen deutlich höheren Gehalt an organischem Lösungsmittel gegenüber den chromatographischen Anfangsbedingungen mit einem ACN-Gehalt von 5 % auf. Der MeOH-Gehalt der Probenextrakte wurde daher durch eine 1:1-Verdünnung mit deionisiertem Wasser verringert. Bei einem Injektionsvolumen des verdünnten Probenextrakts von 40 µl wurden für die in den Probenextrakten enthaltenen Chlorogensäuren schmale, symmetrische Peaks erhalten. Höhere Injektionsvolumina führten dagegen zu einer deutlichen Peakverbreiterung. In Tab. 3.2 sind die Methodenparameter der HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung aufgeführt.

TABELLE 3.2: Methodenparameter der HPLC-Methode für die LC-MS-Kopplung

Säule	Prontosil 120-3-C8 SH, 150 x 2,0 mm, Partikelgröße: 3 µm
Säulenofentemperatur	20 °C
Temperatur des Autosamplers	4 °C
Injektionsvolumen	40 µl, nach 1:1-Verdünnung mit deionisiertem Wasser
Eluent A	0,1 % HCOOH
Eluent B	ACN mit 0,1 % HCOOH
Detektoren	DAD und MS
Flussrate	300 µl min^{-1}
Gradient	0 min 5 % B; 2 min 5 % B, 35 min 55 % B; 40 min 95 % B, 46 min 95 % B; 47 min 5 % B; 57 min 5 % B.

3.2.4 Optimierung der massenspektrometrischen Detektion

Für die Optimierung der massenspektrometrischen Detektion wurden phenolische Sekundärmetabolite verschiedener Substanzgruppen eingesetzt (s. Kap 1.1), von denen bereits bekannt ist, dass sie in Tabak vorkommen (Pasqualini et al. 2003; Janzik et al. 2005). Außerdem wurde als weiterer Standard 3-Methylsalicylsäure verwendet. Diese Substanz ähnelt strukturell der Salicylsäure, sie kommt allerdings in Pflanzen nicht vor, so dass die

3-Methylsalicylsäure als interner Standard für die EMS-Methode angewendet werden konnte. Die Substanzen wurden in 25 % wässrigem ACN mit 0,1 % HCOOH gelöst, da dies im Mittel den chromatographischen Bedingungen entspricht, bei denen die Substanzen von der Säule eluieren und in die ESI-Quelle eintreten.

Bei den zu optimierenden Parametern im EMS-Modus kann zwischen Parametern unterschieden werden, die die Ionisierung der Analyten in der ESI-Quelle beeinflussen und solchen, die den Transfer der Ionen im Massenspektrometer beeinflussen. Diese gerätespezifischen Parameter werden in den Kapiteln 3.2.4.1 und 3.2.4.2 aufgeführt und es wird erläutert, warum eine Optimierung des jeweiligen Parameters erforderlich ist.

3.2.4.1 Optimierung des Declustering Potentials

Das Declustering Potential (DP) ist ein Parameter, der substanzspezifisch ist. Mit dem Parameter des DPs wird die Potentialdifferenz zwischen dem Einlass ins Massenspektrometer und dem Quadrupol 0 kontrolliert. Dieser Parameter hat einen großen Einfluss auf die Ionenintensität der zu bestimmenden Analyten und die Reproduzierbarkeit der Messungen. Er minimiert die Anzahl der verbliebenen Analytionen-Lösungsmittelcluster und transferiert die bereits gebildeten Ionen in Richtung des Massenspektrometers. Je höher das DP gewählt wird, desto geringer ist der Anteil an Analytionen-Lösungsmittelclustern, ein zu hohes DP führt allerdings bereits zu einer Fragmentierung der quasimolekularen Analytionen.

Eine Optimierung dieses Parameters erfolgte manuell für alle Standards im negativen sowie im positiven Modus mit einer Spritzenpumpe im Tuning-Modus im Full Scan mit dem Quadrupol 1. Der Massenbereich wurde dem jeweiligen Standard angepasst. Anhand der Ionenintensität des Standards wurde damit der jeweilige optimale Wert für das DP ermittelt. Hierbei wurde, übereinstimmend mit anderen Arbeiten (Fang et al. 2002; Sanchez-Rabaneda et al. 2003; Lin & Harnly 2007), festgestellt, dass im negativen Modus höhere Ionenausbeuten erreicht werden als im positiven Modus. Eine Optimierung der weiteren EMS-Parameter erfolgte daher im negativen Modus. Für das DP wurde für die Optimierung der anderen EMS-Parameter ein Wert gewählt, der für alle Standardsubstanzen eine gute und reproduzierbare Ionisierung lieferte. Dabei musste letztendlich ein Kompromiss gefunden werden zwischen Analyten, die bereits einen geringen Anteil an Fragmentierung ihrer

quasimolekularen Ionen aufwiesen, da sie Bindungen mit geringer Bindungsstärke enthalten sowie Analyten, die weiterhin einen gewissen Anteil an Analytionen-Lösungsmittelcluster aufwiesen. SA wies z. B. -45 V als optimales DP auf, wohingegen *E*-5-CQA und SA-G ein optimales DP von -70 V aufwiesen. Als DP für die EMS-Methode wurde letztendlich ein Wert von -60 V gewählt.

3.2.4.2 Optimierung der ESI-Parameter

Die zu optimierenden ESI-Parameter sind im Gegensatz zum DP weitgehend unabhängig von den zu bestimmenden Standardsubstanzen. Allerdings sind sie abhängig von der Flussrate und Fließmittelzusammensetzung der in die ESI-Quelle eintretenden mobilen Phase. Die Optimierung dieser ESI-Parameter musste daher unter den chromatographischen Bedingungen erfolgen, die dem nachher in der Methode verwendeten Gradienten möglichst entsprechen. Die Flussrate selbst hat auch einen Einfluss auf die Ionisationsausbeute der Methode. Ein zu hoher chromatographischer Fluss führt zu einem instabilen Spray insbesondere bei einem hohen Anteil an Wasser aufgrund der höheren Verdampfungsenthalpie und der hohen Oberflächenspannung des Wassers gegenüber ACN. Ein stabiles Spray wurde mit einer Flussrate von 300 µl min^{-1} erhalten. Zur Optimierung der ESI-Parameter wurde mit der Flussrate von 300 µl min^{-1} mit 25 % wässrigem ACN und 0,1 % HCOOH als mobile Phase gearbeitet, da im Mittel zu diesen chromatographischen Bedingungen die Standardsubstanzen von der Säule eluieren.

Die Ermittlung der optimierten ESI-Parameter erfolgte mit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) im negativen Modus mit einem Q1 Multiple Ion Scan, in dem ausschließlich die quasimolekularen Massen $[M-H]^-$ der zu optimierenden Standardsubstanzen im Quadrupol 1 selektiert und anschließend detektiert werden. Bei der FIA wird die HPLC-Anlage verwendet, um mit der erforderlichen Flussrate von 300 µl min^{-1} arbeiten zu können. Dabei wird nach jeder Injektion der Standardlösung durch den Autosampler jeweils einer der zu optimierenden ESI-Parameter variiert und die unter diesen Bedingungen erhaltenen Ionenintensitäten der einzelnen Standards im Q1 Multiple Ion Scan ermittelt. Die Optimierung der einzelnen Parameter wurde hierbei am Computermonitor verfolgt, um zu überprüfen, ob die jeweiligen Ionenintensitätsmaxima der jeweiligen Parameter von der Software richtig gewählt wurden.

Anhand der Ionenintensitäten wurde dann entschieden, welcher Wert des jeweiligen ESI-Parameters eine möglichst hohe Ionenausbeute für alle Standardsubstanzen ergibt.

Folgende ESI-Parameter wurden optimiert: Neben der Flussrate der chromatographischen Trennung sowie der Polarität der Ionisierung wurden anschließend mit der FIA die Einstellungen der Ionspray Voltage, der Stickstoffströme sowie die Temperatur des Hilfsgases optimiert. Bei der Ionspray Voltage handelt es sich um die Spannung, die an die Nadel der ESI-Quelle angelegt wird. Sie beeinflusst die Ionenausbeute sowie die Spraystabilität. Bei den Stickstoffströmen handelt es sich um das Nebulizer Gas, das Hilfsgas sowie das Curtain Gas. Das Nebulizer Gas unterstützt die Überführung der mobilen Phase mit dem Analyten in feine Tröpfchen, wodurch es die Empfindlichkeit und Stabilität des Ionensprays beeinflusst. Des Weiteren wurde der Parameter des Hilfsgases sowie dessen Temperatur optimiert. Die Temperatur des Hilfsgases wurde hierbei optimiert, indem die Temperatur der Heizelemente der ESI-Quelle verändert wurde. Das erhitzte Hilfsgas unterstützt die Evaporation des Lösungsmittels und damit die Bildung von Ionen in der Gasphase. Darüber hinaus verhindert das erhitzte Gas, dass Lösungsmittel in das Massenspektrometer gelangt. Das außerdem optimierte Curtain Gas strömt zwischen der Curtain Plate und dem Einlass ins Massenspektrometer und verhindert das Eintreten von Lösungsmitteltröpfchen in das Massenspektrometer und schützt somit vor einem Verschmutzen der Ionenoptik. Die gewählten ESI-Parameter für die EMS-Methode sind in Tab. 3.3 aufgeführt.

3.2.4.3 Optimierung der Bedingungen des Ionentransfers

Beim Eingangspotential (EP), der Kollisionsenergie (CE), der Q3-Entry Barrier und dem CAD Gas handelt es sich um substanzspezifische Parameter, die die Bedingungen des Ionentransfers von dem Eintritt ins Massenspektrometer bis zur Detektion beeinflussen. Eine Optimierung der Parameter ist hierbei nicht unter Chromatographiebedingungen erforderlich, da sie ausschließlich von den zu analysierenden Analyten abhängen. Eine Optimierung der Parameter erfolgte daher manuell mit einer Spritzenpumpe bei einem Fluss von 10 µl min^{-1} im Tuning-Modus.

Das EP leitet und fokussiert den Ionenstrom durch den Quadrupol 0. Bei der Anwendung des Quadrupols 3 als lineare Ionenfalle im Full Scan haben die CE und das CAD Gas andere Funktionen als üblich. Für den EMS-Modus werden die Parameter für CE und CAD Gas sehr niedrig eingestellt, so dass ihre übliche Funktion, nämlich das Fragmentieren der Analytionen, möglichst nicht auftritt. Mit Hilfe der Optimierung dieser Parameter in niedrigen Einstellungen soll stattdessen dafür gesorgt werden, dass die Ionen durch die CE, sowie auch durch die Q3-Entry Barrier, im Ionenstrom geleitet und fokussiert werden. Mit der Optimierung des Parameters des CAD Gases in niedrigerer Einstellung wird dafür gesorgt, dass die Ionen vor dem Eintritt in die Ionenfalle fokussiert und abgebremst werden, da ansonsten die Ionen zu viel Energie aufweisen würden und somit in der Ionenfalle fragmentieren würden. Beim Optimieren dieser Parameter musste folglich sehr stark darauf geachtet werden, dass die Einstellungen nicht zu hoch gewählt wurden, da ansonsten, bei den hier zur Optimierung herangezogenen Standards, das Salicylsäureglucosid bereits fragmentierte. Eine zu niedrige Einstellung führte dagegen zu einer schlechteren Ionenausbeute, da dabei dann die Ionen im Ionenstrom nicht ausreichend fokussiert und stabilisiert wurden. Hierbei musste somit ein Kompromiss eingegangen werden. Die gewählten Werte der EMS-Methode für die Parameter, die den Ionentransfer beeinflussen, sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

TABELLE 3.3: Optimierte Parameter für die EMS-Methode:

Flussrate	300 µl min^{-1}
Declustering Potential	-60 V
Ionspray Voltage	-3,9 kV
Nebulizer Gas	50 Einheiten
Auxiliary Gas	20 Einheiten
Curtain Gas	14 Einheiten
Eingangspotential	-8 V
Kollisionsenergie	-8 V
Q3-Entry Barrier	3 V
CAD Gas	Einstellung: Medium

3.3 Entwicklung von zwei HPLC-MS/MS-Methoden mit dem Triple Quadrupol im MRM Modus zur relativen Quantifizierung

3.3.1 MRM-Modus

Im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus wird das Massenspektrometer als Triple Quadrupol Gerät genutzt. Dieser Modus dient der quantitativen Bestimmung von bestimmten, der Methode angepassten Analyten. Hierbei werden im Quadrupol 1 die Masse zu Ladungs-Verhältnisse (m/z) der zu quantifizierenden Analyten selektiert. Anschließend werden dann ausschließlich diese m/z im Quadrupol 2 unter für den jeweiligen Analyten bestimmten Bedingungen fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden dann im Quadrupol 3 selektiert, wobei eine anschließende Detektion eines bestimmten Fragments stattfindet, wenn dieses Fragment (=Produktion) sowie das zuvor im Quadrupol 1 selektierte quasimolekulare Ion (=Vorläuferion) spezifisch ist für einen der zu quantifizierenden Analyten. Es findet somit nur eine Detektion eines Analyten statt, wenn im MRM-Modus der zuvor spezifizierte Übergang von Vorläuferion zu Produktion bestimmt werden konnte. Durch diese Funktionsweise weist der MRM Modus eine hohe Selektivität auf. Aufgrund der hohen Selektivität dieses Messmodus wird das S/N-Verhältnis der Messungen enorm gesteigert, wodurch eine hohe Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die zu analysierenden Substanzen erhalten wird (Hernando et al. 2007).

Ziel hierbei war es, die hohe Selektivität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des MRM-Modus zu nutzen, um eine relative Quantifizierung der phenolischen Sekundärmetabolite in ozonexponierten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen durchzuführen. Beim *Metabolite Profiling* wird sehr häufig mit einer relativen Quantifizierung gearbeitet, indem die Peakflächen der zu bestimmenden Metaboliten in den behandelten Proben mit den entsprechenden Peakflächen der unter denselben Bedingungen kultivierten Kontrollproben des gleichen Gewebes ins Verhältnis gesetzt werden (Fernie et al. 2004). Eine Kalibrierung über Standards kann in vielen Fällen nicht durchgeführt werden, da für viele der strukturell aufgeklärten Substanzen keine Standards zur Verfügung stehen und außerdem für viele der ermittelten Metaboliten im *Metabolite Profiling* die Struktur noch unbekannt ist (Hall 2006). In Kap. 3.3.4 wird auf die relative Quantifizierung näher eingegangen.

Im MRM-Modus wurde für zwei Fragestellungen jeweils eine Methode entwickelt, deren Optimierung im Folgenden vorgestellt wird. Die für die EMS-Methode entwickelten ESI-Parameter sind weitgehend unabhängig von den zu bestimmenden Analyten, so dass diese ermittelten Parameter sowie die chromatographischen Bedingungen beibehalten wurden. Eine Optimierung erfolgte für das DP sowie die substanzspezifischen Parameter, die für jeden zu bestimmenden Analyten in diesem Modus individuell angewählt werden können. Dies trägt zu einer höheren Empfindlichkeit der MRM-Methode bei, da keine Kompromisslösungen für mehrere Analyten getroffen werden müssen, sondern jeder Analyt unter den für ihn optimalen Bedingungen transferiert, fragmentiert und detektiert werden kann.

Für die MRM-Methoden wurden für jeden Analyten die Parameter des DPs, des EPs, der CE und des Collision Cell Exit Potentials (CXP) optimiert.

Für die Optimierung der Parameter des EPs und insbesondere des DPs, die die Ionenintensität der Vorläuferionen beeinflussen, wurden Messungen im Full Scan mit dem Quadrupol 1 durchgeführt. Ziel war es, eine möglichst hohe Ionenausbeute an den Vorläuferionen zu erhalten, die sich wiederum im MRM-Modus letztendlich mit einer höheren Ionenausbeute an den Produktionen zeigt, die für die zu entwickelnden MRM-Methoden zunächst noch festgelegt werden mussten.

Die Wahl der Produktionen sowie die Optimierung der Parameter, die die Ionenintensität der Produktionen beeinflussen, wurde mit Product Ion Scans durchgeführt. Beim Product Ion Scan handelt es sich um einen MS/MS-Scan, bei dem im Quadrupol 1 ein bestimmtes Vorläuferion selektiert wird, das im Quadrupol 2 in der Kollisionskammer fragmentiert wird und dessen Produktionen im Quadrupol 3 ausgelesen werden. Im Product Ion Scan werden somit alle Produktionen ermittelt, die unter bestimmten Parameterbedingungen aus einem Vorläuferion gebildet werden. Die Ionenintensität der Produktionen hängt insbesondere von der Auswahl des entsprechenden Produktions sowie von den Parametern der CE und der CXP ab. Bei dem Parameter der CE handelt es sich um die Potentialdifferenz zwischen Quadrupol 1 und Quadrupol 2. Dieser Parameter kontrolliert die Kollisionsenergie, die die Vorläuferionen in die Kollisionszelle des Quadrupols 2 beschleunigen, in der sie mit Stickstoffmolekülen kollidieren. Je nach Kollisionsenergie führt die durch die Kollision der

Stickstoffmoleküle mit den Vorläuferionen hervorgerufene Energieübertragung zu einem Bindungsbruch im Vorläuferion und damit zu der Bildung von Produktionen, die im Qudrupol 3 ausgelesen werden. Entstandene elektrisch neutrale Bruchstücke werden vom Vakuumsystem abgepumpt. Der Parameter der Kollisionsenergie hat daher, neben der Auswahl des entsprechenden Produktions, einen großen Einfluss auf die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der MRM-Methode. Die Produktionen müssen so gewählt werden, dass sie möglichst hohe Ionenintensitäten im Fragmentspektrum aufweisen. Neben der geeigneten Wahl der Produktionen muss der Parameter der CE so festgelegt werden, dass eine Fragmentierung in solch einem Ausmaß stattfindet, dass eine möglicht hohe Ionenausbeute für das jeweilige Produktion erhalten wird. Ein zu hoher Wert kann zu einer unerwünschten Fragmentierung der Produktionen, ein zu niedriger Wert kann dagegen zu einer nicht ausreichenden Bildung der jeweiligen Produktionen aus den Vorläuferionen führen. Das CXP fokussiert und beschleunigt letztendlich die während der Fragmentierung gebildeten Produktionen aus dem Quadrupol 2 in Richtung des Quadrupols 3.

Bei der Dwell Time handelt es sich um die Dauer eines MS/MS Scans in msec. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen ist es günstig, eine möglichst große Dwell Time zu wählen. Allerdings darf die Dwell Time nur so groß gewählt werden, dass weiterhin pro Peak 12-16 Datenpunkte vorliegen (Kerns et al. 2004), da daraus ansonsten eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Messung resultiert.

3.3.2 Optimierung der substanzspezifischen Parameter im MRM-Modus zur relativen Quantifizierung von Salicylsäureglucosid und Tryptophan

Für die Wahl des geeigneten Blattalters der ozonexponierten Tabakpflanzen für die Ermittlung und Bestimmung von ozoninduzierten Sekundärmetaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS wurde für die relative Quantifizierung von TRP und SA-G eine MRM-Methode entwickelt. Diese beiden Metabolite wurden ausgewählt, da Tryptophan ein typischer Vertreter des primären und Salicylsäureglucosid einen typischer Vertreter des sekundären Metabolismus darstellt. Die Anwendung der entwickelten MRM-Methode wird in Kap. 3.6 vorgestellt.

Eine Optimierung der oben genannten substanzspezifischen Parameter erfolgte manuell mit einer Spritzenpumpe unter Verwendung jeweils eines TRP-, SA-G- und 3-MeSA-Standards bei einem Fluss von 10 µl min^{-1} im Tuning-Modus mit Full Scans und Product Ion Scans.

Bei der Optimierung des DPs zeigte nur TRP, als aromatische Aminosäure, eine deutlich höhere Ionenintensität im positiven Modus als im negativen Modus, so dass die zu entwickelnde MRM-Methode in zwei Perioden mit unterschiedlicher Polarität der Ionisierung eingeteilt wurde. Tryptophan eluierte mit 7,1 min als erste der drei Standardsubstanzen von der Säule, weswegen die Periode 1 im positiven Modus von 0-8 min und die Periode 2 im negativen Modus von 8-57 min gewählt wurden. Für die Periode 1 wurde dabei für den ESI-Parameter der Ionspray Voltage ein Wert von 3,9 kV gewählt. Für die Dwell Time wurde für beide Perioden eine Dauer von 100 msec festgelegt. In Tab. 3.5 sind die für diese MRM-Methode optimierten Übergänge und substanzspezifischen Parameter aufgeführt.

TABELLE 3.5: Übergänge und substanzspezifische Parameter der MRM-Methode (TRP und SA-G)

Standard	RT (min)	Periode	Vorläuferion (amu)	Produktion (amu)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
TRP	7,1	1	205	187	+46	+10	+15	+14
SA-G	9,7	2	299	137	-60	-8	-20	- 9
3-MeSA	25,8	2	151	107	-60	-8	-20	- 5

Tryptophan (TRP). Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid (SA-G). 3-Methylsalicylsäure (3-MeSA). Retentionszeit (RT). Declustering Potential (DP). Eingangspotential (EP). Kollisionsenergie (CE). Collision Cell Exit Potential (CXP).

3.3.3 Optimierung der substanzspezifischen Parameter im MRM-Modus zur relativen Quantifizierung der ozoninduzierten Sekundärmetabolite und der Sekundärmetabolite, die eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen

Nach der Ermittlung der phenolischen Sekundärmetabolite, die unter Ozon verstärkt oder neu gebildet werden (s. Kap. 4.1), wurde eine relative Quantifizierung dieser ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetabolite sowie der Metabolite durchgeführt, die zwar eine hohe antioxidative Kapazität zeigen, jedoch unter einem akuten Ozonstress nicht verstärkt gebildet werden. Die relative Quantifizierung dieser 32 phenolischen Sekundärmetabolite in Proben

von behandelten Tabakblättern im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollproben wurde mit einer dafür entwickelten MRM-Methode durchgeführt. Die Anwendung der Methode wird in Kap. 4.3, 4.5.4 und 4.5.5 vorgestellt. Im Folgenden wird ihre Entwicklung und Optimierung erläutert.

Die Optimierung der Metabolite wurde mit realen Proben durchgeführt, da nicht für alle der zu bestimmenden Metabolite Standards zur Verfügung standen. Den Messungen im Full Scan und Product Ion Scan wurde daher eine chromatographische Trennung mit der HPLC-Anlage vorgeschaltet. Alle Übergänge der relativ zu quantifizierenden phenolischen Sekundärmetabolite wurden individuell bezüglich des EPs, des DPs, der CE und des CXPs optimiert. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der 33 Übergänge der MRM-Methode zu erreichen, musste außerdem die Dwell Time optimiert werden. Die für eine quantitative Bestimmung erforderlichen 12-16 Datenpunkte pro Peak (Kerns et al. 2004) wurden bei dieser MRM-Methode mit einer Dwell Time von 100 msec erreicht. In Tab. 3.6 sind die für diese MRM-Methode festgelegten Übergänge sowie die optimierten substanzspezifischen Parameter aufgeführt.

TABELLE 3.6: Übergänge und substanzspezifische Parameter der MRM-Methode zur relativen Quantifizierung der Metabolite (vgl. Kap. 4.3).

RT (min)	Vorläuferion (amu)	Produktion (amu)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
8,0	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
9,6	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
9,9	343,1	181,1	-40	-5	-30	-2
10,9	299,1	137,1	-60	-8	-15	-8
11,1	477,2	431,2	-60	-5	-20	-8
11,4	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
12,0	343,1	181,1	-40	-5	-30	-2
12,8	447,2	401,2	-40	-4	-20	-5
13,0	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
13,6	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
13,8	469,2	423,2	-40	-8	-15	-15
14,1	337,1	173,1	-60	-5	-20	-2
14,4	353,1	191,1	-60	-5	-40	-3
15,2	337,1	173,1	-60	-5	-20	-2
15,3	439,2	393,2	-60	-4	-15	-2
16,2	439,2	393,2	-60	-4	-15	-2
16,1	337,1	191,1	-60	-5	-20	-2
16,5	337,1	191,1	-60	-5	-20	-2
16,7	367,1	191,1	-40	-5	-40	-5
17,1	367,1	191,1	-40	-5	-40	-5
17,6	312,1	178,2	-60	-5	-30	-2
18,8	312,1	178,2	-60	-5	-30	-2
19,2	319,1	163,1	-60	-4	-20	-2
19,3	319,1	163,1	-60	-4	-20	-2
20,5	137,1	93,0	-60	-4	-25	-2
20,7	515,1	191,1	-60	-5	-40	-3
22,3	312,1	178,2	-60	-5	-30	-2
24,0	312,1	178,2	-60	-5	-30	-2
24,0	805,6	773,4	-80	-4	-40	-15
25,0	805,6	773,4	-80	-4	-40	-15
26,8	151,1	107,0	-60	-4	-15	-2
26,8	485,2	397,2	-60	-5	-20	-2
27,8	437,2	377,2	-60	-5	-15	-5

Retentionszeit (RT). Declustering Potential (DP). Eingangspotential (EP). Kollisionsenergie (CE). Collision Cell Exit Potential (CXP).

3.3.4 Relative Quantifizierung und Matrixeffekte

LC-ESI-MS und LC-ESI-MS/MS wurden erfolgreich im *Metabolite Profiling* von phenolischen Substanzen angewendet (Long et al. 2006; Farag et al. 2007). Bei einer Quantifizierung muss jedoch berücksichtigt werden, dass, insbesondere bei der Ionisierung im Elektrospray, Ionensuppression auftreten kann. Eine Ionensuppression kann durch co-eluierende Analyten oder Matrixsubstanzen verursacht werden, die die Ionenintensität des zu analysierenden quasimolekularen Ions schwächen oder, in selteneren Fällen, auch verstärken (Matuszewski et al. 2003). Die Ionensuppression bei LC-ESI-MS wurde zum ersten Mal durch Tang und Kebarle (1993) beschrieben. Die Mechanismen, die zu einer Ionensuppression führen sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Taylor 2005). Es wird unter anderem angenommen, dass die zu analysierenden Substanzen mit den co-eluierenden organischen Substanzen um den Zugang zu der Tropfenoberfläche während des Elektrosprayionisationsprozesses konkurrieren. Ionen, die sich an der Oberfläche der Tropfen befinden, werden bei der Coulomb Explosion leichter in die Mikrotropfen und letztendlich als Ionen in die Gasphase überführt. Dieser Effekt wird insbesondere durch co-eluierende oberflächenaktive Substanzen hervorgerufen. Häufig ist jedoch nicht bekannt, welche co-eluierenden Substanzen zu einer Verstärkung oder Verminderung des Signals führen, da diese Substanzen in der Regel im MS nicht detektiert werden (Niessen 1999).

Vergleicht man die Ionensuppression in zwei unterschiedlichen Matrices, so wird hierbei zwischen absoluten und relativen Matrixeffekten unterschieden.

Bei der Bestimmung des absoluten Matrixeffekts (ME) wird ein Standard in derselben Konzentration zu einer matrixbelasteten Probe sowie zu einem reinen Lösungsmittel dotiert. Der absolute Matrixeffekt berechnet sich dabei aus den Peakflächen des Standards in der matrixbelasteten Probe (B) und dem reinen Lösungsmittel (A) durch: $ME=(B/A)\cdot 100$ (Matuszewski et al. 2003). Bei einem Wert von ME=100 % würde somit kein Matrixeffekt vorliegen.

Viel wichtiger als der absolute Matrixeffekt ist jedoch bei der Validierung von Methoden des *Metabolite Profilings* der relative Matrixeffekt. Beim relativen Matrixeffekt handelt es sich um die Variation des berechneten absoluten Matrixeffekts von zwei verschiedenen matrixbelasteten Proben, die man in einer wissenschaftlichen Studie miteinander vergleicht.

Die relativen Matrixeffekte können als der relative Variationskoeffizient der Peakflächen in den zudotierten matrixbelasteten Proben angegeben werden (Böttcher et al. 2007). Damit zwei matrixbelastete Proben in einer Studie miteinander verglichen werden können, sollten sich die absoluten Matrixeffekte der Proben nicht signifikant unterscheiden, so dass in diesem Fall der relative Matrixeffekt als praktisch null angesehen werden kann. Damit ist eine relative Quantifizierung der Metabolite in den miteinander zu vergleichenden matrixbelasteten Proben möglich. Der absolute Matrixeffekt spielt dabei keine Rolle.

In einer Studie von Böttcher et al. (2007) wurde der absolute und der relative Matrixeffekt von matrixbelasteten Proben aus Wurzeln und Blättern von *Arabidopsis thaliana,* die unter denselben kontrollierten Bedingungen angezogen wurden, ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass zwar absolute Matrixeffekte von etwa 20 % bis etwa 90 % vorliegen, jedoch die entsprechenden relativen Matrixeffekte zwischen matrixbelasteten Proben des gleichen Gewebes, aber von unterschiedlichen Pflanzen derselben Art als praktisch null angesehen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung des absoluten Matrixeffekts sieben unterschiedliche Konzentrationen an dem internen Standard 3-MeSA in eine ozonexponierte Poolprobe (30 h), in eine Kontrollpoolprobe (30 h) sowie in das reine Lösungsmittel zudotiert, so dass jeweils alle Proben mit je sieben Konzentrationen an 3-MeSA von c = 1 µg ml^{-1} bis c = 10 ng ml^{-1} vorlagen. Das pflanzliche Ausgangsmaterial (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3) der ozonexponierte Poolprobe sowie der Kontrollpoolprobe wurde unter denselben kontrollierten Anzuchtbedingungen kultiviert und zu demselben Zeitpunkt geerntet. Des Weiteren wurden für die Probenahme jeweils Blätter vergleichbaren Blattalters geerntet. Hierbei wurde mit der MRM-Methode für den absoluten Matrixeffekt für 3-MeSA bei den sieben verschiedenen Konzentrationen in der ozonexponierten Poolprobe ein Mittelwert von 68,9 % ± 5,6 % und in der Kontrollpoolprobe ein Mittelwert von 65,3 % ± 6,2 % ermittelt. Die ermittelten absoluten Matrixeffekte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, so dass kein relativer Matrixeffekt vorliegt und damit eine relative Quantifizierung durchführbar war.

Für die relative Quantifizierung der Metabolite im MRM-Modus wurden biologisch voneinander unabhängige Einzelblattproben verwendet. Für die statistische Analyse wurden

neben den zur gleichen Zeit angezogenen ozonexponierten Proben (30 h) und Kontrollproben (30 h) auch die in einem unabhängigen Experiment, unter den gleichen Bedingungen kultivierten, ozonexponierten Proben (10 h) und Kontrollproben (10 h) miteinander verglichen. Es sollte somit zusätzlich geprüft werden, ob ein statistischer Vergleich zwischen den vier Probengruppen möglich ist. Vor der Extraktion wurde allen biologischen Einzelproben der interne Standard 3-Methylsalicylsäure zudotiert, so dass die Proben jeweils eine Konzentration an 3-MeSA von 10 ng ml^{-1} aufwiesen. Für alle vier Probengruppen wurde jeweils der Mittelwert der Peakfläche an 3-MeSA ermittelt. Daraus ergab sich ein relativer Variationskoeffizient für die jeweils miteinander zu vergleichenden Mittelwerte der vier verschiedenen Probengruppen von 6,7 % ± 3,5 %. Zusätzlich zum relativen Matrixeffekt floss gleichzeitig die Variabilität der Probenvorbereitung und der Methode mit ein, so dass der relative Matrixeffekt, auch bei dem statistischem Vergleich der vier Probengruppen, die unter kontrollierten Bedingungen kultiviert worden sind, als vernachlässigbar angesehen werden kann. Insbesondere dann, wenn berücksichtigt wird, dass die biologische Variabilität im Mittel für alle Einzelblätter, die 30 h nach der Ozonexposition geerntet wurden, bei 30,1 % ± 13,4 % lag (siehe Kap. 3.4.3). Die hier erzielten Ergebnisse unterstützen somit die Studie von Böttcher et al. (2007), dass bei Pflanzen derselben Varietät, die unter kontrollierten Anzuchtbedingungen kultiviert wurden, bei der Untersuchung des gleichen Gewebes mit LC-ESI-MS praktisch keine relativen Matrixeffekte zu erwarten sind. Auf eine weitere Prüfung der relativen Matrixeffekte in den miteinander zu vergleichenden biologischen Proben wurde deswegen verzichtet.

Bei einem Vergleich matrixbelasteter Proben, die von unterschiedlichen Geweben stammen, ist eine absolute Quantifizierung erforderlich (Fernie et al. 2004), da hierbei unterschiedliche relative Matrixeffekte zu erwarten sind. Bei einer absoluten Quantifizierung der Metaboliten kann aufgrund des vorhandenen absoluten Matrixeffekts keine externe Kalibrierung für die absolute Quantifizierung angewendet werden. Um die absoluten Matrixeffekte zu kompensieren, wäre es allerdings möglich eine interne Quantifizierung der Metabolite über Standards mit stabiler Isotopenmarkierung (^{13}C oder ^{2}D) durchzuführen (Fernie et al. 2004). Die isotopenmarkierten Standards werden hierbei von den Matrixeffekten gleichermaßen beeinflusst, so dass eine interne Quantifizierung möglich ist. In der vorliegenden Arbeit standen für keine der identifizierten Substanzen isotopenmarkierte Standards zur Verfügung, so dass diese Möglichkeit der Quantifizierung nicht in Erwägung gezogen werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung, trotz Vorhandenseins eines Matrixeffekts, besteht in der Anwendung des Standardadditionsverfahrens. Für SA, SA-G und *E*-5-CQA standen Standards zu Verfügung, so dass für diese Substanzen beispielhaft eine absolute Quantifizierung in jeweils vier ozonbehandelten Einzelblättern (30 h) und den entsprechenden Kontrolleinzelblättern (30 h) mit dem Standardadditionsverfahren in einer Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit der in Kap. 3.3.3 vorgestellten MRM-Methode. Die ermittelten Gehalte an SA, SA-G und *E*-5-CQA sind mit den jeweiligen Standardfehlern in Tab. 3.7 angegeben.

TABELLE 3.7: Gehalte an SA, SA-G und *E*-5-CQA in den ozonbehandelten Einzelblättern (30 h) 1-4 und den entsprechenden Kontrolleinzelblättern (30 h) 1-4

Proben	SA (mg kg^{-1})	SA-G (mg kg^{-1})	*E*-5-CQA (mg kg^{-1})
Ozonbehandelte Einzelblätter (30 h)	0,6 ± 0,1	17,9 ± 2.3	284,6 ± 17,7
Kontrolleinzelblätter (30 h)	nn	nn	288,7 ± 9,4

Die Zahlen repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler mit jeweils n=4. Salicylsäure (SA). Salicylsäureglucosid (SA-G). *E*-5-Caffeoylchinasäure (*E*-5-CQA). Mittelwert (MW). Nicht nachweisbar (nn).

3.4 Kenndaten der entwickelten Methoden

3.4.1 HPLC-Methode

Um die Präzision der chromatographischen Methode zu testen, wurde zunächst die Stabilität der Retentionszeiten überprüft, indem 10 Extrakte von Tabakblattproben innerhalb von vier Tagen mit der MRM-Methode gemessen wurden, um die Standardabweichung (SD) der Retentionszeit für SA-G zu bestimmen. Hierbei ergab sich eine maximale SD für SA-G von 0,10 min sowie eine mittlere SD von 0,05 min. Aufgrund dieser stabilen Retentionszeiten zeigte die HPLC-Methode für alle entwickelten LC-ESI-MS- und LC-ESI-MS/MS-Methoden eine gute Reproduzierbarkeit.

3.4.2 Vergleich der Mess- und Methodenpräzisionen der EMS- und MRM-Methode

Streuungen von Messwerten werden in der instrumentellen Analytik anhand der Messpräzision sowie die Methodenpräzision überprüft.

Bei der Messpräzision (Reproduzierbarkeit der Messung) handelt es sich um das Maß für die Schwankungen, die durch die Messung mit der entsprechenden LC-MS-Methode sowie durch die Auswertung verursacht werden (Kromidas 2000). Für die Bestimmung der Messpräzision der EMS- und MRM-Methode wurde derselbe Extrakt einer ozonexponierten Einzelblattprobe (10 h) dreimal injiziert und mit der entsprechenden MS-Methode detektiert. Aus den erhaltenen Peakflächen für SA-G wurde anschließend der Variationskoeffizient (VK) für die jeweilige MS-Methode für den ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten SA-G bestimmt (Tab. 3.8).

Die Methodenpräzision (Reproduzierbarkeit der gesamten Methode) ist ein Maß für die Schwankungen der Messwerte, die durch alle Arbeitsschritte der Methode verursacht werden und damit neben der Messung und Auswertung auch das Wiegen, die Probenextraktion sowie die weitere Probenvorbereitung berücksichtigt (Kromidas 2000). Für die Bestimmung der jeweiligen Methodenpräzision wurden drei verschiedene Extrakte der gleichen ozonexponierten Einzelblattprobe (10 h) injiziert und mit der entsprechenden MS-Methode detektiert. Anschließend wurden jeweils die auf 200 mg Frischgewicht normalisierten Peakflächen von SA-G ermittelt und daraus die VKs berechnet (Tab. 3.8).

TABELLE 3.8: Variationskoeffizienten der MS- und der Gesamtmethoden für SA-G

	VK (MS-Methode) für SA-G	VK (Gesamtmethode) für SA-G
EMS-Methode	3,7 %	6,8 %
MRM-Methode	1,1 %	3,2 %

Enhanced Mass Spectrometry Scan (EMS). Multiple Reaction Monitoring (MRM). Variationskoeffizient (VK). Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid (SA-G).

Bei der entwickelten EMS-Methode handelt es sich um eine qualitative Methode, die im Vergleich zur MRM-Methode keine hohe Selektivität aufweist, und damit eine geringere Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit zeigt. Dies erklärt auch, dass bei der EMS-Methode der VK der MS-Methode, und daraus resultierend auch der VK der Gesamtmethode, höher war. Die Reproduzierbarkeit der EMS-Methode ist jedoch für die Detektion der zu ermittelnden ozoninduzierten Metaboliten vollkommen ausreichend, da hierbei nur Metaboliten als mögliche ozoninduzierte Metabolite in Erwägung gezogen wurden, wenn die Peakhöhe einer quasimolekularen Masse in der ozonexponierten Probe mindestens 1,5-fach höher war als in der entsprechenden Kontrollprobe. In einer Studie von

Roepenack-Lahaye et al. (2004) wurde für das *Metabolite Profiling* von verschiedenen Sekundärmetaboliten in *A. thaliana* mit einem LC-ESI-TOF-Quadrupolgerät ein VK für die MS-Methode von 11,1 % und einem VK für die MS-Methode und die Extraktion von *A. thaliana*-Blätterproben von 25 % ± 17,9 % ermittelt. Von Clifford (2003) wird angegeben, dass bei den üblichen Extraktionsmethoden für Hydroxyzimtsäurederivate (HCAs) aus pflanzlichem Gewebe der VK weniger als 10 % betragen sollte.

3.4.3 Validierung der MRM-Methode

Die MRM-Methode wurde für die relative Quantifizierung der mit der EMS-Methode ermittelten sekundären phenolischen Metabolite entwickelt. Die Validierung dieser quantitativen Methode umfasste die Parameter Methodenpräzision, biologische Variabilität, Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) sowie die Kalibrierfunktion. Diese Parameter wurden für jeden einzelnen in der MRM-Methode zu bestimmenden phenolischen Sekundärmetaboliten ermittelt.

Wird bei einem biologischen Experiment von jeder Pflanze jeweils nur ein Blatt geerntet und werden die erhaltenen Einzelblätter anschließend getrennt voneinander untersucht, so handelt es sich bei den Einzelblättern um biologisch unabhängige Proben. Auch für die relative Quantifizierung der zu bestimmenden phenolischen Sekundärmetabolite wurden durch die Ernte von je einem einzelnen Blatt pro Pflanze für die Ozonbehandlung mit einer Ernte nach 10 h sowie 30 h jeweils acht bzw. sieben biologisch unabhängige Proben geerntet. Außerdem wurden bei jedem Experiment zeitgleich jeweils acht unabhängige Proben von acht Kontrollpflanzen genommen. Zur Untersuchung der biologischen Variabilität wurden von den Einzelblattproben der 30 h Ozon-Werte je zwei Extrakte hergestellt und die resultierenden Peakflächen für den jeweiligen Metaboliten mit der MRM-Methode bestimmt. Die ermittelten Peakflächen wurden dann auf eine Einwaage von 200 mg Frischgewicht normiert und anschließend der Mittelwert sowie der VK für den jeweiligen Metaboliten berechnet. Der gemittelte VK der Doppelbestimmungen aller Einzelblattproben eines bestimmten Metaboliten spiegelt die Methodenpräzision dieses Metaboliten wider. Die methodischen VKs der einzelnen Metabolite sind in Tab. 3.9 aufgeführt. Für die gemittelte Methodenpräzision aller Metabolite der MRM-Methode wurde ein methodischer Gesamt-VK von 3,2 % ± 1,5 % berechnet. Dabei ist zu erkennen, dass der methodische Gesamt-VK von dem jeweiligen

betrachteten Metaboliten abhängt. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die zu bestimmenden Metabolite unterschiedlich große Peakflächen aufwiesen. Substanzen mit größeren Peakflächen wiesen in der Regel geringere VKs auf als Substanzen mit kleineren Peakflächen. Eine weitere Rolle könnte eine unterschiedliche Reproduzierbarkeit der Ausbeute der einzelnen Metabolite während der Extraktion spielen.

Für die Bestimmung der biologischen Variabilität wurde aus den acht Mittelwerten der Doppelbestimmung der biologisch unabhängigen Einzelblattproben die biologische Variabilität jedes einzelnen Metaboliten ermittelt. Die in Tab. 3.9 aufgeführten biologischen VKs spiegeln die biologische Variabilität der Einzelblattproben wider. Für die gemittelte biologische Variabilität aller Metabolite für die MRM-Methode wurde ein biologischer Gesamt-VK von 30,1 % ± 13,4 % berechnet. Die biologische Variabilität ist folglich viel größer als die Variabilität der Gesamtmethode. Dies ist auch zu erwarten (Dunn et al. 2005) und ermöglicht eine relative Quantifizierung. Wie bei der Methodenpräzision ist auch bei der biologischen Variabilität die Größe der VKs bei den jeweiligen zu bestimmenden Metaboliten variabel. Zu einem ähnlichen Wert bei einer anderen *Metabolite Profiling* Studie mit LC-ESI-MS kamen auch von Roepenack-Lahaye et al. (2004). Hier wurde für zu ermittelnde Sekundärmetabolite aus Blättern von *A. thaliana* eine gemittelte biologische Variabilität von 35,5 % ± 14,0 % bestimmt.

Zusätzlich zu den methodischen und biologischen VKs der MRM-Methode der einzelnen Metabolite wurden die NG und BG sowie die Linearität der MRM-Methode für alle zu bestimmenden Metabolite bis zu einer Verdünnung von 1:100 ermittelt. Für die Ermittlung dieser drei Parameter in der MRM-Methode war es erforderlich mit den Extrakten von Pflanzenproben zu arbeiten, um den Einfluss der Matrix auf die entwickelte Methode bei der Validierung zu berücksichtigen, da ansonsten nur die Linearität der LC-ESI-MS/MS-Messung bestimmt werden würde. Eine Bestimmung der Parameter erfolgte daher durch die stetige Verdünnung von zwei Extrakten einer ozonexponierten Poolprobe (30 h) bis zu einer Verdünnung von 1:100 und einer anschließenden Messung dieser Proben mit der MRM-Methode. Für die Ermittlung der NG, der BG und der Linearität der Methode wurde eine ozonexponierte Probe (30 h) verwendet, da diese alle Metaboliten, bis auf SA, in höheren oder vergleichbaren Konzentrationen im Vergleich zu einer ozonexponierten Probe (10 h) enthält. Dadurch wurde der größtmögliche Konzentrationsbereich der Kalibriergerade

erhalten, bei dem eine Bestimmung der Linearität der Methode, unter Berücksichtigung der Matrix, durchgeführt werden konnte.

Bei der NG wird die kleinste nachweisbare Menge und bei der BG die kleinste quantifizierbare Menge einer Substanz bestimmt. Eine übliche Vorgehensweise bei der Ermittlung der NG und BG ist die Abschätzung aus der Peakhöhe im Chromatogramm (Kromidas 2000). Durch eine stetige Verdünnung der zwei Extrakte einer ozonexponierten Probe (30 h) bis zu einer Verdünnung von 1:100 wurde ermittelt, bis zu welcher Verdünnung noch ein Signal für den jeweiligen Metaboliten zu erkennen ist. Hierbei wurde für die Ermittlung der NG ein S/N-Verhältnis von 3:1 und für die BG von 9:1 zugrunde gelegt (Kromidas 2000). Die ermittelten NG und BG wurden bis zu einer Verdünnung von 1:100 ermittelt und sind in Tab. 3.9 angegeben.

Neben der Bestimmung der NG und BG wurde außerdem überprüft, über welchen Konzentrationsbereich eine Linearität der Analysenmethode für den jeweiligen Metaboliten gegeben ist. Hierfür wurden verschiedene Verdünnungen von zwei unabhängigen ozonexponierten Proben (30 h) bis zu einer Verdünnung von 1:100 mit der MRM-Methode gemessen und die für den jeweiligen Metaboliten erhaltenen Werte der Peakfläche gemittelt. Anschließend wurde geprüft, in welchem Konzentrationsbereich ein linearer funktionaler Zusammenhang zwischen den gemittelten Peakflächen und den durchgeführten Verdünnungen bestand, indem eine Kalibrierfunktion ermittelt wurde. Für die Bestimmung wurde das Verfahren der linearen Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Ein wichtiges Kriterium für die Linearität einer Methode ist der Korrelationskoeffizient r. Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für den Grad der Anpassung eines mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte und sollte möglichst einen Absolutbetrag von 0,999 aufweisen (Kromidas 2000). Für die Detektion mit der MRM-Methode ergab sich für fast alle zu bestimmenden Metabolite bis zu einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:80 und 1:70 ein linearer Zusammenhang mit Korrelationskoeffizienten von r=0,9885-0,9994. Für die Metaboliten mit den quasimolekularen Massen m/z 137,1 und m/z 485,2, die bereits in der unverdünnten Probe sehr kleine Peakflächen aufwiesen, bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Verdünnungsstufe und der Peakfläche bis zu einer Verdünnung von 1:20. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.9 dargestellt.

TABELLE 3.9: Validierungsparameter der MRM-Methode

RT (min)	Übergang (amu)	Methodischer VK (%)	Biologischer VK (%)	NG (Verdünnungs-stufe)	BG (Verdünnungs-stufe)	Linearität gegeben bis Verdünnung von
8,0	353,1/191,1	3,6	35,5	> 1:100	> 1:100	1:100
9,6	353,1/191,1	3,5	22,8	> 1:100	> 1:100	1:100
9,9	343,1/181,1	3,3	28,3	1:100	1:80	1:80
10,9	299,1/137,1	2,3	21,4	> 1:100	> 1:100	1:100
11,1	477,2/431,2	2,1	20,9	> 1:100	1:100	1:100
11,4	353,1/191,1	1,1	26,3	> 1:100	> 1:100	1:100
12,0	343,1/181,1	3,5	20,0	1:100	1:80	1:80
12,8	447,2/401,2	1,8	28,4	> 1:100	1:100	1:100
13,0	353,1/191,1	2,0	14,6	> 1:100	> 1:100	1:100
13,6	353,1/191,1	3,1	11,1	> 1:100	> 1:100	1:100
13,8	469,2/423,2	2,5	39,4	> 1:100	1:100	1:100
14,1	337,1/173,1	4,6	10,8	> 1:100	1:100	1:100
14,4	353,1/191,1	1,1	19,7	> 1:100	> 1:100	1:100
15,2	337,1/173,1	1,1	18,4	> 1:100	1:100	1:100
15,3	439,2/393,2	2,2	38,6	1:100	1:70	1:70
16,2	439,2/393,2	2,0	21,4	1:100	1:80	1:80
16,1	337,1/191,1	5,6	27,3	> 1:100	1:100	1:100
16,5	337,1/191,1	3,6	20,4	> 1:100	1:100	1:100
16,7	367,1/191,1	3,1	17,9	> 1:100	1:100	1:100
17,1	367,1/191,1	3,0	19,5	> 1:100	1:100	1:100
17,6	312,1/178,2	5,3	36,1	> 1:100	> 1:100	1:100
18,8	312,1/178,2	3,2	41,7	1:100	1:80	1:80
19,2	319,1/163,1	4,6	56,7	> 1:100	1:100	1:100
19,3	319,1/163,1	6,1	35,6	> 1:100	1:100	1:100
20,5	137,1/93,0	1,5	46,7	1:70	1:20	1:20
20,7	515,1/191,1	3,2	40,6	> 1:100	> 1:100	1:100
22,3	312,1/178,2	2,2	48,0	> 1:100	> 1:100	1:100
24,0	312,1/178,2	3,9	45,4	> 1:100	> 1:100	1:100
24,0	805,6/773,4	3,2	38,0	> 1:100	> 1:100	1:100
25,0	805,6/773,4	3,2	28,2	> 1:100	> 1:100	1:100
26,8	151,1/107,0	2,7	8,8	> 1:100	> 1:100	1:100
26,8	485,2/397,2	8,6	37,2	1:50	1:20	1:20
27,8	437,2/377,2	2,3	66,0	> 1:100	1:100	1:100

Variationskoeffizient (VK). Nachweisgrenze (NG). Bestimmungsgrenze (BG).

3.5 Optimierung der substanzspezifischen Fragmentierungsparameter für die Strukturaufklärung der phenolischen Metabolite im EPI Scan

Für die Ermittlung der LC-MS/MS-Fragmentspektren wurden Messungen im Enhanced Product Ion (EPI) Scan durchgeführt. Beim EPI-Modus wird ein bestimmtes quasimolekulares Ion im Quadrupol 1 selektiert, anschließend im Quadrupol 2 fragmentiert und letztendlich die daraus entstandenen Fragmente im Quadrupol 3, der in diesem Modus als lineare Ionenfalle arbeitet, ausgelesen. Im Gegensatz zu dem in der MRM-Methodenentwicklung angewendeten Product Ion Scan, weist der EPI Scan eine höhere Empfindlichkeit auf, da die im Quadrupol 2 entstandenen Fragmente in der Ionenfalle gesammelt werden.

Ziel der Fragmentierungen im EPI-Modus war es, möglichst viele der, mit Hilfe des EMS Scans ermittelten, ozoninduzierten Metabolite sowie weitere phenolische Sekundärmetabolite in den Blättern von ozonexponierten Tabakpflanzen strukturell aufzuklären. Die Strukturaufklärung von ozoninduzierten Metaboliten sowie Metaboliten, die eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, wird in Kap. 4.2 vorgestellt.

Im Gegensatz zur Optimierung der MRM-Methoden im Product Ion Scan war es hier nicht das Ziel, die substanzspezifischen Parameter so zu optimieren, dass ein Produktion des Vorläuferions mit einer möglichst hohen Ionenintensität erhalten wird. Für die Optimierung der Fragmentierung war es stattdessen erforderlich, die CE so zu wählen, dass ein möglichst aussagekräftiges Fragmentspektrum erhalten wird. In einem Fragmentspektrum ist es in der Regel nicht möglich, alle Signale zu interpretieren. Jedoch sind in einem aussagekräftigen Fragmentspektrum charakteristische Fragmentierungsmuster enthalten, anhand dessen eine mögliche Zuordnung dieser Fragmente zu einer Struktur erfolgen kann.

Die Fragmentierung der quasimolekularen Ionen erfolgte aus einer ozoninduzierten Tabakprobe nach der chromatographischen Trennung. Für den EPI-Scan wurden, bis auf die CE, die Parameter der in Kap. 3.2 vorgestellten EMS-Methode beibehalten, da bei dieser Methode auch mit der Ionenfalle gearbeitet wird. Für jeden der strukturell aufzuklärenden Metabolite wurde die CE in einem LC-MS/MS-Lauf optimiert. Die Höhe der gewählten CE

hing dabei insbesondere von den Bindungsstärken im Molekül ab. Neben der CE musste der zu scannende Massenbereich der Ionenfalle festgelegt werden. Der Massenbereich musste so gewählt werden, dass sowohl das quasimolekulare Ion als auch dessen Fragmente ausgelesen werden konnten. Die festgelegten CEs sowie die erhaltenen Fragmentspektren der strukturell aufgeklärten Metabolite werden in Kap. 4.3 aufgeführt.

3.6 Probenahme: Wahl des geeigneten Blattalters

Für die Bestimmung der phenolischen Sekundärmetabolite, die in *N. tabacum* L. cv Bel W3 nach einem akuten Ozonpuls gebildet werden, war es zunächst erforderlich, ein geeignetes Blattalter für die Probenahme zu wählen. Ziel dieser Untersuchungen war es auf der einen Seite eine möglichst gute Reproduzierbarkeit der phenolischen Substanzen in Blättern desselben Blattalters, die von unterschiedlichen Pflanzen stammen, zu erhalten. Auf der anderen Seite sollten die phenolischen Substanzen nach der Ozonexposition eine möglichst hohe Induktion aufweisen.

Für die Untersuchungen wurden die vollständig ausgebildeten Blätter von acht Tabakpflanzen als Einzelblätter 30 h nach Beginn der Ozonexposition geerntet. Zusätzlich wurden entsprechende Einzelblätter von sieben Kontrollpflanzen geerntet. Bei den vollständig ausgebildeten Blättern handelte es sich bei den acht Wochen alten Pflanzen um die Blätter 3, 4 und 5. Festgelegt als Blatt 1 wurde hierbei das erste, vom Sprossscheitel aus gezählte, Blatt, das von der Blattspitze bis zum Blattgrund länger als 8 cm ist. In Abb. 3.2 sind die ozonbehandelten Blätter 3, 4 und 5 dargestellt.

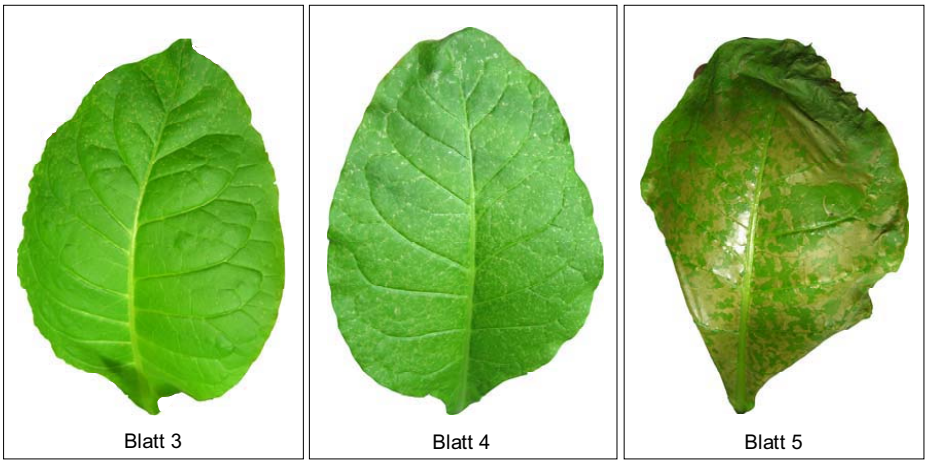


ABBILDUNG 3.2: Typische Blätter 3, 4 und 5 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 geerntet nach einem akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls 30 h nach Behandlungsbeginn. Als Blatt 1 wurde dabei das von Sprossscheitel aus gezählte erste Blatt definiert, das von der Blattspitze bis zum Blattgrund länger als 8 cm ist.

Die Extrakte der ozonexponierten Blätter 3, 4 und 5 (Bl. 3-5 O_3, n=8) sowie die Kontrollblätter 4 (Bl. 4 K, n=7) wurden mit der MRM-Methode zur Quantifizierung von TRP und SA-G gemessen. TRP und SA-G wurden verwendet, da sowohl für TRP, als eine Substanz des primären Metabolismus, als auch für SA-G, als eine Substanz des sekundären Metabolismus, bereits bekannt ist, dass sie unter Ozonstress in Pflanzen verstärkt (TRP) bzw. neu (SA-G) gebildet werden (Langebartels et al. 2002; Janzik et al. 2005). Zusätzlich zu der Bestimmung der Peakflächen von TRP und SA-G mit der MRM-Methode wurden auch die UV-Chromatogramme aller Probenextrakte von 190-400 nm aufgenommen.

In den UV-Chromatogrammen wurden die drei größten Peaks als CQA-Isomere anhand ihrer UV-Spektren im Vergleich zum UV-Spektrum eines *E*-5-CQA-Standards identifiziert. Ein Vergleich der UV-Chromatogramme der Bl. 3-5 O_3 mit denen der Bl. 4 K zeigte insbesondere, dass die CQAs in den Blättern 5 gegenüber den CQAs in den anderen Blattproben deutlich reduziert waren. Zusätzlich zur Bestimmung der Peakflächen von TRP und SA-G wurde daher auch die jeweilige Peakfläche der 5-CQA aus den UV-Chromatogrammen aller Proben bestimmt. Die ermittelten Peakflächen eines Metabolits

wurden jeweils auf 200 mg Frischgewicht normiert und anschließend der Mittelwert sowie der Standardfehler (SE) aller Blätter eines Blattalters bestimmt. Die erhaltenen Mittelwerte und SE der jeweiligen Metabolite werden in Abb. 3.3 und Abb. 3.4 miteinander verglichen.

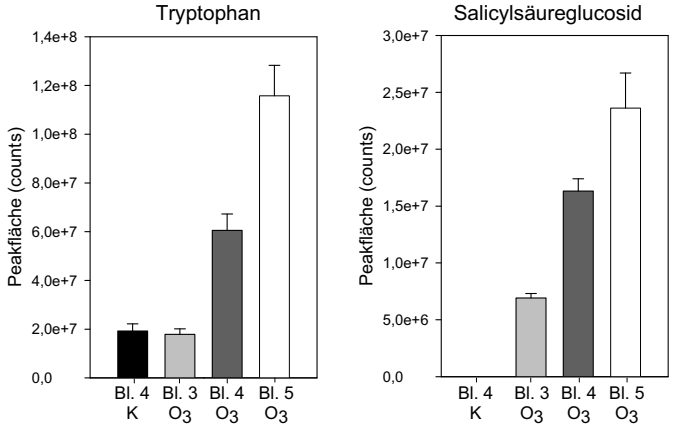


ABBILDUNG 3.3: MRM-Methode: Gemittelte Peakflächen von TRP und SA-G in Blättern unterschiedlichen Blattalters (jeweils n=8) ozonexponierter Tabakpflanzen (Bl. 3 O_3, Bl. 4 O_3, Bl. 5 O_3 und Blättern 4 (n=7) von Kontrollpflanzen (Bl. 4 K). Mittelwerte ± SE.

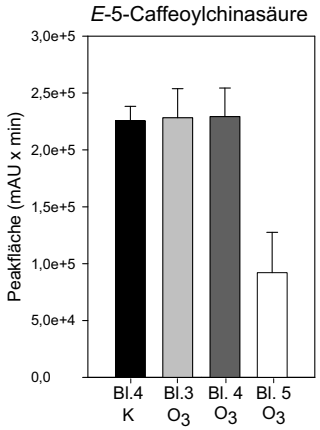


ABBILDUNG 3.4: UV-Detektion (λ=320 nm): Gemittelte Peakflächen von 5-CQA. Bestimmung in Blättern unterschiedlichen Blattalters (jeweils n=8) ozonexponierter Tabakpflanzen (Bl. 3 O_3, Bl. 4 O_3, Bl. 5 O_3) und Blättern 4 (n=7) von Kontrollpflanzen (Bl. 4 K). Mittelwerte ± SE.

Beim Vergleich der gemittelten Peakflächen von TRP sowie SA-G zeigte sich, dass mit zunehmenden Blattalter auch der Gehalt der beiden Metaboliten in den ozonexponierten Proben zunimmt (Abb. 3.3). Allerdings zeigten die Blätter 5 gleichzeitig im Mittel eine starke Abnahme an 5-CQA sowohl gegenüber den Kontrollblättern als auch den ozonexponierten Blättern 3 und 4 (Abb. 3.4). Viele der Blätter 5 wiesen einen hohen Anteil (70-90 % der Blattfläche) an abgestorbenem Pflanzengewebe auf (Abb. 3.2). Dieser hohe Anteil an totem Gewebe ist wahrscheinlicher auf eine direkte toxische Wirkung des Ozons als auf die Auswirkung der hypersensitiven Reaktion (HR) zurückzuführen. Im Gegensatz zu diesen stark geschädigten Blättern 5 zeigten die ozonexponierten Blätter 3 und 4 die für eine HR typischen punktartigen Läsionen (Wohlgemuth et al. 2002), wobei bei den Blättern 3 die Symptome schwächer ausgeprägt waren (Abb. 3.2). Sowohl die Blätter 4 als auch die Blätter 3 wiesen vergleichbare Gehalte an 5-CQA gegenüber den Kontrollblättern auf (Abb. 3.4). Die Blätter 3 wiesen jedoch keine erhöhten Gehalte an TRP auf. Des Weiteren wurde zwar SA-G auch bereits in den Blättern 3 detektiert, jedoch zeigten die Blätter 4 sowohl für TRP als auch für SA-G höhere Gehalte (Abb. 3.3), so dass die Blätter 4 für alle Experimente ausgewählt wurden.

4 Untersuchung der ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetabolite in Tabak

4.1 Ermittlung von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in Tabak

Für die detaillierte Analyse von Unterschieden in den Metabolitenprofilen von ozoninduzierten Tabakproben und Kontrollproben wurden Messungen mit der entwickelten EMS-Methode (Kap. 3.2) durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, phenolische Sekundärmetabolite zu ermitteln, die aufgrund eines akuten Ozonpulses in den Blättern 4 der ozonbehandelten Tabakpflanzen der Varietät L. cv Bel W3 gegenüber den entsprechenden Kontrollproben verstärkt gebildet werden. Die angewendete Probenvorbereitung sowie die EMS-Methode waren zuvor für die Substanzklasse der Phenole optimiert worden (Kap. 3.1.2 und Kap. 3.2). Für die Untersuchungen wurden in zwei Experimenten die Blätter 4 von jeweils acht Tabakpflanzen 30 h nach Beginn der Ozonexposition als Mischproben geerntet ($PoolO_3A$ und $PoolO_3B$). In beiden Experimenten wurden zur gleichen Zeit die Blätter 4 von je acht Kontrollpflanzen als Mischproben geerntet (PoolKonA und PoolKonB). Die Tabakblätter wurden für die vergleichende Analyse 30 h nach Beginn der Ozonexposition geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die ozonbehandelten Blattproben hohe Gehalte an den induzierten, löslichen phenolischen Substanzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen aufweisen (Janzik et al. 2005; Francini et al. 2007).

Für die Ermittlung der ozoninduzierten Sekundärmetabolite wurden sechs Extrakte der $PoolO_3A$ sowie der PoolKonA mit der EMS-Methode gemessen. Nach Dekonvolution der EMS-Rohdaten mit dem Component Detection Algorithm (CODA) der Software ACD/MS Manager (ACD/Labs, Torronto, Kanada) wurde jeweils eine vergleichende Analyse der erhaltenen reduzierten TICs eines Extraktes von $PoolO_3A$ und eines Extraktes von PoolKonA durchgeführt. Die vergleichende Analyse basierte auf den ermittelten Masse zu Ladungsverhältnissen (m/z) sowie den Retentionszeiten (RTs) der Signale. Peaks wurden als mögliche induzierte Metabolite in Erwägung gezogen, wenn sie mindestens ein Signal/Rausch (S/N) -Verhältnis von 3 in $PoolO_3A$ aufwiesen und außerdem die Peakhöhe einer ermittelten Masse in allen sechs $PoolO_3A$ im Vergleich zu der Peakhöhe der ermittelten Masse in allen sechs PoolKonA mindestens 1,5-fach höher war. Die auf diese Weise

identifizierten Metabolite mussten die gleichen Anforderungen für die Extrakte von PoolO_3B und PoolKonB erfüllen. Auf diese Weise wurden insgesamt 24 Metabolite ermittelt, die entweder nur in den ozonexponierten Proben oder mit einer mindestens 1,5-fach größeren Peakhöhe in den Extrakten von PoolO_3A und PoolO_3B im Vergleich zu den Extrakten von PoolKonA und PoolKonB detektierbar waren (Abb. 4.1). Des Weiteren wurden acht ozonexponierte Einzelblattproben, die 10 h nach Behandlungsbeginn geerntet wurden, und die entsprechenden acht Kontrollblätter auf die gleiche Weise untersucht wie die 30 h-Proben. Mit dieser vergleichenden Analyse wurde ein weiterer Metabolit mit der quasimolekularen Masse m/z 137 und einer RT von 20,1 min ermittelt.

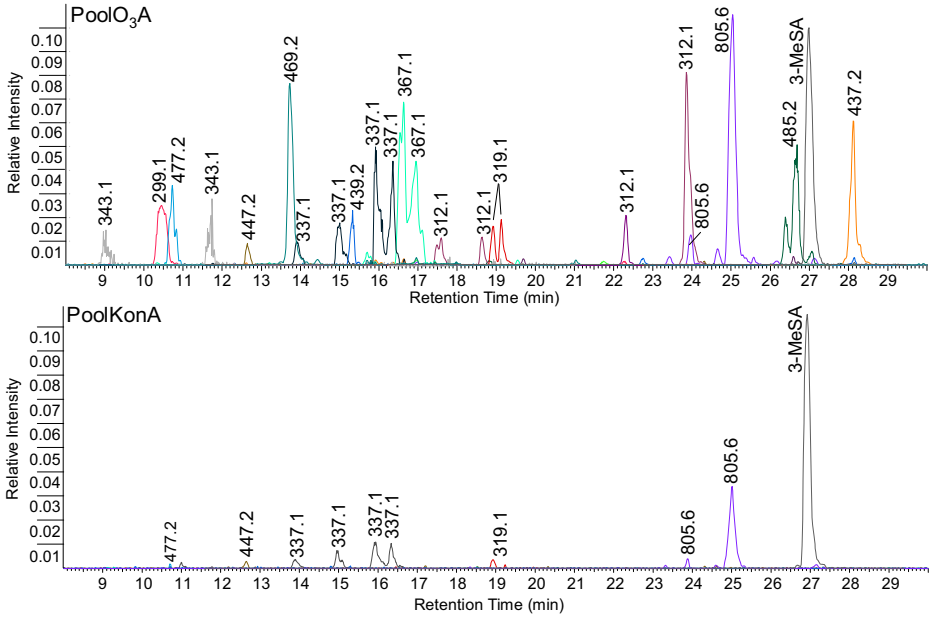
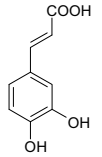


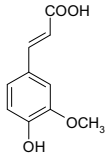
ABBILDUNG 4.1: Vergleichende Analyse der reduzierten TICs einer ozonexponierten Tabakblätterprobe 30 h (PoolO_3A) und der entsprechenden Kontrollprobe (PoolKonA) zur Bestimmung der ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetabolite. Die reduzierten TICs wurden erhalten durch Dekonvolution der EMS-Rohdaten mit dem Component Detection Algorithm (CODA) der Software ACD/MS Manager. Die Zahlen an den Peaks repräsentieren die Masse zu Ladungsverhältnisse (m/z) der ermittelten Metabolite. Jede Farbe repräsentiert dabei ein m/z. 3-Methylsalicylsäure (3-MeSA) wurde als interner Standard verwendet.

4.2 Strukturaufklärung von Metaboliten in Tabak mit LC-MS/MS

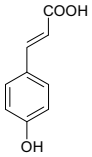
Für die Identifizierung von Metaboliten in Tabak wurden LC-ESI-MS/MS-Experimente mit Extrakten von $PoolO_3A$ und $PoolO_3B$ im EPI-Modus durchgeführt. Die Optimierung der substanzspezifischen Parameter für die Fragmentierungen wird in Kap. 3.5 vorgestellt. Die Strukturen der in Tabak identifizierten *E*-Isomere der Metabolite sind in Abb. 4.2 aufgeführt.



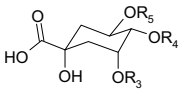
Kaffeesäure



Ferulasäure

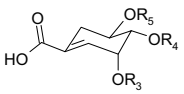


p-Coumarsäure



Chinasäure ($R_3 = R_4 = R_5 = H$)

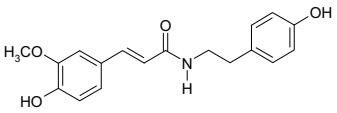
Metabolit	R_3	R_4	R_5
E-3-Caffeoylchinasäure	Kaffeesäure	H	H
E-4-Caffeoylchinasäure	H	Kaffeesäure	H
E-5-Caffeoylchinasäure	H	H	Kaffeesäure
E-4-p-Coumaroylchinasäure	H	Coumarsäure	H
E-5-p-Coumaroylchinasäure	H	H	Coumarsäure
E-5-Feruloylchinasäure	H	H	Ferulasäure
3,4-diCaffeoylchinasäure	Kaffeesäure	Kaffeesäure	H
3,5-diCaffeoylchinasäure	Kaffeesäure	H	Kaffeesäure
4,5-diCaffeoylchinasäure	H	Kaffeesäure	Kaffeesäure



Shikimisäure ($R_3 = R_4 = R_5 = H$)

Metabolit	R_3	R_4	R_5
E-3-p-Coumaroylshikimisäure	Kaffeesäure	H	H

Metabolit	R
Salicylsäure	OH
Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid	ß-D-Glucose



Feruloyltyramin

ABBILDUNG 4.2: Strukturformeln der identifizierten Sekundärmetabolite in Tabak

Die substanzspezifischen Parameter der Metabolite sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Zur zusätzlichen Absicherung der identifizierten Strukturen wurden, bei Substanzen für die keine Standards zur Verfügung standen, FTICR-MS-Messungen durchgeführt, um anhand der akkuraten Massen die Summenformeln der Metabolite zu bestimmen.

TABELLE 4.1: LC-MS/MS Charakteristika der identifizierten phenolischen Metabolite

Nr.	Substanz	MS $[M-H]^-$	RT (min)	MS/MS Fragmentionen (m/z (relative Häufigkeit, %))	CE (V)
1	*Z*-3-Caffeoylchinasäure*	353	8,0	191 (100), 179 (75), 173 (9), 161 (5) 135 (12)	-20
2	*E*-3- Caffeoylchinasäure*	353	9,6	191 (100), 179 (75), 173 (9), 161 (5) 135 (12)	-20
3	*Z*-4- Caffeoylchinasäure*	353	11,4	191 (50), 179 (80), 173 (100), 155 (3), 135 (8)	-20
4	Salicylsäureglucosid*	299	10,9	299 (7), 137, (100), 93 (9)	-20
5	*E*-4- Caffeoylchinasäure*	353	13,0	191 (50), 179 (80), 173 (100), 155 (3), 135 (8)	-20
6	*E*-5- Caffeoylchinasäure*	353	13,6	191 (100), 179 (8), 173 (2), 161 (2)	-20
7	Z-5- Caffeoylchinasäure*	353	14,4	191 (100), 179 (8), 173 (2), 161 (2)	-20
8	*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure	337	14,5	337 (20), 319 (1), 191 (2), 173 (100), 163 (3), 145 (1), 137 (1), 119 (1)	-20
9	*E*-4-p- Coumaroylchinasäure	337	15,2	337 (18), 319 (1), 191 (1), 173 (100), 163 (7), 145 (1), 137 (1), 119 (1)	-20
10	*E*-5-p- Coumaroylchinasäure	337	16,1	337 (15), 319 (1), 191 (100), 173, (2), 163 (7), 145 (1), 137 (1), 119 (1)	-20
11	*Z*-5-p- Coumaroylchinasäure	337	16,5	337 (14), 319 (2), 191 (100), 173 (1), 163 (3), 145 (1) 137 (1), 119 (1)	-20
12	*E*-5-Feruloylchinasäure	367	16,7	193 (12), 191 (100), 173 (3), 134 (8), 111 (2), 93 (6)	-40
13	*Z*-5-Feruloylchinasäure	367	17,1	193 (10), 191 (100), 173 (2), 134 (5), 127 (1), 111 (1), 93 (3)	-40
14	*Z*-Feruloyltyramin	312	17,6	312 (93), 297 (30), 270 (4), 253 (2), 190 (22), 178 (100), 176 (22), 148 (38), 135 (12)	-30
15	*E*-Feruloyltyramin	312	18,8	312 (30), 297 (30), 270 (1), 253 (8), 190 (22), 178 (100), 176 (18), 148 (38), 135 (18)	-30
16	*E*-3-p-Coumaroylshikimisäure	319	19,2	319 (60), 275 (1), 173 (2), 163 (100), 155 (12), 145 (2), 137 (10), 119 (1), 111 (1)	-20
17	*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure	319	19,3	319 (60), 275 (1), 173 (2), 163 (100), 155 (12), 145 (1), 137 (9), 119 (1), 111 (1)	-20
18	3,4-Dicaffeoylchinasäure	515	19,6	353 (20); 335 (25); 191 (52); 179 (70); 173 (100); 161 (30); 135 (5)	-30
19	Salicylsäure*	137	20,5	137 (5), 93 (100)	-25
20	3,5-Dicaffeoylchinasäure	515	20,7	353 (15); 335 (0); 191 (100); 179 (38); 173 (2); 161 (2); 135 (5)	-30
21	4,5-Dicaffeoylchinasäure	515	21,2	353 (25); 335 (0); 191 (75); 179 (82); 173 (100); 161 (18); 135 (3)	-30

22	*Z*-Feruloyltyramin	312	22,3	312 (92), 297 (50), 270 (2), 253 (18), 190 (35), 178 (100), 176 (22), 148 (58), 135 (12)	-30
23	*E*-Feruloyltyramin	312	24,0	312 (55), 297 (40), 270 (2), 253 (10), 190 (22), 178 (100), 176 (18), 148 (40), 135 (12)	-30

Die Metabolite sind nach ihrer Elutionsreihenfolge von einer C8-Säule aufgeführt. Die Identität von Substanzen, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, wurde durch Vergleich der Retentionszeit (RT) und der Fragmentspektren von Standards bestätigt.

4.2.1 Ozoninduzierte Metabolite

4.2.1.1 Isomere der Feruloylchinasäure

Die Peaks mit der quasimolekularen Masse m/z 367 wurden als Isomere der Feruloylchinasäure (FQA) (Substanzen 12 und 13 in Tab. 4.1) identifiziert. Die Identifizierung der Substanzen als FQA-Isomere wurde durch den Vergleich mit Fragmentspektren von Standards der China- und Ferulasäure sowie mit Fragmentspektren der FQAs aus der Literatur (Clifford et al. 2003) abgesichert. Aus der Messung der akkuraten Massen der beiden quasimolekularen Ionen mit FTICR-MS wurde jeweils die Summenformel $C_{17}H_{20}O_9$ abgeleitet, die mit der Summenformel der FQA übereinstimmt. Beide Substanzen wiesen identische Fragmentspektren im EPI-Modus auf. Das Fragment m/z 191 als Hauptpeak des Fragmentspektrums wies auf eine Chinasäure in der Struktur hin [Chinasäure-H]$^-$. Als weitere typische Fragmente der Chinasäure wurden m/z 173, m/z 127 und m/z 111 ermittelt. Das m/z 193 deutete auf eine Ferulasäure in der Struktur hin [Ferulasäure-H]$^-$. Dieses Fragment wies für die Substanz 12 eine relative Häufigkeit von 12 % und für die Substanz 13 von 10 % auf. Neben dem Fragment m/z 193 wurden auch die für eine Fragmentierung der Ferulasäure typischen Fragmente m/z 134 und m/z 93 detektiert.

Die Esterbindung der FQA kann in 3-, 4- oder 5-Position der Chinasäure vorliegen. In einer Studie von Clifford et al. (2003) wurde gezeigt, dass sich die drei Konstitutionsisomere anhand ihrer LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren unterscheiden lassen, da die jeweiligen relativen Intensitäten der entstehenden Fragmente von der Position der Esterbindung im Molekül abhängen. Die Substanzen 12 und 13 zeigten im Fragmentspektrum einen Hauptpeak mit m/z 191 und das Fragment mit m/z 193 mit einer relativen Häufigkeit von 12 % für Substanz 12 und 10 % für Substanz 13. Anhand des von Clifford et al. (2003) entwickelten Schemas zur Identifizierung von Hydroxyzimtsäurederivaten mit LC-MS^n würde es sich bei

den Substanzen 12 und 13 aufgrund dieser Merkmale im Fragmentspektrum um 5-FQA-Isomere handeln.

Kiehne (1996) zeigte, dass aus dem Standard 5-CQA in wässriger Na_2CO_3-Lösung infolge einer Acylmigration die 4- und 3-Iomere der CQA gebildet werden. Dabei wurde zuerst das 4-Isomer und dann das 3-Isomer gebildet. Zur Überprüfung, ob es sich bei den identifizierten FQAs der Substanzen 12 und 13 um die 5-Isomere handelt, wurden Extrakte einer PoolO_3A-Probe auf einer C18-SPE-Kartusche aufkonzentriert, in einer SpeedVac bis zur Trockne eingeengt und anschließend in Wasser aufgenommen. Die Probe wurde 0 min, 5 min und 30 min nach Zugabe einer wässrigen Na_2CO_3-Lösung im EPI-Modus zur Fragmentierung der Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 367 gemessen. Nach 0 min wurden nur die Substanzen 12 und 13 (Tab. 4.1) detektiert. Nach einer Wartezeit von 5 min wurden zwei zusätzliche FQA-Isomere mit RT=14,9 min und RT=15,8 min detektiert. Nach einer Wartezeit von 30 min wurden zu den bereits detektierten vier FQA-Isomeren zwei weitere mit RTs von 12,5 min und 13,0 min im EPI-Modus detektiert (Abb. 4.3).

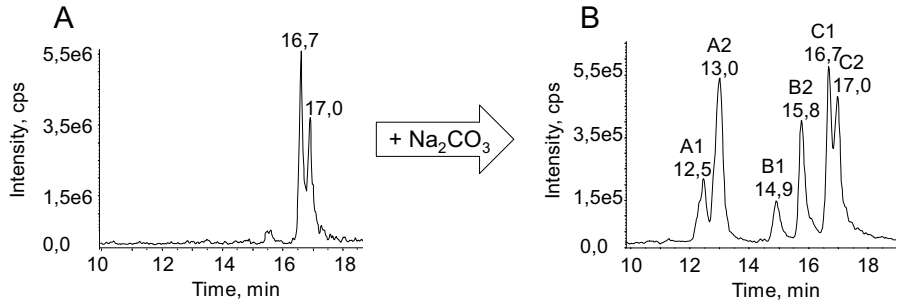


ABBILDUNG 4.3: Extracted Ion Chromatogramme der FQA-Isomere aus dem Probenextrakt vor (A) und nach der Isomerisierung in wässriger Na_2CO_3-Lösung (30 min) (B).

Peaks A1/A2 und B1/B2 zeigten jeweils, wie die Substanzen 12 und 13 (Peaks C1/C2), identische Fragmentspektren (Abb. 4.4). Anhand der Reihenfolge der Isomerisierung in wässriger Na_2CO_3-Lösung konnten die ermittelten Fragmentspektren den jeweiligen FQA-Isomeren zugeordnet werden. Übereinstimmend mit der Untersuchung von Clifford et al. (2003 und 2005) zeigte die 3-FQA (Peaks A1/A2) im Fragmentspektrum einen Hauptpeak mit m/z 193 $[Ferulasäure\text{-}H]^-$ und die 4-FQA (Peaks B1/B2) wies einen Hauptpeak mit

m/z 173 [Chinasäure-H-H_2O] auf (Abb. 4.4). Das Fragmentspektrum der 5-FQA zeigte als Hauptpeak das m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ begleitet durch ein schwächeres Signal des m/z 193 [Ferulasäure-H]$^-$ (Abb. 4.4), so dass die Identifizierung der Substanzen 12 und 13 als 5-Isomere der FQA auf diese Weise abgesichert wurde. Außerdem wurde dadurch gezeigt, dass das von Clifford et al. (2003) entwickelte Schema auf die in dieser Arbeit ermittelten Fragmentspektren zur Identifizierung der Hydroxyzimtsäurederivate anwendbar war.

Die Substanzen 12 und 13 sind Stereoisomere, da es sich bei beiden Substanzen um eine FQA mit einer Esterbindung in 5-Position handelt. Sie unterscheiden sich räumlich durch *E*- und *Z*-Isomerie der Doppelbindung in der Ferulasäureeinheit des FQA-Moleküls. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein beträchtlicher Anteil der *E*-Phenylpropanoide durch Exposition mit UV-Licht in die entsprechende *Z*-Form durch Isomerisierung überführt wird (Parr & Bolwell 2000). Eine Exposition eines Extraktes von PoolO_3A mit UV-Licht (λ=366 nm, t=1 h) führte zu einer Verringerung der Peakfläche der Substanz 12 und zu einer Erhöhung der Peakfläche der Substanz 13. Daher wurde die Substanz 12 als *E*-5-FQA und die Substanz 13 als *Z*-5-FQA (Tab. 4.1) identifiziert.

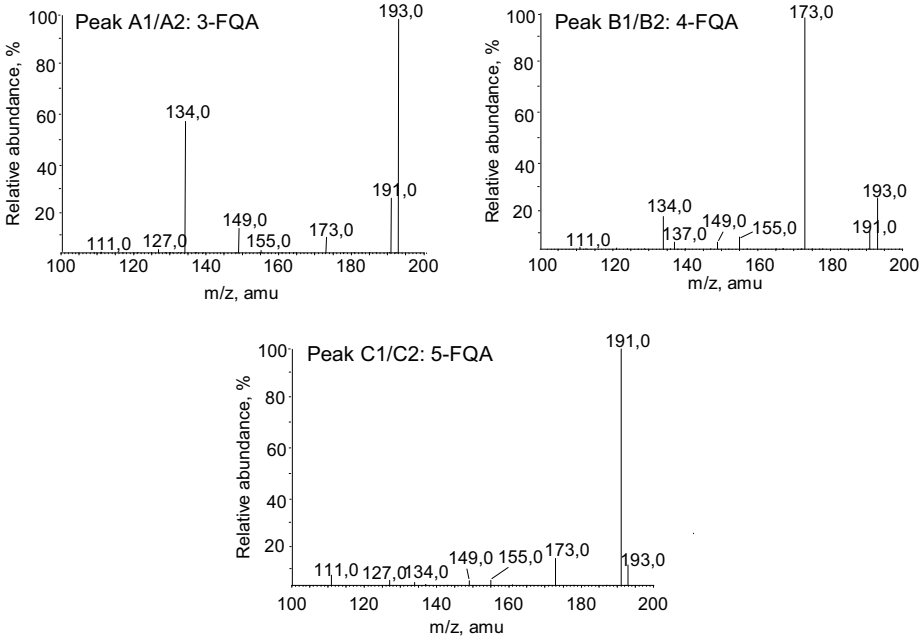


ABBILDUNG 4.4: Fragmentierung der 3-, 4- und 5-FQA-Isomere im EPI Modus (m/z=367, CE=-30V) aus einem Probenextrakt nach der Isomerisierung der 5-FQA durch Zugabe einer wässrigen Na_2CO_3-Lösung. Eine Fragmentierung der Isomere erfolgte dabei 30 min nach Zugabe der wässrigen Na_2CO_3-Lösung. Peaks A1/A2, B1/B2 und C1/C2 (Abb. 4.3) lieferten jeweils identische Fragmentspektren.

4.2.1.2 Isomere der p-Coumaroylchinasäure

Die Substanzen 8-11 mit einer quasimolekularen Masse m/z 337 wurden aufgrund ihrer Fragmentspektren im EPI Modus als Isomere der p-Coumaroylchinasäure (p-CoQA) identifiziert (Tab. 4.1). Die Strukturaufklärung wurde bestätigt durch den Vergleich mit Fragmentspektren von Standards der p-Coumarsäure und der Chinasäure sowie durch den Vergleich mit Fragmentspektren der p-CoQAs aus der Literatur (Clifford et al. 2003; Sanchez-Rabaneda et al. 2004). Die durch Messungen der akkuraten Massen mit dem FTICR-MS ermittelte Summenformel $C_{16}H_{18}O_8$ stimmte des Weiteren auch mit der Summenformel der p-CoQA überein. Die Fragmentspektren aller vier Substanzen hatten als Gemeinsamkeit einen MS/MS-Peak bei m/z 319. Dabei handelte es sich um das p-Coumarsäureion aus dem ein Molekül Wasser abgespalten worden war

[p-Coumarsäure-H-H_2O]$^-$. Als weitere Gemeinsamkeiten wurden in allen Fragmentspektren vergleichbare Intensitäten an den Fragmenten m/z 163, m/z 145 und m/z 119 ermittelt, die von der p-Coumarsäureeinheit stammten, sowie das Fragment m/z 137, das von der Chinasäureeinheit stammte. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch die Substanzen 8 und 9 einen Hauptpeak bei m/z 173 [Chinasäure-H-H_2O]$^-$ und nur schwache Signale des m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ und des m/z 163 [p-Coumarsäure-H]$^-$. Wohingegen die Substanzen 10 und 11 einen Hauptpeak bei m/z 191 und nur schwache Signale des m/z 163 und des m/z 173 im Fragmentspektrum aufwiesen. Aufgrund der unterschiedlichen Hauptpeaks, die jeweils von der Chinasäureeinheit im p-CoQA Molekül stammten, wurden die Substanzen 8 und 9 als 4-p-CoQA und die Substanzen 10 und 11 als 5-p-CoQA identifiziert (Clifford et al. 2003; Clifford et al. 2005). Bei den Substanzen 8 und 9 sowie den Substanzen 10 und 11 handelte es sich daher um Stereoisomere, die sich in der *E*- oder *Z*-Konfiguration der p-Coumarsäureeinheit unterscheiden. Eine UV-Exposition der Probenextrakte (λ=366 nm, t=1 h) führte zu einer Reduktion der Peakfläche der Substanzen 9 und 10, wohingegen sich die Peakfläche der Substanzen 8 und 11 vergrößerte. Die Substanzen 8 und 9 wurden deswegen als *Z*- und *E*-4-p-CoQA und die Substanzen 10 und 11 als *E*- und *Z*-5-p-CoQA identifiziert.

4.2.1.3 Isomere der p-Coumaroylshikimisäure

Die Substanzen 16 und 17 (Tab. 4.1) zeigten beide ein quasimolekulares Ion m/z 319 sowie die gleichen MS/MS-Fragmente im EPI-Modus (Abb. 4.5). Die quasimolekularen Ionen mit m/z 319 der beiden Substanzen deuteten an, dass beide ein Molekül H_2O weniger in der Struktur aufweisen, als die p-CoQA-Isomere mit der quasimolekularen Masse m/z 337. Die Fragmentspektren der p-CoQA-Isomere zeigten auch ein Fragment mit m/z 319, das aufgrund einer Abspaltung von Wasser aus dem quasimolekularen Ion gebildet wurde. Ein Verlust an Wasser, der in der Chinasäureeinheit der p-CoQA-Isomere möglich wäre, könnte zur Bildung einer Shikimisäureeinheit geführt haben. In den Fragmentspektren der p-CoQA-Isomere waren die Fragmente mit m/z 173 [Chinasäure-H-H_2O]$^-$ sowie m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ vorhanden, die aus der Chinasäureeinheit stammten. Die Substanzen 16 und 17 zeigten auch ein MS/MS-Fragment des m/z 173, jedoch keines des m/z 191. Die Fragmente m/z 173 der Substanzen 16 und 17 könnten daher von einer Shikimisäure im Molekül stammen [Shikimisäure-H]$^-$. Auch die Fragmente m/z 155, m/z 137 und m/z 111 der Substanzen 16 und

17 waren, durch das Fehlen des Fragments m/z 191, typisch für eine Shikimisäureeinheit im Molekül, da bei der Fragmentierung eines Shikimisäurestandards die gleichen Fragmente erhalten wurden. Der Hauptpeak der Fragmentspektren der Substanzen 16 und 17 war das Signal des m/z 163, das darauf hindeutete, dass eine p-Coumarsäure in der Struktur enthalten war. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass die bei einer Fragmentierung eines p-Coumarsäurestandards entstehenden Fragmente m/z 145, m/z 137 und m/z 111 auch in den Fragmentspektren der Substanzen 16 und 17 detektiert wurden. Das Fragment m/z 145 war hierbei auf einen Neutral Loss der Shikimisäure (m/z 174) zurückzuführen. Das Fragment m/z 155 in den Fragmentspektren der Substanzen 16 und 17 zeigte einen Neutral Loss der p-Coumarsäure (m/z 164) an. Der Hauptpeak in den Fragmentspektren der Substanzen 16 und 17 war das Signal des m/z 163 [Coumarsäure-H]$^-$. Nach dem Schema von Clifford et al. (2003 und 2005) zur Identifizierung von Hydroxyzimtsäurederivaten mit LC-MS^n handelt es sich um ein 3-Isomer der HCA, wenn es sich bei dem Hauptpeak im Fragmentspektrum der HCA um das quasimolekulare Ion der Zimtsäurederivateinheit [Zimtsäurederivat-H]$^-$ handelt. Durch die Übertragung dieses Schemas auf die Fragmentspektren der p-CoShiA-Stereoisomere, konnten die Substanzen 16 und 17 als 3-Isomere der p-CoShiA identifiziert werden. Eine UV-Exposition eines PoolO_3A-Extraktes führte zu einer Verringerung der Peakfläche der Substanz 16 und zu einer Vergrößerung der Peakfläche der Substanz 17, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei Substanz 16 um *E*-3-p-CoShiA und bei Substanz 17 um *Z*-3-p-CoShiA handelt.

Zur weiteren Absicherung der Identifizierung wurde durch FTICR-MS-Messungen anhand der gemessenen akkuraten Masse die Summenformel des quasimolekularen Ions m/z 319,08257 (Substanz 16) mit $C_{16}H_{16}O_7$ berechnet (Abb. 4.5). Für die Substanz 17 wurde die gleiche Summenformel bestimmt. Die durch Messung der akkuraten Massen ermittelte Summenformel stimmte mit der berechneten Summenformel der p-CoShiA überein. Die Abweichung der gemessenen akkuraten Masse zur berechneten Masse der Summenformel lag für die angegebene akkurate Masse bei 0,8 ppm. Dies ist eine sehr gute Massengenauigkeit. Im Vergleich dazu erreichte ein LC-ESI Quadrupol Time of Flight MS bei der Bestimmung der akkuraten Masse von Flavonoiden aus komplexen Probenmatrices eine Massengenauigkeit von 20-50 ppm (Farag et al. 2007).

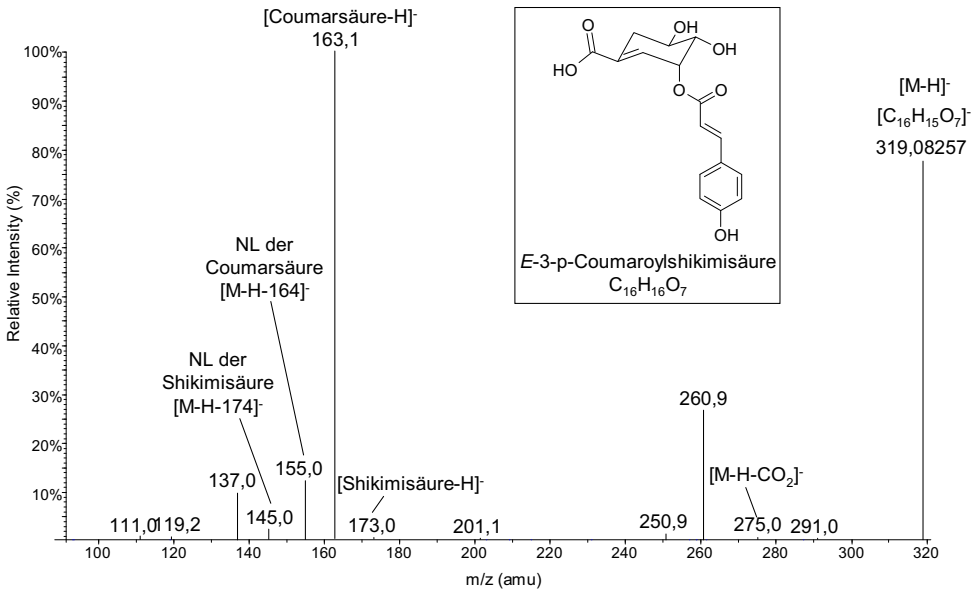


ABBILDUNG 4.5: LC-ESI-MS/MS-Fragmente und Strukturformel des ozoninduzierten Metabolits *E*-3-p-Coumaroylshikimisäure (Substanz 16 aus Tab. 4.1). Für die quasimolekulare Masse m/z 319 ist die durch FTICR-MS/MS-Messungen ermittelte akkurate Masse sowie die daraus berechnete Summenformel angegeben. Neutral Loss (NL).

4.2.1.4 Salicylsäure und Salicylsäure-β-D-glucopyranosid

Substanz 19 mit einer quasimolekularen Masse m/z 137 und Substanz 4 mit einer quasimolekularen Masse m/z 299 wurden als SA und SA-G identifiziert (Tab. 4.1). Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich der RTs und der erhaltenen Fragmentspektren mit Standards. Das bei der Fragmentierung der SA-G erhaltene Fragment m/z 137 [Salicylsäure-H]$^-$ wurde dabei auf einen Neutral Loss der Glucoseeinheit zurückgeführt. Das MS/MS-Fragment mit m/z 93 in den Fragmentspektren von SA und SA-G wurde vermutlich aufgrund einer Decarboxylierung der Salicylsäureeinheit [Salicylsäure-H-CO_2]$^-$ gebildet.

4.2.1.5 Feruloyltyramine

Die Substanzen 14, 15, 22 und 23 wiesen alle ein quasimolekulares Ion [M-H]$^-$ des m/z 312 auf und zeigten alle vergleichbare Fragmentspektren im EPI Modus (Tab. 4.1). Das Fragmentspektrum der Substanz 23 ist, beispielhaft für alle vier Substanzen, in Abb. 4.7

aufgeführt. Die gerade Zahl des m/z mit 312 zeigte an, dass ein Stickstoffatom in den Verbindungen dieser vier Substanzen enthalten war. Alle Substanzen zeigten außerdem ein Fragment des m/z 297, das auf einen Neutral Loss eines Methylradikals zurückgeführt werden könnte $[M\text{-}H\text{-}^{\cdot}CH_3]^-$. Durch einen Vergleich der Fragmentspektren mit einem Fragmentspektrum von Dauwe et al. (2007) wurden die Substanzen 14, 15, 22 und 23 vorläufig als Isomere des Feruloyltyramins (FT) identifiziert. Der Neutral Loss des Methylradikals konnte daher der Ferulasäureeinheit des Moleküls zugeordnet werden. Zusätzlich zu den Fragmentspektren stimmten auch die UV-Spektren der Substanzen 14, 15, 22 und 23 (Abb. 4.6) mit dem UV-Spektrum von FT in Dauwe et al. (2007) gut überein.

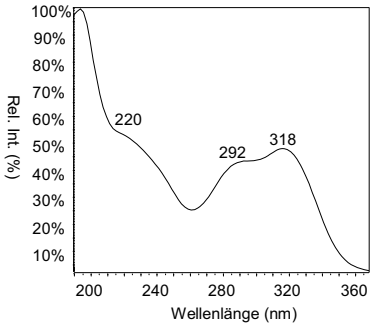


ABBILDUNG 4.6: UV-Spektrum eines Isomers von Feruloyltyramin (Substanz 23 aus Tab. 4.1).

Die Identifizierung der Substanzen als Isomere des FTs wurde des Weiteren durch Messungen der akkuraten Massen mit einem FTICR-MS abgesichert. In Abb. 4.7 sind die bei einer Fragmentierung der quasimolekularen Masse m/z 312 erhaltenen akkuraten Massen sowie die entsprechend daraus berechneten Summenformeln angegeben. Die mit dem FTICR-MS erhaltene Massengenauigkeit lag für die ermittelten Summenformeln zwischen 0,3 und 1,4 ppm. Für das quasimolekulare Ion der m/z 312 wurde anhand der akkuraten Massen jeweils die Summenformel $C_{18}H_{19}NO_4$ ermittelt, die mit der Summenformel des FTs übereinstimmt.

Eine Exposition des Probenextrakts mit UV-Licht (λ=366 nm) führte zu einer Vergrößerung der Peakfläche von Substanz 14 und 22 und zu einer Verkleinerung der Peakflächen der Substanzen 15 und 23. Die Substanzen 14 und 22 wurden daher als zwei verschiedene *Z*-Isomere des FTs und die Substanzen 15 und 23 als zwei verschiedene *E*-Isomere des FTs identifiziert. Die zwei verschiedenen *Z*-Isomere sowie die zwei verschiedenen *E*-Isomere unterscheiden sich vermutlich in der Position der OH-Gruppen oder der OCH_3-Gruppe.

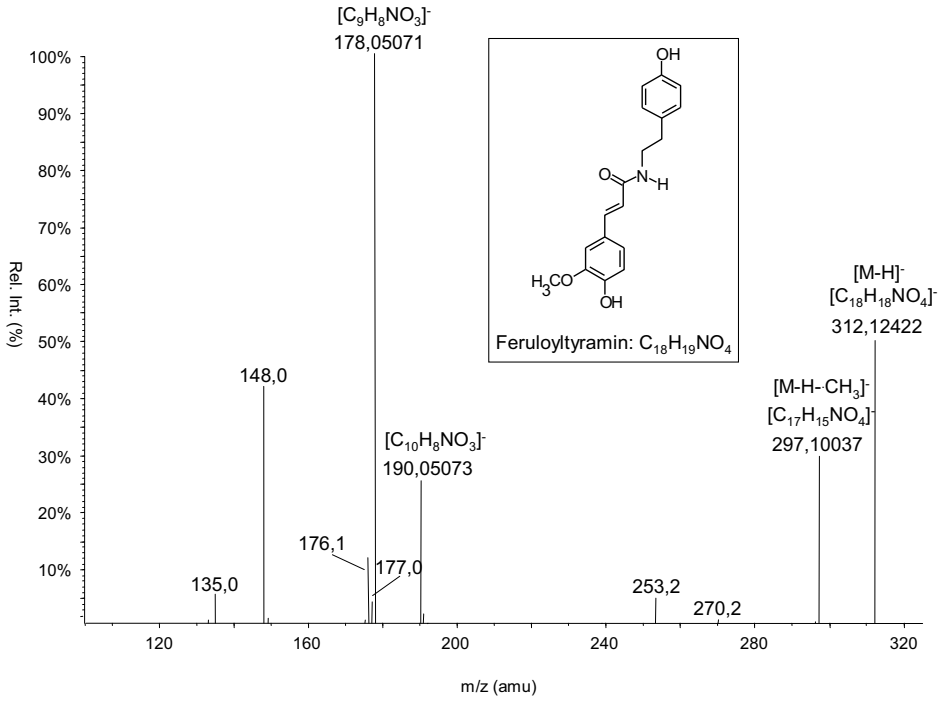


ABBILDUNG 4.7: LC-ESI-MS/MS-Fragmente (EPI Modus) und Strukturformel des ozoninduzierten Isomers von Feruloyltyramin (Substanz 23 aus Tab. 4.1). Für die Fragmente m/z 312, m/z 297, m/z 190 und m/z 178 sind die durch FTICR-MS/MS-Messungen ermittelten akkuraten Massen sowie die daraus berechneten Summenformeln angegeben.

4.2.2 Metabolite mit einer hohen antioxidativen Kapazität, die aber nicht unter Ozonstress verstärkt gebildet werden

4.2.2.1 Isomere der Caffeoylchinasäure

Die Substanzen 1-3 und 5-7 mit einer quasimolekularen Masse $[M-H]^-$ von m/z 353 wurden aufgrund ihrer Fragmentspektren als Isomere der CQA identifiziert (Tab. 4.1). Die Strukturaufklärung wurde bestätigt durch den Vergleich mit Fragmentspektren von Standards und Fragmentspektren aus der Literatur (Clifford et al. 2005). Die Substanzen 1 und 2 wurden als 3-CQA-Isomere mit einem Hauptpeak der m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ sowie dem Fragment der m/z 179 [Kaffeesäure-H]$^-$ mit einer relativen Häufigkeit von 75 % identifiziert. Bei den Substanzen 3 und 5 handelte es sich um 4-CQA-Isomere, die im Fragmentspektrum einen

Hauptpeak der m/z 173 [Chinasäure-H-H_2O]$^-$ aufwiesen. Als 5-CQA-Isomere wurden die Substanzen 6 und 7 identifiziert, da sie einen Hauptpeak der m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ und nur ein schwaches Signal der m/z 179 [Kaffeesäure-H]$^-$ zeigten. Durch die Umsetzung eines *E*-5-CQA-Standards in wässriger Na_2CO_3-Lösung wurden infolge einer Acylmigration zuerst die *E*-4-CQA und dann die *E*-3-CQA gebildet (Kiehne 1996). Eine UV-Exposition des isomerisierten E-5-CQA-Standards (λ=366 nm, t=1 h) führte zur Bildung von *Z*-3-CQA, *Z*-4-CQA und *Z*-5-CQA. Durch den Vergleich der erhaltenen Fragmentspektren und RTs wurden die Substanzen 2, 4 und 7 als *Z*-Isomere und die Substanzen 1,3 und 6 als *E*-Isomere der CQA identifiziert. Die 3- und 4- CQA zeigten somit eine Elutionsreihenfolge des *Z*-Isomers vor dem *E*-Isomer, wohingegen sich die Elutionsreihenfolge der 5-CQA umkehrte. Diese Elutionsreihenfolge wurde für 3-, 4- und 5-CQA auch von Brandl und Herrmann (1983) auf einer RP 18-Säule ermittelt. Bei der 3- und 4-CQA wies somit jeweils das *Z*-Isomer eine höhere Hydrophilie als das *E*-Isomer auf, wohingegen es sich bei der 5-CQA umkehrt (Clifford et al. 2008).

4.2.2.2 Isomere der Dicaffeoylchinasäure

Die Substanzen 18, 20 und 21 mit der quasimolekularen Masse [M-H]$^-$ von m/z 515 wurden vorläufig als diCQAs identifiziert (Tab. 4.1). Die Fragmentspektren der drei Substanzen wiesen alle das Fragment m/z 353 in vergleichbaren Intensitäten auf, bei dem es sich um das quasimolekulare Ion der CQA handelte. Anhand der Intensitäten der aus der CQA-Einheit des diCQA Moleküls gebildeten Fragmente sowie des Vorhandenseins bzw. nicht Vorhandenseins des Fragments der m/z 335 konnte die Verknüpfung der Kaffeesäuren an die Chinasäure für die Substanzen 18, 20 und 21 durch Vergleich mit Fragmentspektren aus der Literatur (Clifford et al. 2005) ermittelt werden. Die Substanzen 18 und 21 wiesen beide einen Hauptpeak mit m/z 173 [Chinasäure-H-H_2O]$^-$ sowie ein Fragment m/z 179 [Kaffeesäure-H]$^-$ mit einer relativen Häufigkeit von 70 % für Substanz 18 und 82 % für Substanz 21 auf. Im Gegensatz zur Substanz 21 zeigte Substanz 18 zusätzlich ein Fragment m/z 335, das einem Neutral Loss der Kaffeesäure zugeordnet werden konnte [M-H-Kaffeesäure]$^-$. Anhand dieser Merkmale wurde Substanz 18 als 4,5-diCQA und Substanz 21 als 3,4-diCQA identifiziert. Substanz 20 zeigte als Hauptpeak das m/z 191 [Chinasäure-H]$^-$ sowie das Fragment m/z 179 [Kaffeesäure-H]$^-$ mit einer relativen Häufigkeit von 38 %. Das Fragment m/z 335 wurde bei der Fragmentierung der Substanz 20 nicht detektiert. Aufgrund dieser Charakteristika im

Fragmentspektrum wurde die Substanz 20 als 3,5-diCQA identifiziert. Eine Absicherung der Strukturaufklärungen erfolgte durch die Messung der akkuraten Masse. Für alle drei Substanzen wurde die Summenformel $C_{25}H_{24}O_{12}$ ermittelt, die mit der Summenformel der diCQA-Isomere übereinstimmt.

4.2.3 *E*- und *Z*-Konfiguration der Hydroxyzimtsäurederivate

Alle identifizierten Hydroxyzimtsäurederivate (HCAs), bis auf die diCQAs, wurden sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration detektiert. Zur Überprüfung, ob es sich bei den detektierten *Z*-Isomeren um Artefakte handelte, die während der Probenvorbereitung aus den *E*-Isomeren entstanden waren (Möller & Herrmann 1982), wurde ein *E*-5-CQA-Standard bei der Probenvorbereitung auf die gleiche Weise behandelt wie die Tabakblattproben. LC-MS/MS-Messungen im MRM Modus zeigten für die drei behandelten *E*-5-CQA-Standards jeweils einen großen Peak der *E*-5-CQA sowie einen kleinen Peak der *Z*-5-CQA, der jedoch nur 2,2 % ± 0,5 % der Peakfläche des *E*-Isomers aufwies (Abb. 4.8 A). Eine UV-Exposition der Extrakte mit dem Standard *E*-5-CQA (λ=366 nm, t=1 h) führte zur Isomerisierung der *E*-5-CQA zum *Z*-Isomer, so dass dann zwei Peaks mit vergleichbar großen Peakflächen im MRM Modus detektiert wurden (Abb. 4.8 B). In den Probenextrakten der ozoninduzierten Einzelblattproben (30 h) zeigte dagegen die Peakfläche der *Z*-5-CQA einen Anteil von 33,2 ± 3,1 % an der Peakfläche der *E*-5-CQA (Abb. 4.8 C). Zur weiteren Absicherung wurden zu einer ozoninduzierten Blattprobe vor der Extraktion *E*-Ferulasäure und *E*-p-Coumarsäure zugesetzt. Dafür wurden die *E*-Ferulasäure und die *E*-p-Coumarsäure gewählt, da diese Substanzen in den Tabakblättern nicht nachgewiesen wurden und beide Substanzen in den Strukturen der ozoninduzierten Metabolite *E*-/*Z*-4- und 5-p-CoQA, *E*-/*Z*-3-p-CoShiA sowie *E*-/*Z*-5-FQA enthalten sind. Bei den Messungen der dotierten Probenextrakte wurden im MRM Modus zwei große Peaks des jeweiligen *E*-Isomers sowie zwei sehr kleine Peaks der entsprechenden Z-Isomere in den Blattextrakten detektiert. Die Anteile der *Z*-Isomere an den Peakflächen der *E*-Isomere betrugen für die Ferulasäure 1,7 % ± 0,4 % und für die p-Coumarsäure 5,1 % ± 0,3 %. Durch die Experimente mit den Standards der *E*-5-CQA, der *E*-Ferulasäure und der *E*-p-Coumarsäure konnte gezeigt werden, dass der hohe Anteil der Peakfläche an *Z*-5-CQA gegenüber *E*-5-CQA von 33,2 % ± 3,1 % in den Probenextrakten der ozoninduzierten Einzelblattproben (30 h) nicht auf eine Isomerisierung der *E*-5-CQA während der Probenvorbereitung zurückgeführt werden konnte. Die weiteren identifizierten HCAs in

den Blattextrakten wiesen auch hohe Anteile an ihren jeweiligen Z-Isomeren auf. Die identifizierten *Z*-Isomere in Pflanzenextrakten wären somit zum jeweiligen überwiegenden Anteil keine Artefakte sondern natürliche Substanzen, die bereits in der Pflanze gebildet wurden.

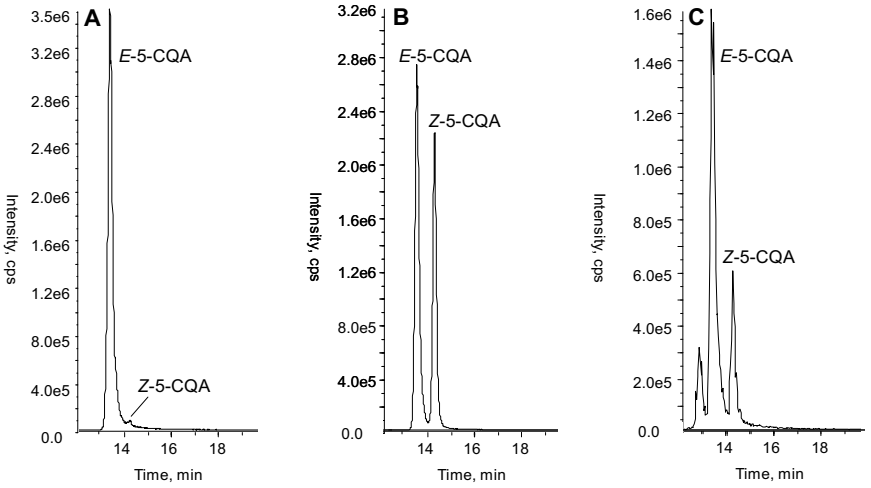


ABBILDUNG 4.8: Detektion der *E*-und *Z*-5-CQA im MRM Modus. Bei der Behandlung eines *E*-5-CQA-Standards wie eine Pflanzenprobe während der Probenvorbereitung wurde die *Z*-5-CQA nur in sehr geringen Mengen gebildet (A). Eine UV-Exposition der *E*-5-CQA-Lösung führte zu einer deutlich verstärkten Isomerisierung der *E*-5-CQA zu *Z*-5-CQA (B). In einem Probenextrakt einer ozoninduzierten Einzelblattprobe (30 h) war der Anteil an *Z*-5-CQA gegenüber der *E*-5-CQA signifikant höher als in dem Extrakt des Standards *E*-5-CQA (C).

4.2.4 Strukturell aufgeklärte Metabolite in Tabak

Durch LC-ESI-MS/MS-Experimente im EPI-Modus wurden 14 der 25 ozoninduzierten Metabolite anhand ihrer Fragmentspektren identifiziert. Eine Absicherung der identifizierten Strukturen erfolgte durch den Vergleich mit Fragmentspektren von Standards oder aus der Literatur. Für Substanzen, für die keine Standards zur Verfügung standen, erfolgte zusätzlich eine Absicherung durch FTICR-MS-Messungen, um anhand der akkuraten Masse die Summenformel der jeweiligen Substanz zu ermitteln. Bei den identifizierten ozoninduzierten

Metabolite handelt es sich um *E*-/*Z*-5-FQA, *E*-/*Z*-4-p-CoQA, *E*-/*Z*-5-p-CoQA, *E*-/*Z*-3-p-CoShiA, SA, SA-G sowie jeweils zwei *E*- und *Z*-Isomere des FTs.

Bei den anderen ozoninduzierten Metaboliten ergab sowohl die Bestimmung der Fragmentspektren als auch die Messung der akkuraten Massen keine ausreichenden Hinweise auf eine mögliche Struktur. Es müssten daher Fragmentierungsreaktionen mit FTICR-MS/MS durchgeführt werden, um weitere Hinweise auf eine mögliche Struktur zu erhalten. Des Weiteren könnte eine Isolierung der Substanzen durchgeführt werden, um mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Strukturaufklärung durchzuführen.

Neben den 14 ozoninduzierten Metaboliten wurden außerdem sieben weitere Metabolite in den Tabakblättern strukturell aufgeklärt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um 3-, 4- und 5-CQA, die jeweils in *E*- und *Z*-Konfiguration auftraten, sowie um 3,4-, 3,5- und 4,5-diCQA. Diese Metabolite sind unter einem akuten Ozonstress nicht induziert, da sie jedoch eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, wurde auch das Verhalten dieser Substanzen untersucht (Meyer et al. 1998; Iwai et al. 2004).

4.3 Ozonstress: Zeitlicher Verlauf der Metabolite

Der zeitliche Verlauf der unter einem akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls gebildeten Metabolite wurde mit der in Kap. 3.3.3 vorgestellten MRM-Methode ermittelt. Ziel dieser Untersuchungen war es, anhand des Auftretens der Metabolite 10 h und 30 h nach Beginn der Ozonbehandlung, Hinweise zu erhalten, ob die ozoninduzierten Metabolite eine Signalfunktion haben könnten oder eventuell akkumulieren und somit eine Rolle als Abwehrsubstanzen spielen könnten.

Neben den ozoninduzierten Metaboliten wurden außerdem die in den Tabakblättern identifizierten sechs CQA-Isomere sowie die 3,5-diCQA bestimmt. Diese Substanzen wurden in den $Pool O_3$(30 h) zwar nicht verstärkt gebildet, da sie jedoch eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen (Meyer et al. 1998; Iwai et al. 2004) und insbesondere die CQA-Isomere einigen der ozoninduzierten Metabolite strukturell stark ähneln, sollte deren zeitlicher Verlauf mit dem der ozoninduzierten Metabolite verglichen werden.

Für die Untersuchungen wurden Einzelblätter geerntet, um die biologische Variabilität der phenolischen Metabolite zu berücksichtigen. Dafür wurden die Blätter 4 von jeweils acht ozonbehandelten Tabakpflanzen aus vier unabhängigen Ozonexpositionsexperimenten 10 h sowie 30 h nach Beginn der Ozonexposition als Einzelblätter geerntet (SingleO_3(30 h) und SingleO_3(10 h)). Für beide Erntezeitpunkte wurden jeweils zur gleichen Zeit von unbehandelten Tabakpflanzen sieben (SingleKon(30 h)) bzw. vier (SingleKon(10 h)) Einzelblätter 4 als Kontrollproben geerntet.

Für die Ermittlung der Zeitverläufe der Metabolite wurden von allen Einzelblättern jeweils zwei verschiedene Extrakte mit der MRM-Methode gemessen. Nach Normierung der Peakfläche auf 1 mg Frischgewicht der Probe wurde für die ermittelten Peakflächen des gleichen Metabolits der zwei verschiedenen Extrakte der Mittelwert bestimmt. Für jeden Metabolit wurde anschließend die mittlere Peakfläche und der Standardfehler (SE) aus den MRM-Messungen der Einzelblätter von jeweils SingleO_3(30 h), SingleO_3(10 h), SingleKon(30 h) und SingleKon(10 h) berechnet. Die mittleren Peakflächen, der SE sowie die x-fache Induktion der Metabolite in den ozonbehandelten Einzelblattproben (10 h und 30 h) gegenüber den entsprechenden Kontrollen sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

Der erste Erntezeitpunkt wurde 10 h nach Beginn der Ozonexposition gewählt, da aus der Literatur bekannt war, dass ozonbehandelte Pflanzen, die zu diesem Zeitpunkt geerntet werden eine hohe Induktion der Signalsubstanz Salicylsäure aufweisen (Kangasjärvi et al. 2005). Des Weiteren wurde von Schraudner et al. (1998) gezeigt, dass sich nach 10 h Wartezeit in *N. tabacum* L. cv Bel W3 ein durch die Pflanze hervorgerufener zweiter oxidativer Burst in der exponentiellen Phase befindet, was sich durch hohe Gehalte an ROS äußert. Zu dem Erntezeitpunkt 30 h nach Beginn der Ozonexponierung weisen die ozonbehandelten Pflanzen in den Blättern bereits wieder vergleichbare ROS-Konzentrationen wie die der Kontrollpflanzen auf. Außerdem wurde in der Literatur gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die punktförmigen Nekrosen, verursacht durch die HR, vollständig ausgebildet sind (Wohlgemuth et al. 2002) und die geernteten Blätter hohe Gehalte an induzierten, löslichen phenolischen Substanzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen aufweisen (Janzik et al. 2005; Francini et al. 2007). Es wurden somit zwei Erntezeitpunkte gewählt, bei denen das Vorkommen der Metabolite im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen während

zwei verschiedener Stadien der Reaktion der ozonsensitiven Varietät L. cv Bel W3 auf die Ozonexposition bestimmt werden konnte.

Anhand der relativen Häufigkeitsverteilung der Metabolite in den ozoninduzierten Proben der zwei verschiedenen Erntezeitpunkte und den entsprechenden Kontrollen wurde zwischen fünf verschiedenen Metabolitentypen unterschieden. In Abb. 4.9 sind die zeitlichen Verläufe dieser Metabolitentypen anhand von fünf mit der MRM-Methode bestimmten, repräsentativen Metaboliten dargestellt. Sie repräsentieren somit die fünf verschiedenen Metabolitentypen, die in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3 nach einem akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls auftreten. In Tab. 4.2 sind alle mit der MRM-Methode untersuchten Metabolite dem entsprechenden Metabolitentyp zugeordnet.

TABELLE 4.2: Zeitlicher Verlauf der Metabolitentypen 1-5

RT (min)	Masse $[M-H]^-$	Int. Ozon, 10 h (area/mg FG)	Int. Kontrolle, 10 h (area/mg FG)	Induktion (x-fach)	Int. Ozon, 30 h (area/mg FG)	Int. Kontrolle, 30 h (area/mg FG)	Induktion (x-fach)	Substanz
Metabolitentyp 1								
20,5	137,1*	11829 (± 1221)^{a}	nn		861 (± 142)^{b}	nn		Salicylsäure
Metabolitentyp 2								
9,9	343,1*	59 (± 4)^{a}	nn		204 (± 20)^{b}	nn		
10,9	299,1	15766 (± 1156)^{a}	nn		35660 (± 2695)^{b}	nn		Salicysäureglucosid
12,0	343,1	1185 (± 21)^{a}	nn		2087 (± 147)^{b}	nn		
13,8	469,2*	1872 (± 294)^{a}	nn		21797 (± 3034)^{b}	nn		
15,3	439,2*	271 (± 12)^{a}	nn		2594 (± 354)^{b}	nn		
16,2	439,2	231 (± 18)^{a}	nn		562 (± 43)^{b}	nn		
26,8	485,2	19 (± 3)^{a}	nn		40 (± 5)^{b}	nn		
27,8	437,2*	nb	nn		633 (± 153)^{b}	nn		
Metabolitentyp 3								
11,1	477,2*	1483 (± 86)^{a}	206 (± 18)^{b}	7,4 ± 0,6	7299 (± 540)^{c}	134 (± 12)^{b}	57,8 ± 6,7	
12,8	447,2*	1122 (± 50)^{a}	716 (± 17)^{ab}	1,6 ± 0,1	3988 (± 400)^{c}	603 (± 80)^{b}	7,4 ± 1,2	
14,1	337,1	497 (± 34)^{a}	597 (± 122)^{a}	1,0 ± 0,1	899 (± 34)^{b}	437 (± 45)^{a}	2,2 ± 0,2	*Z*-4-p-Coumaroylchinsäure
15,2	337,1	1059 (± 101)^{a}	878 (± 203)^{ab}	1,5 ± 0,3	1572 (± 102)^{c}	578 (± 54)^{b}	2,9 ± 0,3	*E*-4-p-Coumarochylinsäure
16,1	337,1*	2215 (± 191)^{a}	1144 (± 340)^{b}	2,0 ± 0,5	4799 (± 463)^{c}	863 (± 105)^{b}	6,3 ± 1,1	*E*-5-p-Coumaroylchinsäure
16,5	337,1*	1976 (± 115)^{a}	1669 (± 382)^{ab}	1,4 ± 0,2	6311 (± 455)^{c}	1254 (± 115)^{b}	5,4 ± 0,6	*Z*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,7	367,1*	751 (± 48)^{a}	156 (± 31)^{b}	5,9 ± 1,1	1687 (± 107)^{c}	140 (± 14)^{b}	12,9 ± 1,4	*E*-5-Feruloychinsäure
17,1	367,1	1191 (± 69)^{a}	328 (± 69)^{b}	4,3 ± 0,7	3664 (± 252)^{c}	266 (± 31)^{b}	15,1 ± 1,9	*Z*-5-Feruloychinasäure
19,2	319,1*	567 (± 24)^{a}	26 (± 6)^{b}	27,3 ± 4,5	1475 (± 269)^{c}	60 (± 20)^{b}	47,0 ± 15,4	*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure
19,3	319,1*	331 (± 33)^{a}	62 (± 9)^{b}	5,8 ± 0,9	1756 (± 220)^{c}	105 (± 30)^{b}	25,4 ± 5,9	*E*-3-p-Coumaroylshikimisäure
25,0	805,6*	3772 (± 150)^{a}	1516 (± 74)^{b}	2,5 ± 0,1	6540 (± 653)^{c}	1629 (± 58)^{b}	2,0 ± 0,3	

Metabolitentyp 4								
17,6	312,1*	147 (± 10)[a]	26 (± 7)[b]	8,4 ± 2,0	127 (± 16)[a]	17 (± 3) [b]	10,0 ± 2,2	*Z*-Feruloyltyramin
18,8	312,1	49 (± 2) [a]	nn		41 (± 6)[a]	nn		*E*-Feruloyltyramin
22,3	312,1*	1081 (± 81) [a]	18 (± 3)[b]	67,9 ± 10,8	1645 (± 279)[a]	34 (± 5) [b]	55,0 ± 12,3	*Z*-Feruloyltyramin
24,0	312,1*	4049 (± 287) [a]	112 (± 22)[b]	44,6 ± 8,7	4038 (± 648)[a]	168 (± 18)[b]	26,4 ± 5,5	*E*-Feruloyltyramin
24,0	805,6*	474 (± 30) [a]	182 (± 6)[b]	2,6 ± 0,2	623 (± 84)[a]	190 (± 13)[b]	2,3 ± 0,4	
Metabolitentyp 5								
8,0	353,3	6303 (± 142) [a]	6622 (± 1376)[a]	1,2 ± 0,2	6680 (± 839)[a]	5031 (± 327)[a]	0,9 ± 0,1	*Z*-3-Caffeoylchinasäure
9,6	353,3	81747 (± 2190) [a]	76872 (± 8725)[ab]	1,1 ± 0,1	60363 (± 4864)[b]	57992 (± 2501)[b]	1,0 ± 0,1	*E*-3-Caffeoylchinasäure
11,4	353,3	2953 (± 171) [a]	3400 (± 509)[a]	0,9 ± 0,1	3107 (± 289)[a]	2361 (± 139)[a]	1,0 ± 0,1	*Z*-4-Caffeoylchinasäure
13,0	353,3	19905 (± 568) [a]	21641 (± 1548)[a]	0,9 ± 0,1	15281 (± 791)[b]	15880 (± 555)[b]	0,9 ± 0,1	*E*-4-Caffeoylchinasäure
13,6	353,3	103837 (± 2519) [a]	106631 (± 6494)[a]	1,0 ± 0,1	81997 (± 3204)[b]	88201 (± 2710)[b]	1,1 ± 0,1	*E*-5-Caffeoylchinasäure
14,4	353,3	25208 (± 776) [a]	29042 (± 2825)[a]	0,9 ± 0,1	27249 (± 1932)[a]	23564 (± 1063)[a]	1,1 ± 0,1	*Z*-5-Caffeoylchinasäure
20,7	515,1	6326 (± 429) [a]	6175 (± 606)[ab]	1,1 ± 0,1	4017 (± 576)[b]	5443 (± 328)[ab]	1,0 ± 0,1	3,5-diCaffeoylchinasäure

Die Zahlenwerte repräsentieren die Mittelwerte ± SE mit n=8 (Ozon, 10 h und Ozon, 30 h), n=7 (Kontrolle, 30 h) beziehungsweise n=4 (Kontrolle, 10 h). [a-c] Zahlenwerte, die sich innerhalb einer Zeile signifikant unterscheiden sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Für den Vergleich von zwei Stichproben wurde der t-Test (P<0,05) und für den Vergleich von vier Stichproben der Bonferroni-Test (P<0,05) angewandt. Die Peakflächen der Massen, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, wurden vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert. Intensitäten der Peakfläche (Int.). Frischgewicht (FG). Nicht nachweisbar (nn). Nicht bestimmbar (nb).

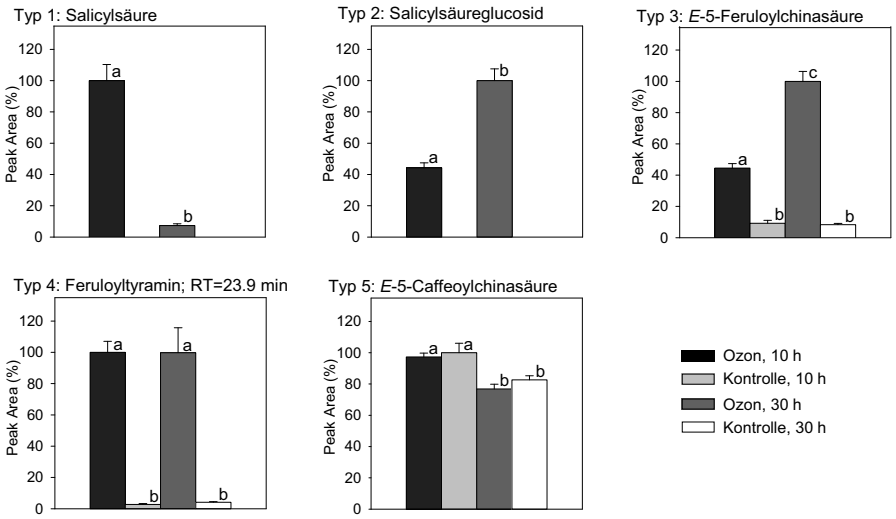


ABBILDUNG 4.9: Vergleich der relativen Häufigkeiten der phenolischen Metabolite in den ozonbehandelten Proben (Ozon, 10 h und Ozon, 30 h), die als Einzelblattproben 10 h (n=8) bzw. 30 h (n=8) nach Beginn der Ozonexposition geerntet wurden, sowie in den entsprechenden Kontrollproben (Kontrolle, 10 h (n=4) und Kontrolle, 30 h (n=7)). Die fünf Diagramme stellen die fünf repräsentativen Typen der phenolischen Metabolite dar, die nach einem akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3 auftreten. In jedem der Diagramme wurde die Stichprobe mit der größten Peakfläche auf 100 % normiert. Die Peakflächen der Metabolite wurden für jede Einzelblattprobe in einer Doppelbestimmung mit der MRM-Methode aus Kap. 3.3.3 bestimmt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der entsprechenden Einzelblattproben ± Standardfehler. Mittelwerte, die sich innerhalb eines Diagramms signifikant unterscheiden, sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Für den Vergleich von zwei Stichproben wurde der t-Test (P<0,05) und für den Vergleich von vier Stichproben der Bonferroni-Test (P<0,05) angewandt. Die Daten der Metabolitentypen 1, 3 und 4 wurden vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert.

Ein repräsentativer Vertreter des Metabolitentyps 1 ist die SA (Abb. 4.9). Die SA wies als Signalsubstanz ein typisches transientes Verhalten im zeitlichen Verlauf auf. Die transiente Zunahme dieser Signalsubstanz zeigte sich dadurch, dass die SA in den SingleO_3(10 h) signifikant größere Peakflächen aufwies als in den SingleO_3(30 h) und die Substanzen in den

entsprechenden Kontrollen nicht nachweisbar waren. Die SA war der einzige ozoninduzierte Metabolit, der dieses Verhalten im zeitlichen Verlauf zeigte. Es wurde somit kein weiterer phenolischer Metabolit identifiziert, der einen für eine Signalsubstanz typischen zeitlichen Verlauf aufwies.

Für die acht Substanzen des Metabolitentyps 2 (Tab. 4.2) ist in Abb. 4.9 das SA-G als repräsentativer Vertreter aufgeführt. Die Substanzen wiesen alle ein Metabolitenprofil auf, bei dem in den SingleO_3(30 h) gegenüber den SingleO_3(10 h) eine Anreicherung der Metaboliten zu beobachten war, wohingegen die Metabolite in den Kontrollen nicht nachweisbar waren. Die Substanzen des Metabolitentyps 2 wurden somit erst als Reaktion auf den akuten, hochkonzentrierten Ozonpuls in *N. tabacum* L. cv Bel W3 gebildet.

Die 11 Substanzen des Metabolitentyps 3 zeigten eine Anreicherung über die Zeit (Tab. 4.2). Die niedrigsten Gehalte wiesen dabei die Kontrollen auf. In den SingleO_3(10 h) zeigte sich bereits eine deutliche Anreicherung gegenüber den Kontrollen und die SingleO_3(30 h) wiesen die höchsten Gehalte an den Metaboliten auf. Als repräsentativer Vertreter des Metabolitentyps 3 ist in Abb. 4.9 die *E*-5-FQA aufgeführt.

Die fünf Substanzen des Metabolitentyps 4 (Tab. 4.2) waren bereits in den SingleO_3(10 h) gegenüber den Kontrollen erhöht. Eine weitere Anreicherung der Metabolite wurde nicht beobachtet, denn die SingleO_3(30 h) wiesen keine signifikanten Unterschiede in den Gehalten an diesen Metaboliten im Vergleich zu den SingleO_3(10 h) auf. In Abb. 4.9 ist das FT mit einer RT=23,9 min als repräsentativer Vertreter des Metabolitentyps 4 aufgeführt.

Bei den sieben Substanzen des Metabolitentyps 5 (Tab. 4.2) handelte es sich um phenolische Metabolite, die eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, die jedoch 30 h nach Beginn der Ozonbehandlung in den Blättern der behandelten Pflanzen weder verstärkt gebildet noch abgebaut wurden. Als repräsentativer Metabolit ist in Abb. 4.9 das Verhalten der *E*-5-CQA im zeitlichen Verlauf dargestellt. Für alle Metaboliten dieses Typs wurde gezeigt, dass sowohl nach 30 h als auch nach 10 h keine signifikante Veränderung des Gehalts der Metabolite in den jeweiligen ozonbehandelten Proben gegenüber den entsprechenden Kontrollen vorlag.

4.4 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Mit dem Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) Assay wurde die antioxidative Kapazität der Tabakblattextrakte sowie der HPLC-Fraktionen des Tabakblattextrakts gegen Peroxylradikale ermittelt.

Beim TOSC Assay wird der zeitliche Verlauf der Ethylenbildung aus 2-Keto-4-methylthiobuttersäure (KMBA) durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit einer Headspace-GC-FID-Anlage bestimmt. Dabei wird in einer Kontrollreaktion unter Zugabe von deionisiertem Wasser die nicht gehemmte Bildung des Ethylens aus KMBA durch die ROS über einen Zeitraum von 60 min ermittelt. Die antioxidative Kapazität von Extrakten wird anschließend anhand ihrer Fähigkeit die Ethylenbildung durch die ROS zu hemmen charakterisiert, indem die gebildete Ethylenmenge im zeitlichen Verlauf unter Zugabe des Extrakts anstelle von deionisiertem Wasser mit der in der Kontrollreaktion verglichen wird. Extrakte, für die ein TOSC-Wert von 0 % experimentell ermittelt wurde, weisen keine antioxidative Kapazität gegen die entsprechenden ROS auf, da durch die Zugabe des Extrakts die Ethylenbildung aus KMBA durch die ROS im Vergleich zur Kontrollreaktion nicht gehemmt wurde. Ein TOSC-Wert von 100 % wird dagegen erreicht, wenn die Ethylenbildung durch die Antioxidantien im Extrakt vollständig gehemmt wird (Lichtenthäler et al. 2003; Lichtenthäler & Marx 2005; Rodrigues et al. 2006).

Für die Untersuchungen mit dem TOSC Assay mit Peroxylradikalen als Agens wurden jeweils 20 µl von je zwei Extrakten der Mischproben PoolO_3A und PoolKonA verwendet. Des Weiteren wurden von allen 4 Extrakten mit der HPLC-Methode der LC-MS-Messungen (Injektionsvolumen 20 µl) die Fraktionen von 9-30 min für den TOSC Assay eingesetzt. Alle Proben wurden vor der Analyse mit dem TOSC Assay gefriergetrocknet und anschließend in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen, so dass für alle Proben ein Verdünnungsfaktor von 25 vorlag. Die Proben wurden im TOSC Assay in einer Doppelbestimmung untersucht.

Ziel dieser Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob durch einen akuten Ozonpuls von *N. tabacum* L. cv Bel W3 die antioxidative Kapazität in den Extrakten der ozonbehandelten Blattproben gegenüber der Kontrollproben induziert wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob insbesondere die ermittelten ozoninduzierten Metabolite zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität des Extrakts führen. Dafür wurden die HPLC-Fraktionen der

Extrakte der ozonbehandelten Proben und der Kontrollen von 9-30 min untersucht, da in diesem Zeitfenster alle ermittelten ozoninduzierten Metabolite von der Säule eluieren.

Sowohl in den Gesamtextrakten als auch in den HPLC-Fraktionen wurden vergleichbare TOSC-Werte für die ozonbehandelten Proben und Kontrollen ermittelt, die bei einem Verdünnungsfaktor von 25 um 50 % lagen (Tab. 4.3), so dass die unter Ozon gebildeten phenolischen Substanzen in den Extrakten keine signifikante Auswirkung auf die antioxidative Kapazität gegen Peroxylradikale hatten. Die TOSC-Werte der fraktionierten Proben wiesen vergleichbare Gehalte wie die Gesamtextrakte auf (Tab. 4.3). Somit eluieren die gegen Peroxylradikale antioxidativ wirksamen Substanzen offensichtlich im gleichen Zeitfenster wie die ozoninduzierten Metabolite.

TABELLE 4.3: Ermittelte TOSC-Werte von Tabakblattextrakten und fraktionierten Tabakblattextrakten mit dem TOSC Assay mit Peroxylradikalen als Agens

	TOSC-Werte von PoolO_3A	TOSC-Werte von PoolKonA
Gesamtblattextrakte	51 %	57 %
HPLC-Fraktionen	51 %	45 %

Alle Proben wiesen einen Verdünnungsfaktor von 25 für den TOSC Assay auf.

4.5 Vergleich von Ozonstress mit Pathogenstress und oxidativem Stress

Ozon führt in Pflanzen zu einem oxidativen Stress, der durch Ozon selbst oder durch die aus Ozon sekundär entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Apoplasten des Blattes verursacht wird (Pell et al. 1997; Heath & Taylor 1997). Des Weiteren wird durch den Stressor Ozon in ozonsensitiven Pflanzen ein zweiter, von der Pflanze gesteuerter, oxidativer Burst ausgelöst. Durch diesen zweiten oxidativen Burst sowie durch induzierte Signalmoleküle werden in der Pflanze verschiedene Pathogenabwehrreaktionen ausgelöst, wie etwa eine hypersensitive Reaktion (HR) sowie die Bildung von Pathogenabwehr assoziierten (PR) Proteinen (Sandermann et al. 1998; Rao & Davis 2001; Kangasjärvi et al. 2005).

Zur Untersuchung, ob die in dieser Arbeit ermittelten ozoninduzierten Metabolite ozonspezifisch sind, generell durch oxidativen Stress ausgelöst werden können oder mit der Induktion der Pathogenabwehr assoziiert sind, wurde in der ozonsensitiven

Tabakvarietät L. cv Bel W3 ein Pathogenstress sowie eine andere Art des oxidativen Stresses als Ozon hervorgerufen. Für das Hervorrufen eines Pathogenstresses wurden die Blätter 4 der Pflanzen mit phytopathogenen Bakterien und Viren inokuliert, eine andere Art des oxidativen Stresses wurde durch die Applikation von Paraquat® (Methylviologen) hervorgerufen.

4.5.1 Infektion mit Pathogenen

Für die Infektion von *N. tabacum* L. cv Bel W3 mit Pathogenen wurde sowohl mit Bakterien als auch mit Viren gearbeitet. Die Wahl des Pathogens beruhte darauf, dass die Infektion mit dem Pathogen zu den für die HR typischen nekrotischen Läsionen führt. Hierbei sollte es somit zu einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen kommen. Das Pathogen sollte die Pflanze zwar infizieren, jedoch vor der Ausprägung von Symptomen durch die Pathogenabwehrreaktionen der Pflanze im Wachstum gehemmt bzw. abgetötet werden.

Eine Infiltration der Blätter 4 von jeweils acht *N. tabacum* L. cv Bel W3 Pflanzen in zwei unabhängigen Versuchen mit Tabakmosaikvirus führte nicht zu den durch eine HR ausgelösten nekrotischen Läsionen in ausreichender Zahl (Abb. 4.10 A), so dass stattdessen eine Infiltration mit Bakterien durchgeführt wurde.

Für die bakterielle Infiltration wurden zwei Unterarten von *Pseudomonas syringae* (*Pss* und *Psj*) sowie zwei Unterarten von *Xanthomonas translucens* (*Xtt* und *Xtc*) verwendet. Eine Infiltration der Blätter 4 von jeweils zwei Pflanzen zeigte, dass die Infiltration mit den Pathogenen *Psj*, *Xtt* und *Xtc* nur zu chlorotischen Läsionen an den Infiltrationsstellen führte, die ein hellgrünes Erscheinungsbild aufwiesen. Eine Infiltration mit dem Pathogen *Pss* führte dagegen bei beiden Pflanzen an den Infiltrationsstellen zu den für die HR typischen nekrotischen Läsionen (Abb. 4.10 B), die in der Farbe denen nach Ozonexposition gebildeten punktartigen Nekrosen der Blätter 4 (Abb. 4.10 C) ähnelten.

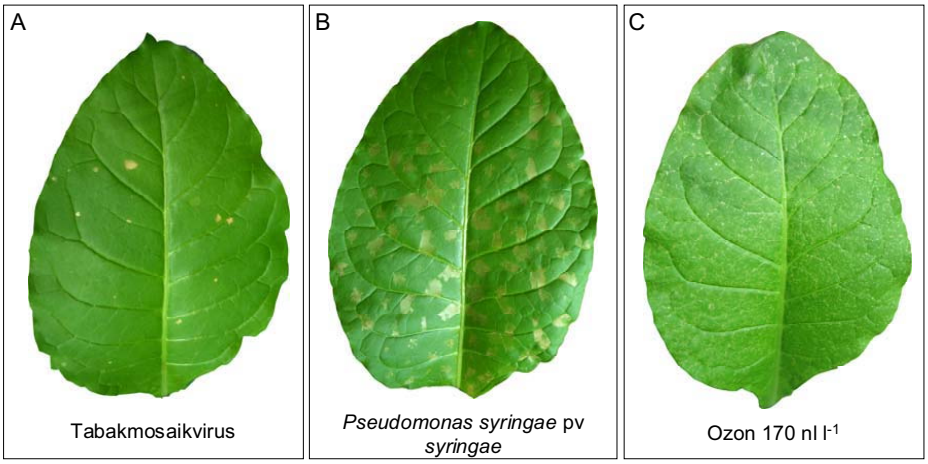


ABBILDUNG 4.10: Blätter 4 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 inokuliert mit Tabakmosaikvirus (A), *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (B) sowie nach Ozonexposition (C), die jeweils 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet wurden.

Für den Vergleich von Pathogenstress und Ozonstress wurden jeweils acht Blätter 4 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 in zwei unabhängigen Experimenten mit einer Suspension von *Pss* in $MgCl_2$ infiltriert (V1Single*Pss*Inf bzw. V2Single*Pss*Inf.) Auf die gleiche Weise wurden für beide Experimente Mock-Infiltrationen an jeweils acht Kontrollpflanzen durchgeführt, indem anstelle der Bakteriensuspension die reine $MgCl_2$-Lösung in jeweils acht Blätter 4 der Pflanzen infiltriert wurde (V1Single*Pss*Kon. bzw. V2Single*Pss*Kon.). Die Blätter 4 beider Experimente wurden jeweils 30 h nach der Infiltration als Einzelblätter geerntet.

4.5.2 Behandlung mit Paraquat

PQ ist ein Bipyridyliumsalz (Abb. 4.11), das in höheren Dosen als Kontaktherbizid eingesetzt wird, indem es auf die Blätter der Pflanzen aufgetragen wird. Das Herbizid greift an der reduzierenden Seite des Photosystems I ein und führt dadurch unter Lichteinwirkung schnell zu einem Welken und Austrocknen des behandelten Pflanzengewebes. Durch das Auftragen einer PQ-Lösung werden unter Lichteinwirkung ROS in der Pflanze gebildet, die durch den dadurch hervorgerufenen oxidativen Stress der Hauptgrund für die toxische Wirkung des PQs sind (Dyer & Weller 2005).

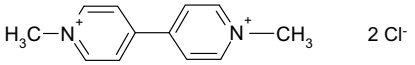


ABBILDUNG 4.11: Strukturformel von Paraquat (1,1´-Dimethyl-4,4´-bipyridylium-dichlorid)

Für die Untersuchungen mit PQ in dieser Arbeit wurden jeweils acht Blätter 4 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 auf der Blattoberseite und -unterseite mit einer PQ-Lösung besprüht, die eine Konzentration von 10 µM l^{-1} bzw. 100 µM l^{-1} aufwies (SinglePQ10µM und SinglePQ100µM). Außerdem wurden acht Blätter 4 als Kontrollen mit deionisiertem Wasser auf der Blattoberseite und -unterseite besprüht (SinglePQKon). Alle Blätter 4 wurden als Einzelblätter 30 h nach Beginn der PQ-Behandlung als Einzelblätter geerntet.

Eine Konzentration von 10 µM PQ wurde gewählt, da von Ananieva et al. (2002) gezeigt wurde, dass eine Behandlung mit PQ in einer Konzentration von 10 µM zu einem oxidativen Stress bei 12-Tage alten Gerstepflanzen (*Hordeum vulgare*) führt. Eine PQ Konzentration von 100 µM führt dagegen bereits zu Verwelkungserscheinungen an den Gersteblättern. In dieser Arbeit zeigten die mit PQ (10 µM) behandelten Blätter 4 wenige kleine Nekrosen (Abb. 4.12 A), wohingegen bei PQ (100 µM) (Abb. 4.12 B) ausgeprägte, flächige Nekrosen vorlagen und das Blatt leichte Verwelkungserscheinungen aufwies. Das ozonexponierte Blatt (Abb. 4.12 C) zeigte im Gegensatz zu PQ (100 µM) die für den Ozonstress typischen punktförmigen Nekrosen.

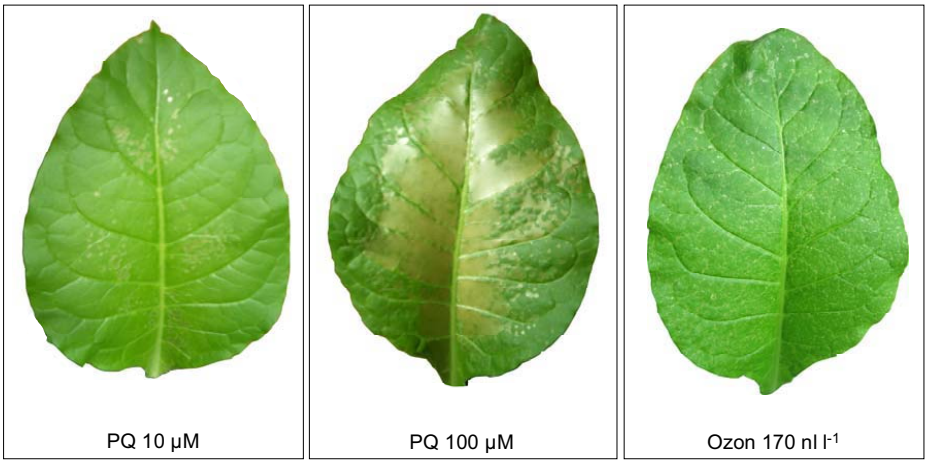


ABBILDUNG 4.12 Blätter 4 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 behandelt mit Paraquat in einer Konzentration von 10 µM l^{-1} (A), von 100 µM l^{-1} (B) sowie nach Ozonexposition (C), die jeweils 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet wurden.

4.5.3 Expression der basischen ß-1,3-Glucanase

Unter einem akuten Ozonstress wird in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3, infolge der pathogeninduzierten HR, eine Induktion der basischen ß-1,3-Glucanase hervorgerufen (Ernst et al. 1992; Yalpani et al. 1993; Overmyer et al. 2003). Des Weiteren wird dieses PR-Protein ebenfalls nach einer Verwundung induziert (Memelink et al. 1990; Ohashi & Ohshima 1992). Die basische ß-1,3-Glucanase wird dabei sowohl unter einer HR als auch unter einer Verwundung induziert, da sie positiv durch die Jasmonsäure (JA) reguliert wird, die unter beiden Prozessen akkumuliert. Die Ausprägung der Expression der basischen ß-1,3-Glucanase hängt dabei von den Gehalten an JA ab (Niki et al. 1998).

Die Expression der basischen ß-1,3-Glucanase wurde nach Trennung der RNA-Moleküle durch eine Gelelektrophorese mittels Northern Blot Analyse bestimmt. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu prüfen ob eine Expression der basischen ß-1,3-Glucanase in den behandelten Proben nachgewiesen werden konnte und somit vermutlich eine Induktion der Pathogenabwehr aufgrund des applizierten Stresses vorlag. Für die Untersuchungen wurden als Proben Einzelblätter untersucht, die 30 h nach Beginn der Behandlung geerntet wurden.

Sowohl in den ozonexponierten Blättern (Abb. 4.13 A) als auch in den mit *Pss* infizierten Blättern (Abb. 4.13 B) konnte eine Expression der basischen ß-1,3-Glucanase bestimmt werden. Die Expression war dabei in den ozonbehandelten Blättern stärker ausgeprägt als in den mit *Pss* infizierten Blättern und eines der *Pss* infizierten Blätter zeigte nur eine schwache Expression. Die Blätter, die mit PQ (100 µM) behandelt wurden zeigten auch eine deutliche Expression (Abb. 4.14 A), deren Ausprägung nur geringfügig schwächer war als die der ozonexponierten Blätter. Bei den Blättern, die mit PQ (10 µM) behandelt wurden, konnte in zwei von vier untersuchten Blättern eine Expression der basischen ß-1,3-Glucanase ermittelt werden, wobei die Expression in einem dieser zwei Fälle nur eine schwache, basale Ausprägung zeigte. Die Expression der basischen ß-1,3-Glucanase könnte bei diesen beiden Blättern auf lokale Effekte während der Behandlung mit PQ zurückgeführt werden, denn beim Besprühen der Blätter mit PQ konnte bei wenigen Blättern eine Tropfenbildung in der Nähe der Nervatur beobachtet werden, wodurch an diesen Stellen vermutlich ein hoher oxidativer Stress herrschte, der zu einer Expression geführt haben könnte. Die Kontrollen aller Behandlungen zeigten üblicherweise keine Expression. Nur in einer Kontrolle von Ozon sowie in zwei Kontrollen von PQ wurde eine schwache, basale Expression gezeigt, die vergleichbar war mit der schwach ausgeprägten Expression des einen Blattes, das mit PQ (10 µM) behandelt worden war. Bei diesen Pflanzen war vermutlich während der Anzucht ein leichter Stress aufgetreten, der zu einer schwachen Induktion der JA und diese zu einer schwachen, basalen Expression der basischen ß-1,3-Glucanase geführt hatte.

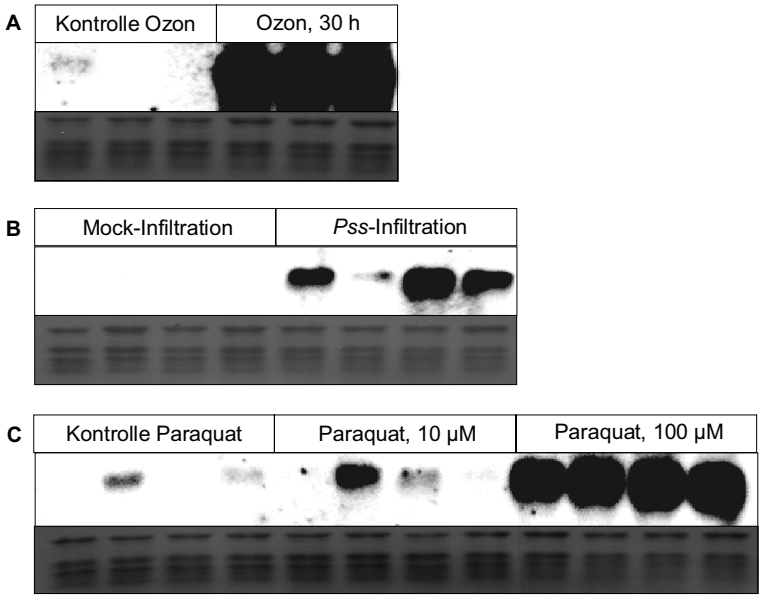


ABBILDUNG 4.13: Northern Blot Analyse der Expression der basischen ß-1,3-Glucanase in ozonexponierten Einzelblättern sowie in Kontrollen (A), in mit *Pss* infizierten Einzelblättern sowie in Kontrollen (B) und in Einzelblättern behandelt mit PQ (10 µM) bzw. PQ (100 µM) sowie in Kontrollen (C). Die Tabakblätter wurden jeweils als Einzelblätter 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet und die Gesamt-RNA aus den Einzelblättern isoliert. Nach einer Trennung der RNA-Moleküle durch eine Gelelektrophorese wurde die Expression der basischen ß-1,3-Glucanase mittels Northern Blot bestimmt. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der RNA wurde eine Methylenblaufärbung der RNA auf der Membran durchgeführt.

4.5.4 Vergleich von Ozonstress und Pathogenstress

Zur Überprüfung, welche der ermittelten ozoninduzierten Metabolite mit der in der Pflanze induzierten Pathogenabwehr assoziiert sind, wurden in den Proben V1Single*Pss*Inf und V2Single*Pss*Inf sowie in den entsprechenden Kontrollen die ozoninduzierten Metabolite mit der MRM-Methode quantifiziert. Des Weiteren wurden die Peakflächen der sechs CQA-Isomere sowie der 3,5-diCQA ermittelt, um auch deren Verhalten unter Pathogenstress zu untersuchen. Wie für die Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite in SingleO_3(30 h) und SingleKon(30 h) in Kap. 3.4, wurden alle Einzelblätter der *Pss*-Untersuchung in einer

Doppelbestimmung mit der MRM-Methode quantifiziert. Die ermittelten Peakflächen aus den Einzelblättern aller Metabolite aus V1Single*Pss* sind, unter Angabe der entsprechenden SE sowie der x-fachen Induktion, in Tab. 4.4 aufgeführt. Die Untersuchungen von V2Single*Pss* ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Anhand der Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite mit der MRM-Methode in den mit *Pss* infizierten Blättern und in den entsprechenden Kontrollen wurde festgestellt, dass alle ozoninduzierten Metabolite der Metabolitentypen 1-4 auch unter Pathogenstress mit *Pss* in *N. tabacum* L. cv Bel W3 induziert werden (Tab. 4.4 und Abb. 4.14).

Die sechs CQA-Isomere sowie die 3,5-diCQA (Metabolite des Metabolitentyps 5) zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihren Peakflächen beim Vergleich der *Pss* infiltrierten Einzelblätter gegenüber den entsprechenden Einzelblättern infiltriert mit $MgCl_2$ (Tab. 4.4). Das gleiche Verhalten wiesen diese Substanzen mit ihrer hohen antioxidativen Kapazität auch in den ozonbehandelten Proben gegenüber den entsprechenden Kontrollen auf (Tab. 4.2).

In Abb. 4.14 sind die Extracted Ion Chromatogramme (XICs) der MRM-Bestimmungen von je einem Kontrolleinzelblatt (Mock-Infiltration und Kontrolle Ozon, 30 h) sowie je einem behandelten Einzelblatt (*Pss*-Infiltration und Ozon, 30 h) als repräsentative Beispiele aufgeführt. Ein Vergleich der Mock-Infiltration mit der Kontrolle Ozon, 30 h (Abb. 4.14) zeigt, dass in den Kontrollblättern durch die Infiltration der $MgCl_2$-Lösung keine Induktion der ozoninduzierten Metabolite hervorgerufen wurde. Die unter Pathogenstress verstärkt gebildeten Metabolite waren somit ausschließlich auf den durch die *Pss* hervorgerufenen Stress zurückzuführen. Die unter Pathogenstress gebildeten Metabolite wiesen im XIC Peakflächen in einer ähnlichen Größenordnung wie in Ozon, 30 h auf (Abb. 4.14).

Zur Überprüfung, ob die ermittelten ozoninduzierten Metabolite nicht von *Pss* selbst gebildet wurden sondern als Pathogenabwehr von der Pflanze, wurde eine Bakteriensuspension mit dem Extraktionslösungsmittel extrahiert und der Extrakt anschließend mit der MRM-Methode bestimmt. In einer Dreifachbestimmung wurde keiner der Metabolite in den Extrakten der Bakteriensuspension detektiert, so dass die detektierten Metabolite nicht aus den Bakterien stammen können.

TABELLE 4.4: Quantifizierung der ermittelten Metabolite mit der MRM-Methode in mit *Pss* infizierten Blättern und den entsprechenden Kontrollen

RT (min)	Masse $[M-H]^-$	Int. *Pss* (area/mg FG)	Int. Kontrolle (area /mg FG)	Induktion (x-fach)	Substanz
Metabolitentyp 1					
20,5	137,1	2186 (± 216)	nn		Salicylsäure
Metabolitentyp 2					
9,9	343,1	173 (± 17)	nn		
10,9	299,1	11831 (± 2162)	nn		Salicylsäureglucosid
12,0	343,1	497 (± 70)	nn		
13,8	469,2	16264 (± 1092)	nn		
15,3	439,2	570 (± 47)	nn		
16,2	439,2	858 (± 109)	nn		
26,8	485,2	nb	nn		
27,8	437,2	265 (± 74)	nn		
Metabolitentyp 3					
11,1	477,2*	3663 (± 790)^a	199 (± 11)^b	19,0 ± 4,3	
12,8	447,2	1480 (± 213)^a	859 (± 63)^b	1,8 ± 0,3	
14,1	337,1	936 (± 123)^a	358 (± 39)^b	2,9 ± 0,5	*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure
15,2	337,1	2039 (± 256)^a	464 (± 54)^b	5,0 ± 0,9	*E*-4-p-Coumaroylchinasäure
16,1	337,1*	8152 (± 1182)^a	527 (± 53)^b	17,1 ± 3,3	*E*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,5	337,1*	8027 (± 1137)^a	922 (± 87)^b	9,4 ± 1,7	*Z*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,7	367,1*	1028 (± 134)^a	101 (± 11)^b	11,2 ± 1,9	*E*-5-Feruloylchinasäure
17,1	367,1*	1718 (± 248)^a	226 (± 27)^b	8,4 ± 1,5	*Z*-5- Feruloylchinasäure
19,2	319,1*	1289 (± 103)^a	20 (± 2)^b	70,8 ± 8,6	*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure
19,3	319,1*	1497 (± 203)^a	47 (± 6)^b	34,7 ± 5,9	*E*-3-p-Coumaroylshikimisäure
25,0	805,6	3164 (± 384)^a	1624 (± 83)^b	2,0 ± 0,3	
Metabolitentyp 4					
17,6	312,1	145 (± 37)^a	35 (± 4)^b	4,5 ± 1,3	*Z*-Feruloyltyramin
18,8	312,1	57 (± 12)	nn		*E*-Feruloyltyramin
22,3	312,1*	577 (± 121)^a	13 (± 1)^b	48,1 ± 12,8	*Z*-Feruloyltyramin
24,0	312,1*	4768 (± 841)^a	133 (± 7)^b	36,8 ± 6,9	*E*-Feruloyltyramin
24,0	805,6	355 (± 44)^a	169 (± 15)^b	2,3 ± 0,4	
Metabolitentyp 5					
8,0	353,3	5100 (± 245)	6253 (± 434)	0,8 ± 0,1	*Z*-3-Caffeoylchinasäure
9,6	353,3	58218 (± 3310)	65971 (± 4555)	0,9 ± 0,1	*E*-3-Caffeoylchinasäure
11,4	353,3	2403 (± 166)	2544 (± 150)	1,0 ± 0,1	*Z*-4-Caffeoylchinasäure
13,0	353,3	15892 (± 803)	17648 (± 725)	0,9 ± 0,1	*E*-4-Caffeoylchinasäure
13,6	353,3	108061 (± 4067)	100402 (± 2893)	1,1 ± 0,1	*E*-5-Caffeoylchinasäure
14,4	353,3	19982 (± 219)	17960 (± 922)	1,1 ± 0,1	*Z*-5-Caffeoylchinasäure
20,7	515,1	1444 (± 128)	1696 (± 151)	0,9 ± 0,1	3,5-diCaffeoylchinasäure

Die Zahlenwerte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler mit je n=8. $^{a-b}$ Zahlenwerte, die sich innerhalb einer Zeile signifikant unterscheiden sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Für den statistischen Vergleich wurde der t-Test (P<0,05) angewandt. *Die Peakflächen der Massen, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, wurden vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert. Intensitäten der Peakfläche (Int.). *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*). Frischgewicht (FG). Nicht nachweisbar (nn). Nicht bestimmbar (nb).

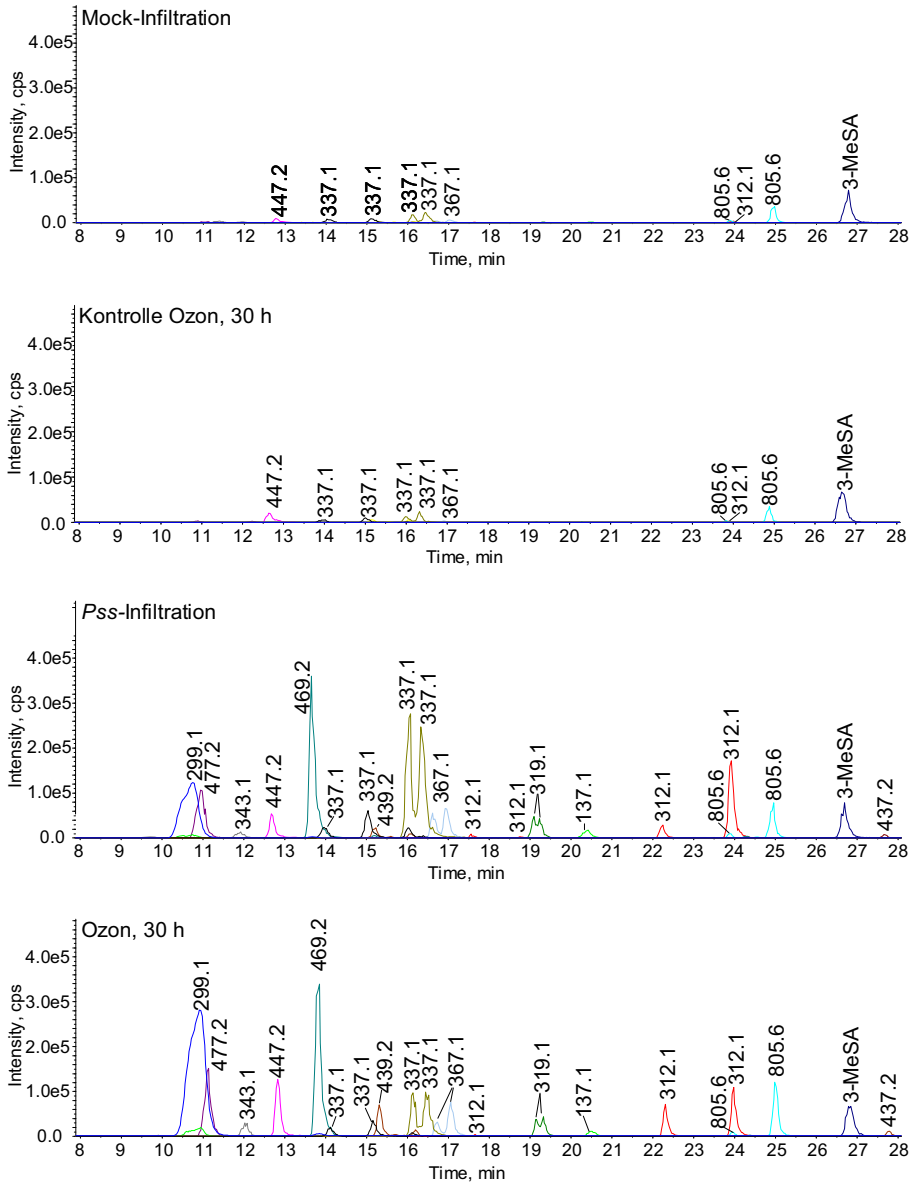


ABBILDUNG 4.14: MRM-Messungen (Extracted Ion Chromatogramme) zur Bestimmung der ozoninduzierten Metabolite in einem Einzelblatt infiltriert mit *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*-Infiltration), in einer ozonbehandelten Einzelblattprobe (170 ppb, 5 h) (Ozon, 30 h) sowie in den jeweils entsprechenden Kontrollproben (Mock-Infiltration und Kontrolle Ozon, 30 h). Alle Einzelblätter wurden 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet. 3-MeSA wurde als interner Standard verwendet.

4.5.5 Vergleich von Ozonstress mit Paraquat-Stress

Zur Untersuchung, welche der ermittelten ozoninduzierten Metabolite unter einer Behandlung mit PQ im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen induziert wurde, wurden die Proben SinglePQ10µM, SinglePQ100µM und SinglePQKon mit der MRM-Methode untersucht. Neben den ozoninduzierten Metaboliten wurden zusätzlich auch hier die Metabolite des Metabolitentyps 5 bestimmt.

Die Proben wurden für die MRM-Bestimmung in der gleichen Weise aufbereitet und untersucht wie V1Single*Pss* und V2Single*Pss* (Kap. 4.5.4). Die ermittelten Peakflächen aus den jeweiligen Einzelblättern aller Metabolite sind, unter Angabe der entsprechenden SE sowie der jeweiligen x-fachen Induktion, in Tab. 4.5 für SinglePQ100µM und in Tab. 4.6 für SinglePQ10µM aufgeführt.

Die XICs der MRM-Bestimmungen von einem Kontrolleinzelblatt (Kontrolle PQ) sowie je einem behandelten Einzelblatt (PQ, 100 µM; PQ, 10 µM und Ozon, 30 h) sind als repräsentative Beispiele in Abb. 4.15 aufgeführt.

TABELLE 4.5: Quantifizierung der ermittelten Metabolite mit der MRM-Methode in Einzelblättern behandelt mit PQ (100 µM)

RT (min)	Masse $[M-H]^-$	Int. PQ (100 µM/L) (area/mg FG)	Int. Kontrolle (area /mg FG)	Induktion (x-fach)	Substanz
Metabolitentyp 1					
20,5	137,1	542 (± 66)	nn		Salicylsäure
Metabolitentyp 2					
9,9	343,1	nb	nn		
10,9	299,1	1685 (± 183)	nn		Salicylsäureglucosid
12,0	343,1	821 (± 273)	nn		
13,8	469,2	959 (± 184)	nn		
15,3	439,2	nb	nn		
16,2	439,2	nn	nn		
26,8	485,2	nn	nn		
27,8	437,2	329 (± 110)	nn		
Metabolitentyp 3					
11,1	477,2*	3201 (± 323)[a]	281 (± 24)[b]	12,0 ± 1,6	
12,8	447,2*	1469 (± 113)[a]	968 (± 51)[b]	1,5 ± 0,1	
14,1	337,1	668 (± 91)	735 (± 94)	1,1 ± 0,2	*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure
15,2	337,1	1061 (± 171)	1023 (± 163)	1,3 ± 0,4	*E*-4-p-Coumaroylchinasäure
16,1	337,1*	1767 (± 163)	1400 (± 249)	1,7 ± 0,4	*E*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,5	337,1	2337 (± 245)	2295 (± 362)	1,3 ± 0,3	*Z*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,7	367,1	606 (± 64)[a]	236 (± 27)[b]	3,0 ± 0,6	*E*-5-Feruloylchinasäure
17,1	367,1	1094 (± 88)[a]	502 (± 56) [b]	2,5 ± 0,5	*Z*-5- Feruloylchinasäure
19,2	319,1	418 (± 46)[a]	72 (± 9) [b]	6,7 ± 1,2	*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure
19,3	319,1	289 (± 38)[a]	124 (± 15) [b]	2,6 ± 0,5	*E*-3-p-Coumaroylshikimisäure
25,0	805,6	2713 (± 115)	2827 (± 86)	1,0 ± 0,1	
Metabolitentyp 4					
17,6	312,1	239 (± 45)[a]	151 (± 29)[b]	2,0 ± 0,5	*Z*-Feruloyltyramin
18,8	312,1	113 (± 23)	nn		*E*-Feruloyltyramin
22,3	312,1	376 (± 47)[a]	134 (± 26)[b]	3,8 ± 0,9	*Z*-Feruloyltyramin
24,0	312,1	2268 (± 311)[a]	524 (± 62)[b]	4,8 ± 0.9	*E*-Feruloyltyramin
24,0	805,6	265 (± 12)[a]	355 (± 13)[b]	0,8 ± 0,1	
Metabolitentyp 5					
8,0	353,3	5475 (± 678)[a]	7350 (± 418)[b]	0,8 ± 0,1	*Z*-3-Caffeoylchinasäure
9,6	353,3	65037 (± 6203)	81438 (± 4909)	0,8 ± 0,1	*E*-3-Caffeoylchinasäure
11,4	353,3*	3132 (± 495)	4107 (± 524)	0.9 ± 0,2	*Z*-4-Caffeoylchinasäure
13,0	353,3	14744 (± 1101)	17915 (± 1115)	0,9 ± 0,1	*E*-4-Caffeoylchinasäure
13,6	353,3	90801 (± 3934)[a]	114353 (± 5372)[b]	0,8 ± 0,1	*E*-5-Caffeoylchinasäure
14,4	353,3	19931 (± 1613)	24265 (± 1686)	0,8 ± 0,1	*Z*-5-Caffeoylchinasäure
20,7	515,1	1917 (± 93)[a]	3785 (± 314)[b]	0,5 ± 0,2	3,5-diCaffeoylchinasäure

Die Zahlenwerte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler mit je n=8. [a-b] Zahlenwerte, die sich innerhalb einer Zeile signifikant unterscheiden sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Für den statistischen Vergleich wurde der t-Test (P<0,05) angewandt. *Die Peakflächen der Massen, die mit einem Sternchen gekennzeichnet sind, wurden vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert. Intensitäten der Peakfläche (Int.). Paraquat (PQ). Frischgewicht (FG). Nicht nachweisbar (nn). Nicht bestimmbar (nb).

TABELLE 4.6: Quantifizierung der ermittelten Metabolite mit der MRM-Methode in Einzelblättern behandelt mit PQ (10 µM)

RT (min)	Masse $[M-H]^-$	Int. PQ (10 µM/L) (area/mg FG)	Int. Kontrolle (area /mg FG)	Induktion (x-fach)	Substanz
Metabolitentyp 1					
20,5	137,1	nn	nn		Salicylsäure
Metabolitentyp 2					
9,9	343,1	nn	nn		
10,9	299,1	nn	nn		Salicylsäureglucosid
12,0	343,1	nn	nn		
13,8	469,2	nn	nn		
15,3	439,2	nn	nn		
16,2	439,2	nn	nn		
26,8	485,2	nn	nn		
27,8	437,2	nn	nn		
Metabolitentyp 3					
11,1	**477,2***	**502 (± 78)[a]**	**281 (± 24)[b]**	**1,9 ± 0,3**	
12,8	447,2	884 (± 81)	968 (± 51)	0,9 ± 0,1	
14,1	337,1	669 (± 43)	735 (± 94)	1,1 ± 0,2	*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure
15,2	337,1	973 (± 72)	1023 (± 163)	1,2 ± 0,3	*E*-4-p-Coumaroylchinasäure
16,1	337,1*	1273 (± 113)	1400 (± 249)	1,2 ± 0,3	*E*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,5	337,1*	2073 (± 163)	2295 (± 362)	1,1 ± 0,2	*Z*-5-p-Coumaroylchinasäure
16,7	367,1	291 (± 23)	236 (± 27)	1,4 ± 0,3	*E*-5-Feruloylchinasäure
17,1	367,1	604 (± 45)	502 (± 56)	1,4 ± 0,3	*Z*-5- Feruloylchinasäure
19,2	319,1	79 (± 9)	72 (± 9)	1,3 ± 0,2	*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure
19,3	319,1	122 (± 11)	124 (± 15)	1,1 ± 0,2	*E*-3-p-Coumaroylshikimisäure
25,0	805,6	2634 (± 94)	2827 (± 86)	0,9 ± 0,1	
Metabolitentyp 4					
17,6	312,1	92 (± 10)	151 (± 29)	0,8 ± 0,2	*Z*-Feruloyltyramin
18,8	312,1	nn	nn		*E*-Feruloyltyramin
22,3	312,1	98 (± 11)	134 (± 26)	1,0 ± 0,2	*Z*-Feruloyltyramin
24,0	312,1	475 (± 38)	524 (± 62)	1,0 ± 0,1	*E*-Feruloyltyramin
24,0	805,6	325 (± 23)	355 (± 13)	0,9 ± 0,1	
Metabolitentyp 5					
8,0	353,3	6117 (± 609)	7350 (± 418)	0,9 ± 0,1	*Z*-3-Caffeoylchinasäure
9,6	353,3	72246 (± 6739)	81438 (± 4909)	0,9 ± 0,1	*E*-3-Caffeoylchinasäure
11,4	353,3*	3123 (± 242)	4107 (± 524)	0.9 ± 0,1	*Z*-4-Caffeoylchinasäure
13,0	353,3	17755 (± 994)	17915 (± 1115)	1,0 ± 0,1	*E*-4-Caffeoylchinasäure
13,6	353,3	109632 (± 4821)	114353 (± 5372)	1,0 ± 0,1	*E*-5-Caffeoylchinasäure
14,4	353,3	22002 (± 1425)	24265 (± 1686)	0,9 ± 0,1	*Z*-5-Caffeoylchinasäure
20,7	515,1	4602 (± 480)	3785 (± 314)	1,3 ± 0,2	3,5-diCaffeoylchinasäure

Die Zahlenwerte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler mit je n=8. [a-b] Zahlenwerte, die sich innerhalb einer Zeile signifikant unterscheiden sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Für den statistischen Vergleich wurde der t-Test (P<0,05) angewandt. *Die Peakflächen der Massen, die mit einem Sternchen gekennzeichnet sind, wurden vor der statistischen Analyse logarithmisch transformiert. Fettgedruckt: Einzige Substanz, die einen signifikanten Unterschied aufweist. Intensitäten der Peakfläche (Int.). Paraquat (PQ). Frischgewicht (FG). Nicht nachweisbar (nn). Nicht bestimmbar (nb).

Eine Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite in den SinglePQ100 im Vergleich zu SinglePQKon zeigte, dass 16 der 25 Metabolite der Metabolitentypen 1-4 auch unter einem Stress verursacht durch PQ (100 µM) induziert werden (Tab. 4.5 und Abb. 4.15). Die induzierten Metabolite wiesen dabei alle in SinglePQ100 im Vergleich zu den ozonbehandelten Einzelblättern eine geringere Intensität auf (Abb. 4.15). In den SinglePQ100 wurden bei den Metaboliten des Metabolitentyps 2 lediglich die Substanzen mit den quasimolekularen Massen m/z 439,2 mit einer RT von 16,2 min und m/z 485,2 nicht nachgewiesen. Für den Metabolitentyp 3 zeigten die vier Isomere der p-CoQA sowie die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 und einer RT von 25,0 min keine signifikante Induktion gegenüber den entsprechenden Kontrollen.

Die Metabolite des Metabolitentyps 5 zeigten dagegen, im Vergleich zu den Kontrollen, alle eine Tendenz zur Abnahme der jeweiligen Peakflächen in SinglePQ100 (Tab. 4.5). Bei der *Z*-3-CQA, der *E*-5-CQA sowie der 3,5-diCQA wurde eine signifikante Abnahme festgestellt. Des Weiteren wurde auch für den Metaboliten mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 und einer RT von 24,0 min (Metabolitentyp 4) eine signifikante Abnahme der Peakfläche ermittelt (Tab. 4.5).

Bei der Quantifizierung der ozoninduzierten Metabolite in den SinglePQ10 im Vergleich zu den SinglePQKon war nur der Metabolit mit der quasimolekularen Masse m/z 477 signifikant induziert (Tab. 4.6). Alle anderen Metabolite der Metabolitentypen 2-4 wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit PQ (10 µM) behandelten Proben und den Kontrollen auf (Tab. 4.6 und Abb. 4.15). Des Weiteren zeigten auch die Metabolite des Metabolitentyps 1 in SinglePQ10 ein vergleichbares Verhalten wie in den Kontrollen: Die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 437 war in SinglePQ10 nicht bestimmbar und die anderen Metabolite des Metabolitentyps 1 waren in den Einzelblättern nicht nachweisbar (Tab. 4.6).

Die Metaboliten des Metabolitentyps 5 zeigten in SinglePQ10 gegenüber SinglePQKon keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Peakflächen (Tab. 4.5), so dass diese Substanzen ein vergleichbares Verhalten wie unter Ozonstress oder durch *Pss* hervorgerufenen Pathogenstress aufwiesen.

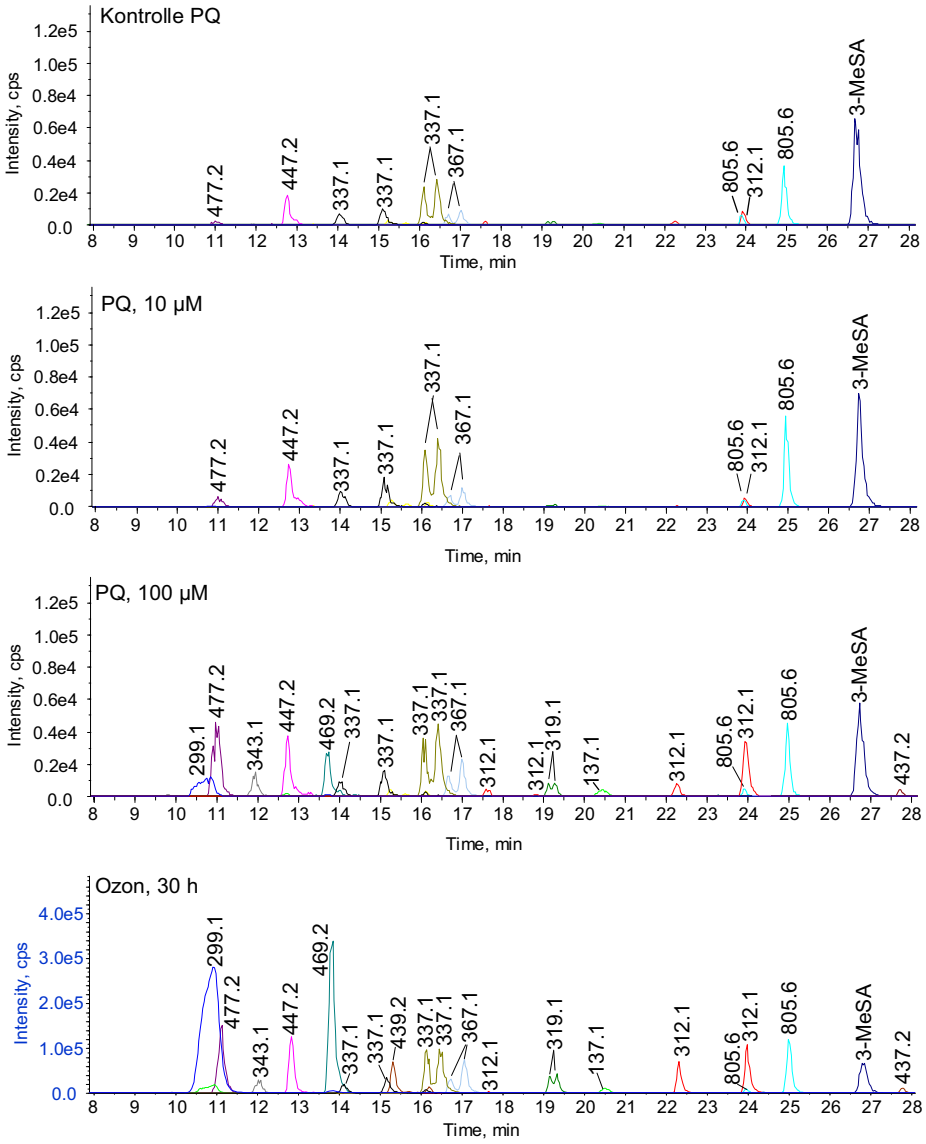


ABBILDUNG 4.15: MRM-Messungen (Extracted Ion Chromatogramme) zur Bestimmung der ozoninduzierten Metabolite in einem Kontrolleinzelblatt besprüht mit deionisiertem Wasser (Kontrolle PQ), in einem Einzelblatt besprüht mit Paraquat (PQ, 10 µM), in einem Einzelblatt besprüht mit Paraquat (PQ, 100 µM) sowie in einer ozonbehandelten Einzelblattprobe (Ozon, 30 h). Alle Einzelblätter wurden 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet. 3-MeSA wurde als interner Standard verwendet. Die y-Achse des XIC von Ozon, 30 h weist eine andere Skalierung auf als die anderen drei vorgestellten XICs.

4.5.6 Verhalten der ozoninduzierten Metabolite in Einzelblättern, die einem Pathogenstress oder PQ-Stress ausgesetzt wurden

Ein direkter Vergleich der Peakflächen der einzelnen Metabolite zwischen den Blättern, die unterschiedlichen Stressoren ausgesetzt wurden ist nicht möglich, da sich die Stressoren deutlich voneinander unterscheiden. Es ist jedoch möglich das Verhalten der Metabolite des Metabolitentyps 3 und 4, die in den Kontrollen bereits vorhanden waren und unter demselben Stress verstärkt gebildet wurden, anhand ihrer x-fachen Induktion miteinander zu vergleichen. Metabolite, die unter einem bestimmten Stressor besonders hohe Induktionen zeigten, könnten unter diesem Stressor eine wichtige Rolle spielen. In Abb. 4.16 und Abb. 4.17 sind in je einem Diagramm die x-fachen Induktionen der unter diesem Stress signifikant erhöhten ermittelten ozoninduzierten Metabolite dargestellt.

Sowohl unter Ozonstress als auch unter Pathogenstress zeigten die Isomere des FTs (RT=22,3 und 24,0 min) sowie die *E*- und *Z*-3-p-CoShiA die höchsten Induktionen jeweils im Vergleich zu den Induktionen der anderen unter diesem Stress induzierten Metabolite. Unter Ozonstress wies außerdem noch die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 477 eine hohe Induktion auf, wohingegen diese Substanz unter Pathogenstress nur eine mittlere Induktion zeigte (Abb. 4.16). Bei einer Behandlung mit PQ (100 µM), die einen oxidativen Stress in der Pflanze verursachte, der vermutlich aufgrund des Überschreitens eines Schwellenwerts an ROS zu einer Pathogenabwehr der Pflanze führte, zeigte die quasimolekulare Masse m/z 477 eine besonders hohe Induktion im Vergleich zu den Induktionen der anderen unter PQ (100 µM) induzierten Metabolite. Des Weiteren zeigten die Isomere des FTs und die *Z*-3-p-CoShiA unter PQ (100 µM) eine mittlere Induktion (Abb. 4.17). Nach einer Behandlung mit PQ (10 µM), die in der Pflanze zu einem oxidativen Stress führte, zeigte ausschließlich die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 477 eine signifikante Induktion (Abb. 4.17).

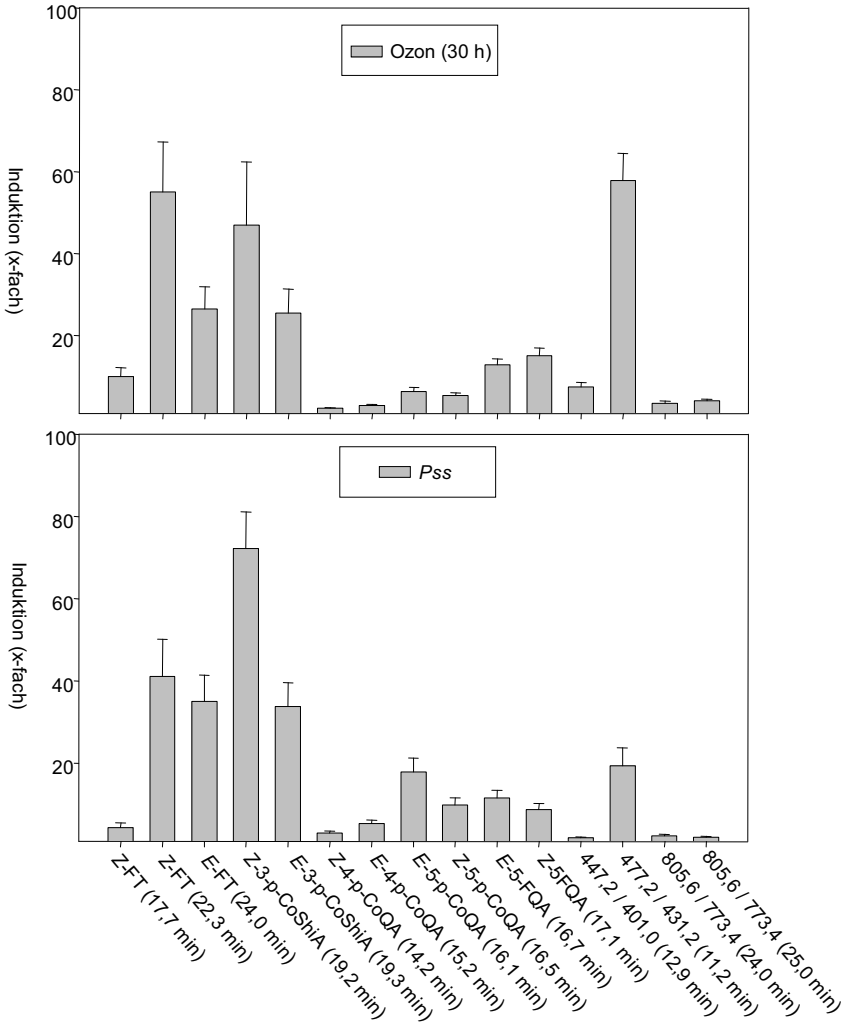


ABBILDUNG 4.16: Induktionen der ermittelten ozoninduzierten Metabolite (Metabolitentyp 3 und 4) in ozonbehandelten Einzelblättern (170 nl l^{-1}, t=5 h) (n=8) sowie in mit *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*) infizierten Einzelblättern (n=8) jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (n=8). Die Einzelblätter wurden jeweils 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Die Balken stellen die Mittelwerte der Induktionen ± Standardfehler dar. Jede Substanz, deren Induktion in Form eines Balkens aufgeführt ist, zeigte eine signifikante Induktion gegenüber den entsprechenden Kontrollen. Feruloyltyramin (FT). Coumaroylshikimisäure (CoShiA). Coumaroylchinasäure (CoQA). Feruloylchinasäure (FQA).

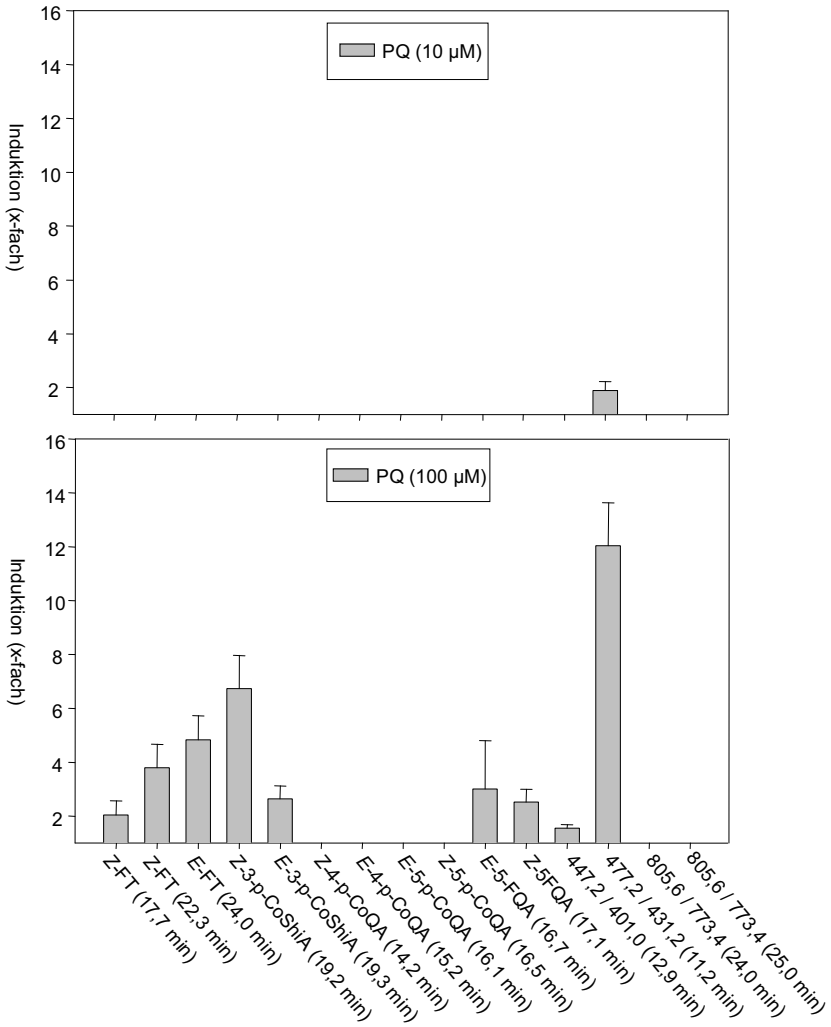


ABBILDUNG 4.17: Induktionen der ermittelten ozoninduzierten Metabolite (Metabolitentyp 3 und 4) in Einzelblättern behandelt mit Paraquat (10 µM) (n=8) sowie in Einzelblättern behandelt mit Paraquat (100 µM) (n=8) jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (n=8). Die Einzelblätter wurden jeweils 30 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Die Balken stellen die Mittelwerte der Induktionen ± Standardfehler dar. Jede Substanz, deren Induktion in Form eines Balkens aufgeführt ist, zeigte eine signifikante Induktion gegenüber den entsprechenden Kontrollen. Feruloyltyramin (FT). Coumaroylshikimisäure (CoShiA). Coumaroylchinasäure (CoQA). Feruloylchinasäure (FQA).

Die Metabolite des Metabolitentyps 1 und 2 sowie das Isomer des FTs mit einer RT=18,8 min waren in den Kontrollblättern aller Behandlungen nicht nachweisbar. In Tab. 4.7 ist aufgeführt, welche der Metabolite des Metabolitentyps 1 und 2 unter dem jeweiligen Stressor induziert wurden. Die Tab. 4.7 dient der Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kap. 4.5.4 und 4.5.5.

TABELLE 4.7: Vorkommen der Metabolite des Metabolitentyps 1 und 2 sowie des Feruloyltyramins (RT=18,8 min) in den behandelten Einzelblattproben

RT (min)	Masse $[M-H]^-$	Substanz	Ozon (30 h)	*Pss*	PQ (100 µM)	PQ (10 µM)
Metabolitentyp 1						
20,5	137,1	Salicylsäure	b	b	nb	nn
Metabolitentyp 2						
9,9	343,1		b	b	nb	nn
10,9	299,1	Salicylsäureglucosid	b	b	b	nn
12,0	343,1		b	b	b	nn
13,8	469,2		b	b	b	nn
15,3	439,2		b	b	nb	nn
16,2	439,2		b	b	nn	nn
26,8	485,2		b	nb	nn	nn
27,8	437,2		b	b	b	nb
Metabolitentyp 3						
18,8	312,1	*E*-Feruloyltyramin	b	b	b	nn

Retentionszeit (RT), bestimmbar (b), nicht bestimmbar (nb), nicht nachweisbar (nn).

5 Einordnung der Ergebnisse in den biologischen Kontext

5.1 Induktion von phenolischen Substanzen unter Ozonstress

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels LC-ESI-MS im EMS Modus 25 Metabolite ermittelt, die unter einem akuten Ozonstress in den Blättern 4 von *N. tabacum* L. cv Bel W3 induziert wurden. 14 dieser Metabolite wurden anhand ihrer Fragmentspektren identifiziert. Eine Absicherung der Strukturaufklärung erfolgte durch die Ermittlung der Summenformeln der jeweiligen Sekundärmetabolite anhand der durch FTICR-MS-Messungen ermittelten akkuraten Massen. Bei den identifizierten Substanzen handelt es sich um Salicylsäure (SA), Salicylsäure-ß-D-glucopyranosid (SA-G), *E*-/*Z*-5-Feruloylchinasäure (FQA), *E*-/*Z*-4-p-Coumaroylchinasäure (CoQA), *E*-/*Z*-5-p-CoQA, *E*-/*Z*-3-p-Coumaroylshikimisäure (CoShiA) sowie vier Isomere des Feruloyltyramins (FT). Alle identifizierten Metabolite gehören den Polyphenolen an, wobei SA und SA-G der Klasse der Phenolcarbonsäuren und die anderen identifizierten, ozoninduzierten Metabolite der Klasse der Hydroxyzimtsäurederivate (HCAs) angehören. Da sowohl die Probenvorbereitung als auch die LC-MS-Methode im EMS-Modus für die Analytik von löslichen, phenolischen Substanzen optimiert wurde, handelt es sich bei den weiteren ermittelten ozoninduzierten Metaboliten vermutlich auch um lösliche Polyphenole.

Die Polyphenole sind weit verbreitete Metabolite in Pflanzen. Sie leiten sich von der Zimtsäure ab, deren Bildung aus L-Phenylalanin durch das Enzym L-Phenylalanin-ammoniumlyase (PAL) katalysiert wird (Dixon et al. 2002). Bei der PAL handelt es sich um das Eingangsenzym der Phenylpropanoidbiosynthese, das unter einem akuten Ozonstress sowohl auf der Transkriptebene als auch auf der Aktivitätsebene in *N. tabacum* L. cv Bel W3 induziert wird. Die PAL zeigt dabei im zeitlichen Verlauf ein transientes Verhalten mit einer höchsten Induktion 5 h nach Beginn der Ozonbehandlung. Ein unter Ozonstress dreifach erhöhter Gesamtphenolgehalt in ausgewachsenen Blättern wird unter anderem auf die erhöhte Aktivität der PAL auf Transkript- und Aktivitätsebene zurückgeführt (Pasqualini et al. 2003). Eine verstärkte Induktion von phenolischen Substanzen, wie sie in der vorliegenden Arbeit für 25 phenolische Metabolite gezeigt wurde, korreliert somit sehr gut mit der beschriebenen erhöhten Aktivität der PAL. Ein akuter Ozonstress führt auch in Studien von Severino et al. (2007) und Francini et al. (2007) zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtphenolgehaltes

in den Blättern einer ozonempfindlichen Sorte des weißen Klees (*Trifolium repens*) und in den Blättern von Sojabohnen (*Glycine max*) (Booker & Miller 1998). Außerdem zeigten mikroskopische Studien von Vollenweider et al. (2003) an Blättern von Waldbäumen, die einem chronischen Ozonstress ausgesetzt wurden, eine Erhöhung des Gesamtphenolgehalts in den Vakuolen der Blattzellen.

Für die im Phenylpropanoidweg unter Ozonstress verstärkt gebildeten Polyphenole wird sowohl eine Funktion in der oxidativen Abwehr als auch in der unter einem Ozonstress induzierten Pathogenabwehr der Pflanze diskutiert (Langebartels et al. 2002). Auf der einen Seite können phenolische Substanzen mit hoher antioxidativer Kapazität geeignet sein, die unter einem akuten Ozonstress gebildeten ROS abzufangen (Grace & Logan 2000). Auf der anderen Seite können die ozoninduzierten Substanzen als Phytoalexine fungieren oder in die Ligninbiosynthese und damit in die Verstärkung der Zellwände involviert sein (Kangasjärvi et al. 1994; Sandermann et al. 1998). Diese Funktionen würden somit auf eine Rolle in der unter Ozonstress induzierten Pathogenabwehr der Pflanze hinweisen. Eine Strukturaufklärung der ozoninduzierten Substanzen könnte dabei Hinweise auf ihre möglichen Funktionen geben. Eine der wenigen bisherigen Studien, in der einzelne ozoninduzierte lösliche Phenole identifiziert und mit einer Funktion in Bezug gesetzt wurden, ist die Studie von Eckey-Kaltenbach et al. (1993 und 1994). In dieser Arbeit wurden in Petersilie (*Petroselinum crispum*) die Flavonglucoside Apiin und 6´´-O-Malonylapiin sowie fünf Cumarinderivate wie z. B. das Umbelliferon unter einem akuten Ozonstress induziert. Die Flavonglucoside zeigen sowohl eine antioxidative als auch eine antimikrobielle Wirkung (Eckey-Kaltenbach et al. 1993) und könnten somit sowohl an der unter Ozonstress induzierten oxidativen Abwehr als auch an der Pathogenabwehr beteiligt sein. Cumarinderivate sind typische Substanzen, die während einer Infektion mit Pathogenen in den Petersilienblättern induziert werden (Tietjen et al. 1983). Sie sind folglich unter Ozonstress wahrscheinlicher der Pathogenabwehr zuzuordnen. Sowohl Umbelliferon als auch Apiin sind typische Inhaltsstoffe der Familie der *Apiaceae*, denen auch Petersilie angehört. In Tabak, als Mitglied der Familie der *Solanaceaen*, sind sie dagegen nicht enthalten. In der Tabakvarietät L. cv Bel W3 wurden bisher nur SA und SA-G als induzierte lösliche Phenole unter einem akuten Ozonstress identifiziert (Pasqualini et al. 2002). Beide Substanzen werden nicht nur unter einem Ozonstress in Tabak induziert sondern auch während einer Pathogenabwehr, wobei SA dabei als Signalsubstanz fungiert (Yalpani et al. 1994; Heiden et al. 1999). Unter einem akuten

Ozonstress sind somit beide Metabolite vermutlich aufgrund der ozoninduzierten Pathogenabwehr in der Pflanze gebildet worden.

Eine Diskussion der möglichen Funktionen der in der vorliegenden Studie ermittelten 25 ozoninduzierten phenolischen Metabolite erfolgt in den Kap. 5.3 und 5.4. Hinweise geben dabei die Strukturaufklärung der 14 identifizierten Metabolite sowie das Verhalten aller Metabolite 10 h bzw. 30 h nach Beginn der Ozonbehandlung. Das Verhalten der ozoninduzierten Metabolite unter einer anderen Art des oxidativen Stresses als Ozon sowie unter einem Pathogenstress können weitere wichtige Hinweise darauf geben, ob die ozoninduzierten Metabolite wahrscheinlicher eine Rolle in der direkten oxidativen oder pathogenen Abwehr der Pflanze spielen.

5.2 Die HCA-Isomere kommen in *N. tabacum* L. cv Bel W3 in *E*- und *Z*-Konfiguration vor

Fast alle identifizierten HCAs, bis auf die diCQAs, wurden sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration detektiert (Kap. 4.2). Wie von Schoch et al. (2001) gezeigt wurde, sind wahrscheinlich die *E*-Isomere die Produkte und Substrate der Phenylpropanoidbiosynthese, da von dem Enzym p-Coumarsäure-3-hydroxylase (C3H) der Phenylpropanoidbiosynthese *in vitro* das *E*-Isomer der p-CoShiA umgesetzt wird, das entsprechende *Z*-Isomer jedoch nicht. Die *E*-Isomere kommen außerdem in größeren Mengen in natürlichem Gewebe vor als die *Z*-Isomere. Der Grund für das Vorhandensein von detektierbaren Mengen an *Z*-Isomeren könnte auf eine nicht-enzymatische Umlagerung der *E*-Isomere zu den *Z*-Isomeren durch die Exposition mit UV-Licht zurückgeführt werden (Parr & Bolwell 2000). Möller und Herrmann (1982) sind der Ansicht, dass die *Z*-Isomere durch die unbeabsichtigte, kurze Exposition mit UV-Licht während der Probenvorbereitung gebildet werden. In Kap. 4.2.3 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Probenvorbereitung nicht zu einem vergleichbar hohen Anteil an *Z*-Isomeren führen kann, wie er in den Pflanzenextrakten ermittelt wurde. Die identifizierten *Z*-Isomere in Pflanzenextrakten sind somit zum jeweiligen überwiegenden Anteil keine Artefakte sondern natürliche Substanzen, die auch in der Pflanze gebildet werden. Stattdessen ist es wahrscheinlicher, dass die HCAs in *Z*-Konfiguration durch eine Isomerisierung der *E*-Isomere bereits in der Pflanze während des Wachstums durch die Exposition mit Licht, das UV-Anteile enthält, entstehen. Eine vergleichbare Hypothese wurde bereits in anderen

Arbeiten diskutiert (Haskins et al. 1964; Engelsma 1974; Yamamoto & Towers 1985; Wong et al. 2005; Clifford et al. 2008). Des Weiteren könnten die *Z*-Isomere durch eine enzymatische Umlagerung entstanden sein. So wurde z. B. in den Blütenknospen von Astern die *Z*-5-p-CoQA als einzige *Z*-Verbindung neben weiteren *E*-Hydroxyzimtsäuren identifiziert. Der Autor vermutete daher, dass diese Verbindung biosynthetisch in der Pflanze gebildet wird (Clifford et al. 2006). Da jedoch in Tabak fast alle identifizierten HCAs sowohl in der *E*- als auch in der *Z*-Form in den Pflanzenextrakten vorlagen (Kap. 4.2), ist es wahrscheinlicher, dass die *Z*-Isomere in der Pflanze durch UV-Licht während des Wachstums aus den *E*-Isomeren entstanden und nicht auf einen enzymatischen Ursprung zurückzuführen sind. In Übereinstimmung mit dieser Untersuchung wurden von Takahama (1998) die 3-, 4- und 5-CQA sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration in *N. tabacum* L. cv Bel W3 detektiert.

Bei den diCQAs wurde keine *E*-/*Z*-Isomerie ermittelt. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass möglicherweise eine Co-Elution der jeweiligen *E*-/*Z*-Isomere vorlag oder dass weitere *E*-/*Z*-Isomere der diCQAs nur in so geringen Mengen gebildet wurden, dass sie nicht nachweisbar waren.

5.3 Verhalten der ozoninduzierten Metabolite unter einem Ozonstress, Pathogenstress sowie unter einem Paraquatstress

5.3.1 Ozonstress

Ein akuter Ozonstress führt in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3 zu einer Induktion der oxidativen Abwehr sowie der Pathogenabwehr (Sandermann et al. 1998; Rao et al. 2000a), die jedoch beide über die Bildung von ROS getriggert zu sein scheinen. Das Ozon dringt während der Ozonexposition über die Stomata in den Apoplasten des Blattes ein, wobei es im Apoplasten schnell unter Bildung von ROS abgebaut wird. Entsprechend ist die Ozonkonzentration innerhalb des Blattes während der Ozonexposition bereits fast null (Laisk et al. 1989). Bei zu hohen Ozonkonzentrationen übersteigt die zuströmende Menge an Ozon in der frühen Phase der Ozonexposition, die Kapazität der Antioxidantien im Apoplasten die aus dem Ozon entstandenen ROS abzufangen. Dies führt zu einem erhöhten ROS-Spiegel im Apoplasten des Blattes sowie zu einer Störung des zellulären Redoxgleichgewichts und damit zu einem oxidativen Stress (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005). Die erhöhten ROS-Spiegel rufen vermutlich in ozonsensitiven Pflanzen

Signalkaskaden hervor, wie sie üblicherweise bei der Wahrnehmung eines inkompatiblen Pathogens von der Pflanze als Pathogenabwehr induziert werden. Diese Signalkaskaden führen wiederum zu einer hypersensitiven Reaktion (HR). Die HR ist unter anderem mit einer aktiven Bildung von ROS mit einem biphasischen Verlauf in den Chloroplasten der Schließzellen der Stomata assoziiert, die sich später auch in den umgebenden Zellen fortsetzt (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005; Joo et al. 2005). Die erste Phase dieses oxidativen Bursts führt zu einer schnellen Akkumulation von ROS mit einem transienten Verhalten im Apoplasten während der Ozonexposition. Die ROS-Bildung zeigt dabei ein Peakmaximum 2-3 h nach Behandlungsbeginn. Sie tritt sowohl in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3 als auch in der ozontoleranten Tabakvarietät *N. tabacum* L. cv Bel B auf. Die Dauer der ersten Phase des oxidativen Bursts entspricht dabei in der Regel der Zeit der Ozonexposition. Nur in der ozonsensitiven Varietät tritt eine zweite Phase des oxidativen Bursts auf, die sich in einer stärkeren und länger andauernden Akkumulation von ROS äußert und üblicherweise nach der Ozonexposition beginnt. Das Maximum des zweiten ROS-Peaks tritt dabei 10-15 h nach Beginn der Ozonexposition (5 h, 150 nl l^{-1}) auf (Schraudner et al. 1998). Der zweite oxidative Burst ist ein unerlässlicher Faktor bei der Ausbildung der HR und damit auch beim programmierten Zelltod (PCD). Im PCD scheinen unter anderem die Pflanzenhormone SA, Ethylen und Jasmonsäure (JA) eine wichtige Rolle zu spielen. Die Akkumulation der ROS in ozonsensitiven Varietäten, wie *N. tabacum* L. cv Bel W3, wird begleitet von einer starken Induktion der Signalsubstanz SA (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005). Die Induktion der SA unter einem akuten Ozonstress wurde von Ogawa et al. (2005) und Pasqualini et al. (2002) beschrieben und konnte auch in der vorliegenden Arbeit in Blattproben, die 10 h bzw. 30 h nach Beginn der Ozonbehandlung geerntet wurden, gezeigt werden (Kap. 4.3). Die SA zeigte dabei im Zeitverlauf ein transientes Verhalten (Kap. 4.3), das den Verlauf des zweiten oxidativen Bursts (Schraudner et al. 1998) widerspiegelt, denn 10 h bis 15 h nach Beginn der Ozonexposition liegen die höchsten ROS-Gehalte vor, wohingegen 30 h nach Behandlungsbeginn bereits deutlich geringer erhöhte ROS-Konzentrationen detektiert werden. Das Zusammenspiel des erhöhten ROS-Gehaltes mit der induzierten SA leitet die Pathogenabwehr sowie den Zelltod ein. Eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung des Zelltods spielt die Induktion des Phytohormons Ethylen, das an dem erforderlichen Ausweiten der ROS-Bildung auf benachbarte Zellen und damit an einer fortschreitenden Akkumulation der ROS während des zweiten oxidativen Bursts beteiligt ist. Eine Verringerung der Ethylenbildung wird dabei durch eine

Akkumulation der JA hervorgerufen, die die Empfindlichkeit für Ethylen in den benachbarten, gesunden Zellen im Bereich der durch die HR hervorgerufenen Veränderungen erniedrigt. Dadurch kommt es somit auch zu einer Verringerung der ethylenabhängigen ROS-Bildung und folglich zu einer Eindämmung des Zelltods in den benachbarten Zellen (Örvar et al. 1997; Rao et al. 2000b; Kangasjärvi et al. 2005). Ethylen wird zwar sowohl in ozonsensitiven als auch in ozontoleranten Pflanzen mit einem Peakmaximum 3-4 h nach Beginn der Ozonbehandlung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen verstärkt gebildet. In den ozontoleranten Pflanzen ist jedoch der Ethylenpeak deutlich schwächer ausgeprägt (Kangasjärvi et al. 2005), so dass vermutlich eine gewisse Ausprägung der Ethylenbildung gegeben sein muss, um einen zweiten oxidativen Burst und damit eine HR der Pflanze auszulösen, die sich morphologisch in der Ausbildung der typischen punktförmigen Nekrosen äußert. Der Ethylenpeak in der ozontoleranten Varietät wird wahrscheinlich durch den oxidativen Stress während der Ozonexposition hervorgerufen. Warum die ozonsensitiven Varietäten insgesamt empfindlicher auf Ozon reagieren als die ozontoleranten, ist bisher noch nicht vollständig erklärbar, es scheint jedoch von Art zu Art verschiedene Ursachen zu haben.

In einer Studie von Wohlgemuth et al. (2002) wurde gezeigt, dass die Akkumulation der ROS im zweiten oxidativen Burst insbesondere in den Palisadenzellen der Blätter stattfindet. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass es sich bei den akkumulierenden ROS in *N. tabacum* L. cv Bel W3 im Wesentlichen um H_2O_2 handelt. Die Stellen des Blattes, an denen eine Akkumulation von H_2O_2 auftritt, stimmen bezüglich der Anzahl und dem räumlichem Vorkommen mit den 4-15 h später auftretenden punktförmigen Nekrosen überein, die durch den Ozonstress hervorgerufen werden (Schraudner et al. 1998) und wie sie auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten. Die punktförmigen Nekrosen können auf das Absterben benachbarter Palisadenzellen zurückgeführt werden, in denen die HR zu einem Zelltod geführt hat (Rao et al. 2000a; Pasqualini et al. 2003).

Bei einem akuten Ozonpuls wird in der ozonsensitiven Tabakvarietät L. cv Bel W3 als Pathogenabwehr in der HR außerdem die Induktion von PR-Proteinen, darunter die der basischen ß-1,3-Glucanase, auf der Transkriptebene (Ernst et al. 1992; Yalpani et al. 1993; Overmyer et al. 2003) und der Aktivitätsebene (Schraudner et al. 1993) hervorgerufen. Die basische ß-1,3-Glucanase ist ein antimikrobielles Protein, das ß-1,3-Glucane und Chitin und damit die aus diesen Monomerbausteinen bestehenden Polymere in den Zellwänden von

pathogenen Pilzen hydrolysieren kann. Sie könnte somit insbesondere eine Rolle in der Abwehr von pathogenen Pilzen spielen (Schlumbaum et al. 1986; Bol et al. 1990; van Loon et al. 2006). Die basische ß-1,3-Glucanase wird in Tabak positiv durch JA und negativ durch SA reguliert. Hohe Gehalte an JA führen somit zu einer verstärkten Expression der basischen ß-1,3-Glucanase wohingegen SA einen antagonostischen Effekt zeigt (Niki et al. 1998). Die basische ß-1,3-Glucanase wird sowohl nach einer HR als auch nach einer Verwundung der Pflanze induziert (Memelink et al. 1990; Ohashi & Ohshima 1992), da in beiden Prozessen eine Induktion der JA erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Tabakvarietät L. cv Bel W3 30 h nach Beginn der Ozonexposition eine Induktion der basischen ß-1,3-Glucanase auf der Transkriptebene aufweist (Kap. 4.5.3) und damit zu diesem Zeitpunkt eine JA-abhängige Signalkaskade induziert war. Auch Ernst et al. (1992) und Schraudner et al. (1992) wiesen in der gleichen Varietät eine Induktion der basischen ß-1,3-Glucanase auf der Transkriptebene 31 h nach Beginn eines akuten Ozonstresses nach.

5.3.2 Pathogenstress

Eine Infektion von *N. tabacum* L. cv Bel W3 mit dem avirulenten Bakterium *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*Pss*) führt zu einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen. Das Bakterium löst zwar eine lokale Infektion in der Pflanze aus, jedoch wird bei einer inkompatiblen Interaktion das Pathogen von der Pflanze erkannt und aufgrund dessen eine HR von der Pflanze im Bereich der Infektionsstellen ausgelöst. Die HR führt dazu, dass das avirulente Pathogen vor der Ausprägung von Symptomen in seinem Wachstum gehemmt oder abgetötet wird, wodurch ein weiteres Ausbreiten der Infektion verhindert wird (Atkinson et al. 1990; Dangl et al. 1996; Lamb & Dixon 1997; Lam et al. 2001). Dabei kommt es zunächst zu einer ersten Akkumulation von ROS, deren enzymatische Bildung vermutlich in den Chloroplasten der Schließzellen der Stomata beginnt (Allan & Fluhr 1997). Die Stomata sind häufig Eintrittsstellen für Pathogene. Die Akkumulation der ROS weitet sich dann auf die angrenzenden Epidermiszellen der Blätter (Allan & Fluhr 1997) und den Apoplasten aus (Apel & Hirt 2004). Bei einer inkompatiblen Interaktion weist diese Akkumulation der ROS einen biphasischen Verlauf auf. Bei den akkumulierenden ROS handelt es sich bei den meisten Pflanzen um H_2O_2 (Lamb & Dixon 1997). Da bei einer kompatiblen Interaktion der Pflanze mit einem virulenten Pathogen nur der erste oxidative Burst ausgelöst wird, ist vermutlich der 2. oxidative Burst der inkompatiblen Interaktion, wie auch unter Ozonstress,

für die Ausbildung der HR und damit für die Aktivierung des PCDs verantwortlich (Wohlgemuth 2002).

Die Regulation der Pathogenabwehr erfolgt dabei unter anderem auch durch die Pflanzenhormone SA, Ethylen und JA (O'Donnell et al. 2001; Adie et al. 2007). Die HR äußert sich, übereinstimmend mit einer HR hervorgerufen durch einen akuten Ozonstress, unter anderem in der Induktion von PR-Proteinen, wie z. B. der basischen ß-1,3-Glucanase, der PAL und von phenolischen Sekundärmetaboliten (Schraudner et al. 1997; Lamb & Dixon 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnten alle in dieser Arbeit untersuchten Komponenten der HR und der Pathogenabwehr sowohl in den ozonbehandelten als auch in den mit *Pss* infizierten Tabakpflanzen der Varietät L. cv Bel W3 nachgewiesen werden. Die Induktion der Signalsubstanz SA (Kap. 4.5.3 und 4.5.4) weist nach, dass in diesen Pflanzen eine HR und damit eine Pathogenabwehr durch die Pflanzen ausgelöst wurde. Außerdem wurde eine Induktion der basischen ß-1,3-Glucanase auf der Transkriptebene festgestellt, wie sie üblicherweise unter einem Pathogenstress auch beobachtet wird (Lamb & Dixon 1997).

5.3.3 Paraquatstress

Paraquat (PQ) ist ein Bipyridyliumsalz, das in höheren Dosen als Kontaktherbizid eingesetzt wird, indem es auf die Blätter der Pflanzen aufgetragen wird. Das Herbizid greift an der reduzierenden Seite des Photosystems I ein und führt dadurch unter Lichteinwirkung schnell zu einem Welken und Austrocknen des behandelten Pflanzengewebes. Durch das Auftragen von PQ werden unter Lichteinwirkung ROS in der Pflanze gebildet, die durch den dadurch hervorgerufenen oxidativen Stress der Hauptgrund für die toxische Wirkung des PQs sind (Silverman et al. 2005; Dyer & Weller 2005). Durch die Behandlung der Tabakblätter mit zwei verschiedenen Konzentrationen an PQ konnte somit ein oxidativer Stress durch einen anderen Stressor als Ozon oder Pathogene ausgelöst werden. Das Bipyridyliumdikation des PQs bindet in der Nähe des Redoxsystems Ferredoxin des Photosystems 1 im Chloroplasten (Silverman et al. 2005; Dyer & Weller 2005), wodurch vermutlich in verschiedenen Zellen, wie z. B. den Schließzellen der Stomata oder den Epidermiszellen eine Bildung von ROS in den jeweiligen Chloroplasten stattfindet. Der grundlegende Mechanismus der Bildung der

ROS aus dem Bipyridyliumdikation beruht auf der leichten Reduktion dieser Verbindung, wobei durch Übertragung eines Elektrons aus dem Photosystem I ein wasserlösliches, in Abwesenheit von Sauerstoff stabiles Radikalkation entsteht. Das Radikalkation autoxidiert sehr schnell, wodurch wieder das Bipyridyliumdikation und ein Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ entstehen. Das Bipyridyliumdikation kann somit erneut ein Elektron aus dem Photosystem I aufnehmen. Aus dem gebildeten $O_2^{\cdot-}$ können weitere ROS, wie beispielsweise H_2O_2 und $OH^{\cdot}$, entstehen. Die durch die Applikation von PQ gebildeten ROS führen zu einem oxidativen Stress in den Zellen der Pflanze, da aufgrund der kontinuierlichen Bildung dieser Substanzen während eines Lichteinflusses die Kapazität der für das Abfangen der ROS vorhandenen biochemischen Reaktionen nicht mehr ausreicht. Der oxidative Stress führt, insbesondere durch die hochreaktiven $OH^{\cdot}$, zu einer Schädigung der Membranlipide durch Lipidperoxidation sowie zur Schädigung von Proteinen, Nukleinsäuren und Chlorophyll. Wenn der erhöhte ROS-Spiegel in der Zelle nicht auf das übliche Maß eingeschränkt werden kann, führt dies zum nekrotischen Zelltod. Hierbei handelt es sich somit nicht um einen PCD, der gezielt eingeleitet wurde, um ein Pathogen einzudämmen, sondern um einen unkontrollierten Zelltod (Youngman & Elstner 1984; Ananieva et al. 2004; Silverman et al. 2005; Dyer & Weller 2005).

Für die Behandlung der Tabakblätter wurden PQ-Konzentrationen von 10 µM l^{-1} sowie 100 µM l^{-1} verwendet. Eine Konzentration von 10 µM l^{-1} PQ wurde gewählt, um in den Tabakpflanzen L. cv Bel W3 einen oxidativen Stress auszulösen. Von Ananieva et al. (2002) wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit PQ in einer Konzentration von 10 µM l^{-1} zu einem oxidativen Stress bei 12-Tage alten Gerstepflanzen (*Hordeum vulgare*) führt. Der oxidative Stress wurde dabei durch einen erhöhten Gehalt an H_2O_2, eine erhöhten Aktivität von antioxidativ wirksamen Enzymen sowie einem erhöhten Gehalt an Malondialdehyd, das ein Marker für die Lipidperoxidation ist, in den behandelten Proben gegenüber den Kontrollen nachgewiesen. Des Weiteren führt das Behandeln von Pflanzen des ozontoleranten Wildtyps *Arabidopsis thaliana* L. Ökotyp Columbia (*Col-0*) mit PQ (10 µM) zu einer zweifachen Induktion der Ethylenabgabe im Vergleich zu Kontrollpflanzen. (Rao et al. 2002). Somit wird in diesen Pflanzen durch die Behandlung mit PQ (10 µM) ein oxidativer Stress ausgelöst, der sich in einer erhöhten Ethylenabgabe äußert. Die Ethylenabgabe ist wahrscheinlich jedoch nicht ausgeprägt genug gewesen, um eine HR in der Pflanze auszulösen, da die Behandlung mit PQ (10 µM) zu keinen sichtbaren Symptomen bei *Col-0* führt (Rao et al. 2002). Das

unkontrollierte Absterben einzelner Zellen, das durch einen zu hohen ROS-Spiegel in der Zelle hervorgerufen wird, ist mit dem bloßen Auge nicht erkennbar. Erst ein fortschreitendes Ausbreiten des Zelltods in benachbarten Zellen während der HR führt zu sichtbaren Nekrosen (Jaspers et al. 2005).

Bei den in der vorliegenden Arbeit mit PQ (10 µM) behandelten Tabakblättern der Varietät L. cv Bel W3 lag somit vermutlich überwiegend ein oxidativer Stress vor. Dies ist daran erkennbar, dass die Blätter nur vereinzelte sichtbare Nekrosen aufwiesen (Kap. 4.5.2), die auf lokale Effekte während des Behandelns mit PQ (10 µM) zurückgeführt werden könnten. Bei manchen Blättern sammelten sich größere Tropfen auf den Blättern an, wodurch an diesen Stellen vermutlich ein oxidativer Stress auf zueinander benachbarten Zellen herrschte, der jeweils zur Ausbildung des Zelltods führte. Aufgrund des Absterbens benachbarter Zellen könnten diese daher mit bloßem Auge in Form einer Nekrose sichtbar werden, ohne dass eine HR stattgefunden haben muss. Außerdem könnte in manchen Bereichen eventuell ein oxidativer Stress in einem solchen Ausmaß vorgelegen haben, dass dieser zum Auslösen einer lokalen HR führte. Für die verschiedenen ROS konnten bisher noch keine Schwellenwerte definiert werden, die zu einem oxidativen Stress in einem solchem Ausmaß führen, so dass eine HR in der Pflanze induziert wird. Darüber hinaus scheinen die ROS auch unterschiedlich in den Pflanzen zu wirken, da beispielsweise in *Arabidopsis* im oxidativen Burst als Reaktion auf einen akuten Ozonstress neben der Akkumulation von H_2O_2 auch eine Akkumulation von $O_2^{\cdot-}$ erfolgt (Wohlgemuth et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit war in allen mit PQ (10 µM) behandelten Blättern die SA nicht detektierbar (Kap. 4.5.5). Da die SA eine wichtige Rolle im PCD spielt und somit während einer HR in der Pflanze auftritt (Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005), wurde in den mit PQ (10 µM) behandelten Blättern vermutlich keine pathogeninduzierte HR hervorgerufen. Stattdessen könnte der oxidative Stress des PQs in wenigen Zellen der behandelten Blätter zu einer leichten Verwundungsreaktion geführt haben, die wiederum zu einer Induktion der Bildung der JA führte. Eine Induktion der SA-Produktion erfolgt unter einer Verwundung dagegen nicht (Niki et al. 1998). Tatsächlich konnte in einem der mit PQ (10 µM) behandelten Blättern eine mittlere Expression der ß-1,3-Glucanase ermittelt werden (Kap. 4.5.3), die somit vermutlich aufgrund der Verwundung durch den oxidativen Stress in diesem Blatt induziert wurde. In einer weiteren mit PQ behandelten Probe wurde eine

schwach basal ausgeprägte Expression bestimmt, wie sie auch in zwei Kontrollen der PQ-Behandlung in einem vergleichbaren Ausmaß ermittelt wurde. In der mit PQ (10 µM) behandelten Blattprobe führte vermutlich eine leichte Verwundung, und damit ein Signal der JA, zur Expression der basischen ß-1,3-Glucanase. Des Weiteren könnte in dieser Probe, wie vermutlich auch bei den Kontrollen, die schwach basal ausgeprägte Expression der basischen ß-1,3-Glucanase auf einen leichten Stress während der Anzucht, der zu einer schwachen Induktion der JA geführt haben könnte, zurückgeführt werden. In den anderen mit PQ (10 µM) behandelten Proben war dagegen keine Expression der basischen ß-1,3-Glucanase gegeben (Kap. 4.5.3), so dass in diesen Proben die durch den oxidativen Stress hervorgerufene Verwundung vermutlich zu keiner signalrelevanten Konzentration der JA führte.

Die Behandlung der Tabakblätter mit PQ (100 µM) führte in der vorliegenden Arbeit bereits zu deutlich sichtbaren Symptomen in Form von flächigen Nekrosen und einem einsetzenden Verwelken der behandelten Tabakblätter (Kap. 4.5.2) wie sie auch von Ananieva et al. (2002) bei der Behandlung von Gerstenpflanzen mit PQ in einer Konzentration von 100 µM l^{-1} beschrieben wurden. Neben diesen deutlichen morphologischen Veränderungen wurden in den mit PQ (100 µM) behandelten Tabakblättern eine leichte Induktion der Signalsubstanz SA (Kap. 4.5.5) und eine stark ausgeprägte Expression der basischen ß-1,3-Glucanase (4.5.3) ermittelt. Der durch PQ (100 µM) verursachte oxidative Stress wies somit ein solches Ausmaß aus, dass dadurch stellenweise eine Induktion der Pathogenabwehr hervorgerufen wurde, die anhand der Induktion der SA erkennbar ist.

5.3.4 Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Stressoren

Die mit der MRM-Methode untersuchten, ozoninduzierten Metabolite zeigten in den ozonbehandelten Proben (30 h) Peakflächen in vergleichbaren Größenordnungen wie die mit *Pss* infizierten Tabakblätter (Kap. 4.3 und 4.5.4). Die mit PQ (100 µM) behandelten Blätter wiesen dagegen deutlich kleinere Peakflächen auf und acht der 25 ozoninduzierten Metabolite zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Peakfläche gegenüber den entsprechenden Kontrollen (Kap. 4.5.5). Bei PQ (10 µM) war lediglich einer der ozoninduzierten Metabolite signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollblättern erhöht (Kap. 4.5.5). In den mit PQ (10 µM) behandelten Tabakblättern löste somit der überwiegend oxidative Stress nur die

Induktion eines ozoninduzierten Metaboliten aus. Die anderen der induzierten Metabolite sind daher vermutlich einer pathogeninduzierten HR zuzuordnen, weil alle ozoninduzierten Metaboliten auch in den mit *Pss* infizierten Tabakblättern detektierbar waren. Die Metabolite wiesen dabei im MRM-Modus vergleichbare Peakflächen wie bei den ozonbehandelten Tabakpflanzen auf. Die beiden Behandlungen führten jedoch zu unterschiedlichen Expressionen der basischen ß-1,3-Glucanase sowie zu unterschiedlichen Induktionen der SA. Die Expression der basischen ß-1,3-Glucanase war in den mit *Pss* infizierten Pflanzen weniger stark ausgeprägt als in den ozonbehandelten Pflanzen (Kap. 4.5.3). Die SA wies dagegen in den mit *Pss* infizierten Blättern größere Peakflächen auf als in den ozonbehandelten Blättern (Kap. 4.3 und 4.5.4). Diese unterschiedliche Ausprägung der Signale bei den beiden Behandlungen könnte auf unterschiedliche Stadien in der induzierten Pathogenabwehr der Pflanze während des Erntezeitpunkts zurückgeführt werden. In den mit Ozon behandelten Blättern könnte die HR bereits weiter fortgeschritten gewesen sein, so dass aufgrund dessen bereits geringere Anteile an SA zum Erntezeitpunkt vorlagen und somit bereits ein antagonistischer Effekt durch die Akkumulation der JA auf die SA-Bildung eingeleitet wurde (Kangasjärvi et al. 2005). Die SA wird in Form des SA-Gs in den Zellen gespeichert, da es unter einem Pathogenstress schnell akkumuliert (Hennig et al. 1993; Yalpani et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl in den ozonbehandelten Blättern als auch in den mit *Pss* infizierten Blättern SA-G detektiert. Das SA-G wies dabei höhere Gehalte in den ozonbehandelten Blättern als in den mit *Pss* infizierten Blättern auf (Kap. 4.3 und 4.5.4), so dass in den ozonbehandelten Blättern vermutlich ein größerer Anteil der SA bereits in SA-G überführt worden war. Die deutlich stärker ausgeprägte Expression der basischen ß-1,3-Glucanase in den ozonbehandelten Blättern, im Vergleich zu den mit *Pss* infizierten Blättern (Kap. 4.5.3), könnte auf die stärkere Akkumulation der JA in den ozonbehandelten Proben aufgrund der vermutlich weiter fortgeschrittenen HR zurückgeführt werden.

In den mit PQ (100 µM) behandelten Proben wurde eine Expression der basischen ß-1,3-Glucanase in vergleichbarer Ausprägung wie in den ozonbehandelten Proben ermittelt (Kap. 4.5.3). Die SA und SA-G zeigten jedoch in den mit PQ (100 µM) behandelten Proben deutlich geringere Peakflächen als in den ozonbehandelten Proben. Eine mögliche Erklärung wäre ein Abbau der Substanzen in diesen Blättern. Die mit PQ (100 µM) behandelten Blätter 4 wiesen morphologische Schäden in einem vergleichbaren Ausmaß wie die ozonbehandelten

Blätter 5 auf (Kap. 3.6). In den ozonbehandelten Blättern 5 wurden jedoch sogar höhere Gehalte an SA-G detektiert als in den ozonbehandelten Blättern 4. Somit können die niedrigen Gehalte an SA-G in den mit PQ (100 µM) behandelten Blätter nicht auf einen Abbau von SA-G aufgrund der starken morphologischen Schäden zurückgeführt werden. In den mit PQ (100 µM) behandelten Proben lag somit zwar zum Erntezeitpunkt vermutlich eine HR in der Pflanze vor, die durch eine Induktion der Pathogenabwehr aufgrund des Überschreitens einer signalrelevanten Konzentration des oxidativen Stresses hervorgerufen wurde. Allerdings war die pathogeninduzierte HR in den Blättern vermutlich schwächer ausgeprägt, was an den niedrigen Gehalten der SA und SA-G erkennbar ist. Die stark ausgeprägte Expression der basischen ß-1,3-Glucanase könnte in diesem Fall mit den stark ausgeprägten morphologischen Veränderungen zusammenhängen, die durch eine Behandlung mit PQ (100 µM) hervorgerufen wurden (Kap. 4.5.2).

Das großflächige Absterben von Blattgewebe in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Überlagerung eines oxidativen Stresses, verursacht durch das PQ, und einer SA-abhängigen HR während der gesamten Belichtungsdauer vorlag. Der oxidative Stress erfolgte dabei durch die Bildung von ROS aus O_2 unter Anwesenheit des Bipyridyliumdikations bei Lichteinwirkung. Dieser oxidative Stress erreichte vermutlich ein solches Ausmaß, dass dadurch eine SA-abhängige HR induziert wurde. Die Bildung der ROS durch das PQ lag jedoch während der gesamten Belichtungszeit parallel zu der SA-abhängigen HR vor, so dass die ROS schnell die signalrelevante Konzentration überschritten und toxische Wirkung hatten. In den ozonbehandelten Pflanzen führte dagegen neben der ROS-Bildung in der SA-abhängigen HR (Schraudner et al. 1998) nur die fünfstündige Ozonexposition zu einem weiteren oxidativen Stress, der durch den Abbau des Ozons zu ROS im Apoplasten des Blattes hervorgerufen wird. In den mit *Pss* infizierten Blättern herrschte neben der durch die Pathogenabwehr induzierten Bildung der ROS kein weiterer oxidativer Stress (Lamb & Dixon 1997). Eine Bildung von $OH^{\cdot}$ aus H_2O_2, und damit die Einleitung einer Lipidperoxidation, ist bei allen Stressbehandlungen möglich. In den mit PQ (100 µM) behandelten Proben herrschte jedoch ein starker oxidativer Stress über einen längeren Zeitraum, so dass in diesen Blättern der unkontrollierte nekrotische Zelltod durch einen zu hohen ROS-Spiegel in den Zellen gegenüber dem durch die HR eingeleiteten PCD überwog. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit in den mit PQ (100 µM) behandelten Proben stark ausgeprägte

Expressionen der basischen ß-1,3-Glucanase und dagegen nur geringe Gehalte an SA und SA-G ermittelt (Kap. 4.5.3 und 4.5.5). Die starke Ausprägung der basischen ß-1,3-Glucanase wurde dabei vermutlich durch die verstärkte Akkumulation der JA hervorgerufen, die wiederum aufgrund der durch die Lipidperoxidation hervorgerufenen starken Verwundung des Blattes induziert wurde.

Die mit PQ (100 µM) behandelten Blätter zeigten auch deutlich kleinere Peakflächen für die anderen ozoninduzierten Metabolite im Vergleich zu den mit Ozon oder *Pss* behandelten Blättern (Kap. 4.3, 4.5.4 und 4.5.5). Die meisten der ozoninduzierten Metabolite wurden in der vorliegenden Arbeit vermutlich aufgrund der Pathogenabwehr in der Pflanze induziert. In den mit PQ (100 µM) behandelten Proben könnten die niedrigen Gehalte an den ozoninduzierten Metaboliten somit auf die weniger stark ausgeprägte HR zurückgeführt werden. Die durch PQ (100 µM) induzierte Pathogenabwehr führte daher nur zu einer schwachen Induktion von 17 der 25 ozoninduzierten Metabolite. Bei den Metaboliten, die keine Induktion aufwiesen, handelt es sich um Substanzen, die auch unter einem akuten Ozonstress weniger stark ausgeprägte Induktionen zeigten. Bei diesen Metaboliten könnte somit möglicherweise die Nachweisgrenze (NG) der Substanzen in den mit PQ (100 µM) behandelten Blattproben unterschritten worden sein. Des Weiteren wäre es möglich, dass aufgrund des überwiegenden unkontrollierten Zelltods durch eine Behandlung mit PQ (100 µM) eine gewisse Reduktion der Peakflächen auch durch einen Abbau mancher der ozoninduzierten Metabolite hervorgerufen wurde. Darauf wird in Kap. 5.5 näher eingegangen.

In einer Studie von Booker et al. (1998) wurde diskutiert, ob die induzierten phenolischen Metabolite in ozongestressten Pflanzen als Reaktion auf die Verwundung gebildet werden könnten. Dies erscheint anhand der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich, da die mit PQ (100 µM) behandelten Blätter die stärksten morphologischen Schäden zeigten, jedoch deutlich geringere Peakflächen an den ozoninduzierten Metaboliten im MRM-Modus aufwiesen als die ozonbehandelten Tabakblätter (Kap. 4.3 und Kap. 4.5.5).

Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse sind die ozoninduzierten Metabolite mehr der HR-induzierten Pathogenabwehr als dem direkten oxidativen Stress, der durch die aus dem Ozon entstandenen ROS hervorgerufen wird, zuzuordnen. Alle ozoninduzierten Metabolite wurden auch in den mit *Pss* infizierten Blättern als induzierte Metabolite ermittelt. Des

Weiteren konnten auch in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern, in denen neben einem hohen oxidativen Stress vermutlich auch eine schwächer ausgeprägte Pathogenabwehr vorlag, 17 der 25 ozoninduzierten Metabolite detektiert werden. In den mit PQ (10 µM) behandelten Blättern zeigte dagegen nur der ozoninduzierte Metabolit des Metabolitentyps 3 mit der quasimolekularen Masse m/z 477,2 eine signifikante Induktion, so dass dieser Metabolit vermutlich eine Reaktion auf einen oxidativen Stress darstellt. In diesen Pflanzen überwog der oxidative Stress und war dabei vermutlich nicht ausgeprägt genug, um eine Induktion der Pathogenabwehr hervorzurufen. Im folgenden Kapitel werden die möglichen Funktionen der strukturell aufgeklärten Metabolite diskutiert, um dadurch weitere Hinweise zu erhalten.

5.4 Die ozoninduzierten Metabolite haben unterschiedliche Funktionen

5.4.1 Metabolite des Metabolitentyps 1

SA ist der einzige ermittelte ozoninduzierte Metabolit, der ein transientes Verhalten im Zeitverlauf der ozonbehandelten Pflanzen zeigte, die 10 h bzw. 30 h nach Beginn der Ozonexposition geerntet wurden (Kap. 3.4 und 4.2.1.4). Vermutlich spielen somit unter Ozonstress keine weiteren phenolischen Substanzen eine Rolle als Signalmolekül. Bereits identifizierte, weitere wichtige Signalmoleküle während eines Ozonstresses und während eines Pathogenstresses sind JA und Ethylen (O'Donnell et al. 2001; Kangasjärvi et al. 2005), bei denen es sich jedoch nicht um phenolische Substanzen handelt. Von SA war bereits bekannt, dass sie sowohl unter Ozonstress (Pasqualini et al. 2002) als auch unter Pathogenstress (Alvarez 2000) in Pflanzen gebildet wird, wobei die SA dabei jeweils eine wichtige Rolle in der Einleitung eines kontrollierten Zelltods während der HR spielt (O'Donnell et al. 2001; Kangasjärvi et al. 2005).

5.4.2 Metabolite des Metabolitentyps 2

Die acht Metabolite des Metabolitentyps 2 wurden unter einem akuten Ozonpuls neu gebildet, wobei eine Akkumulation der Substanzen im zeitlichen Verlauf, 10 h und 30 h nach Behandlungsbeginn, beobachtet werden konnte (Kap. 4.3).

Bei den Metaboliten des Metabolitentyps 2 wurde SA-G strukturell aufgeklärt (Kap. 4.2.1.4). SA-G wurde bereits als ozoninduzierte Substanz in *N. tabacum* L. cv Bel W3 identifiziert

(Pasqualini et al. 2002). Das SA-G wird in Pflanzen sowohl unter Pathogen- als auch unter Ozonstress gebildet (Yalpani et al. 1994), wobei das SA-G aus der SA in den Zellen gebildet wird und somit als Speicherform für die SA fungieren kann (Hennig et al. 1993). Dieses Ergebnis stimmt mit dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten Verhalten von SA und SA-G im zeitlichen Verlauf nach einer akuten Ozonbehandlung überein. Dabei nahm der Gehalt an SA-G bei gleichzeitiger Abnahme des Gehalts an SA in den Blättern zu (Kap. 4.3). Das SA-G selbst hat keine Signalfunktion, jedoch kann es vermutlich durch Hydrolyse in der Pflanze wieder in das Pflanzenhormon SA überführt werden (Hennig et al. 1993). Das SA-G spielt somit, gemeinsam mit der SA, auch eine wichtige Rolle in der induzierten Pathogenabwehr der Pflanze. SA und SA-G waren unter allen Stressoren, die eine Pathogenabwehr induzieren, in den behandelten Blättern vorhanden (Kap. 4.3, 4.5.4 und 4.5.5). Dagegen war sowohl die SA als auch die SA-G in den mit PQ (10 µM) behandelten Proben, in denen vermutlich keine Pathogenabwehr induziert wurde, nicht nachweisbar (Kap. 4.5.5).

Die sieben weiteren ozoninduzierten Metabolite des Metabolitentyps 2, deren Strukturen im Laufe dieser Arbeit nicht bestimmt wurden, waren ebenfalls in den mit *Pss* infizierten Blättern nachweisbar (Kap. 4.5.4). Vier der Metabolite wiesen dabei kleinere Peakflächen auf als in den ozonbehandelten Proben. Da in den mit *Pss* infizierten Pflanzen die HR noch nicht so weit fortgeschritten war, könnte bei diesen Substanzen eine Akkumulation in einem vergleichbaren Ausmaß zu einem späteren Erntezeitpunkt erfolgen. In den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern wurden fünf der sieben Metabolite detektiert, wobei alle Metabolite kleinere Peakflächen als in den ozonbehandelten Proben aufwiesen. Die Metabolite, die nicht bestimmbar waren, zeigten auch in den ozonbehandelten Proben kleine Peakflächen. Da in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern vermutlich nur eine schwache SA-abhängige HR ausgebildet wurde, könnte aufgrund dessen eine insgesamt schwächere Bildung dieser vermutlich der Pathogenabwehr assoziierten Substanzen erfolgen, so dass diese in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern nicht bestimmbar waren. Des Weiteren könnte zusätzlich ein Abbau dieser Substanzen durch den unkontrollierten nekrotischen Zelltod, der in diesen Proben vermutlich gegenüber der SA-abhängigen HR überwog, vorliegen. Ein Abbau dieser Substanzen unter dem unkontrollierten nekrotischen Zelltod wird in Kap. 5.5 diskutiert. Unter einem oxidativen Stress, wie er durch eine Behandlung mit PQ (10 µM) entsteht, wurde in den Blättern keiner der Metabolite induziert. Dies deutet daraufhin, dass alle Metabolite des Metabolitentyps 2 wahrscheinlicher bei einem Ozonstress durch die induzierte HR gebildet

werden. Die ozoninduzierten Metabolite akkumulieren, bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs, im Vergleich zur SA, zu einem späten Zeitpunkt in den ozonbehandelten Blättern. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die Metabolite wahrscheinlicher eine Funktion in der Pathogenabwehr haben, da der reine oxidative Stress, der durch den Abbau des eindringenden Ozons im Apoplasten des Blattes zu ROS hervorgerufen wird, zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorliegt.

5.4.3 Metabolite des Metabolitentyps 3

Die Metabolite des Metabolitentyps 3 wurden auch unter einem akuten Ozonstress im zeitlichen Verlauf akkumuliert. Im Gegensatz zu den Metaboliten des Metabolitentyps 2 wurden diese Metabolite jedoch bereits in den Kontrollen in geringen Mengen detektiert (Kap. 4.3). Acht der 11 Metabolite wurden strukturell aufgeklärt (Kap. 4.2). Bei den strukturell aufgeklärten Metaboliten handelt es sich um die HCAs *E*-/*Z*-3-p-CoShiA, *E*-/*Z*-4-p-CoQA, *E*-/*Z*-5-p-CoQA und *E*-/*Z*-5-FQA.

Bei *E*-/*Z*-3-p-CoShiA, *E*-/*Z*-4-p-CoQA und *E*-/*Z*-5-p-CoQA handelt es sich um wichtige Intermediate der Phenylpropanoidbiosynthese (Franke et al. 2002a; Franke et al. 2002b; Hoffmann et al. 2003). Als solche könnten sie somit eine wichtige Rolle in der Ligninbiosynthese spielen, da in der Phenylpropanoidbiosynthese die Vorläufer des Lignins synthetisiert werden (Humphreys & Chapple 2002). Lignin ist ein komplex aufgebautes Polymer dessen Monomere eine phenolische Grundstruktur aufweisen. Das Lignin führt in krautigen Pflanzen zu einer strukturellen Stabilisierung und bietet außerdem eine Schutzfunktion vor eindringenden Pathogenen (Boerjan et al. 2003).

Eine Übersicht der Phenylpropanoidbiosynthese ist in Abb. 5.1 (Hoffmann et al. 2004) aufgeführt. Hierbei wird zunächst das Phenylalanin durch das Eingangsenzym der Phenylpropanoidbiosynthese, der Phenylalaninammoniumlyase (PAL), zur Zimtsäure desaminiert. Durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) wird die Zimtsäure zur p-Coumarsäure umgesetzt. Früher wurde angenommen, dass eine 3-Hydroxylierung der p-Coumarsäure durch die p-Coumarsäure-3-Hydroxylase (C3H) erfolgt und dadurch direkt die Kaffeesäure gebildet wird, aus der durch weitere enzymatische Umsetzungen die Zimtsäurederivate Ferulasäure, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure entstehen (Boudet 2000). Es wurde jedoch inzwischen gezeigt, dass die p-Coumarsäure sowie das

p-CoumaroylCoA von der C3H nicht umgesetzt werden. Stattdessen akzeptiert die C3H die in der vorliegenden Arbeit als ozoninduzierte Metabolite identifizierten China- und Shikimisäureester der p-Coumarsäure (Schoch et al. 2001).

Aus dem p-CoumaroylCoA sowie dem FeruloylCoA, das in der Phenylpropanoidbiosynthese über p-CoQA und p-CoShiA sowie CQA und Caffeoylshikimisäure (CShiA) aus dem CaffeoylCoA gebildet wird, entstehen über weitere Zwischenprodukte die Monomerbausteine des Lignins. Dabei leiten sich von dem p-CoumaroylCoA die p-Hydroxyphenyl- (H-) Einheiten und von FeruloylCoA die Guajacyl- (G-) und Syringyl- (S-) einheiten des Lignins ab (Abb. 5.1). Dabei wird das CoumaroylCoA bzw. das FeruloylCoA durch CinnamoylCoA-Reduktasen (CCR) in p-Coumarylaldehyd bzw. Coniferylaldehyd überführt. Durch Cinnamoylalkohol-Dehydrogenasen (CAD) werden anschließend durch Reduktion aus den jeweiligen Aldehyden, mit dem Coumaroylalkohol für die G-Einheiten und dem p-Coniferylalkohol für die H-Einheiten, die Monomerbeausteine der Ligninbiosynthese gebildet. Die Bildung der Monomerbausteine der S-Einheiten erfolgt durch die Ferulasäure-5-hydroxylase (F5H) sowie durch die Kaffeat-O-Methyltransferase (COMT I) und gegebenenfalls durch die CAD aus dem Coniferylaldehyd oder dem Coniferylalkohol, wobei letztendlich der Sinapylalkohol als Monomerbaustein gebildet wird. Eine Verknüpfung der Monomerbausteine in der Ligninbiosynthese zum Polymer Lignin erfolgt in einer oxidativen Polymerisation, die durch zellwandgebundene Peroxidasen unter Verbrauch von H_2O_2 katalysiert wird. Das gebildete Lignin der Angiosperme, denen auch *N. tabacum* L. cv Bel W3 angehört, besteht dabei hauptsächlich aus G- und S-Einheiten sowie Spuren an H-Einheiten (Boerjan et al. 2003).

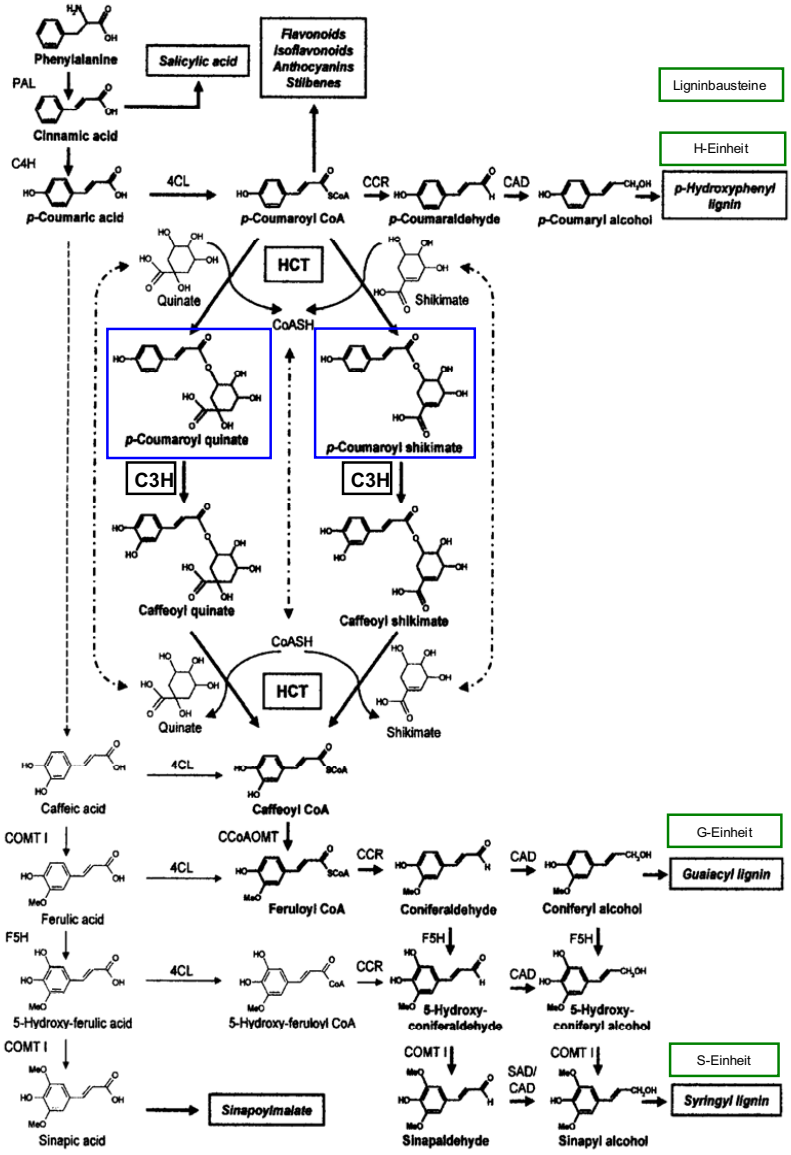


ABBILDUNG 5.1: Übersicht der Phenylpropanoidbiosynthese (Hoffmann et al. 2004).

Blauer Kasten: In der vorliegenden Arbeit als ozoninduzierte Substanzen ermittelt. Die Substanzen, die zu den monomeren Ligninbausteinen führen, sind fett gedruckt. 4-HydroxycinnamoylCoA-Ligase (4CL). p-Coumarsäure-3-hydroxylase (C3H). Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H). Cinnamoylalkohol-Dehydrogenase (CAD). CaffeoylCoA-O-Methyltransferase (CCoAOMT). CinnamoylCoA-Reduktase (CCR). Kaffeat-O-Methyltransferase (COMT I). Ferulasäure-5-hydroxylase (F5H). Hydroxycinnamoyl-Transferase (HCT). Phenylalaninammoniumlyase (PAL). Sinapylalkohol-Dehydrogenase (SAD).

Eine Induktion der Ligninbildung wird unter einem Pathogenstress häufig beschrieben (Boerjan et al. 2003). Eine inkompatible Interaktion einer avirulenten Unterart des Pathogens *Phytophthora infestans* mit Blättern der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) ruft beispielsweise eine Induktion der Transkripte von Enzymen der Phenylpropanoidbiosynthese, PAL und 4CL, hervor (Keller et al. 1996). Außerdem führt die Infektion von Blättern der Sojabohne (*Glycine max*) mit dem avirulenten Pathogen *Phytophthora sojae* zu einer erhöhten Ablagerung von Lignin in den Blättern (Mohr & Cahill 2001) und somit auch zu einer Induktion von unlöslichen Phenolen. Hierbei könnte sich eventuell das während der Pathogenabwehr gebildete Lignin in Zusammensetzung der G-, S- und H-Einheiten sowie in der Art der Verknüpfung von dem in der Pflanze üblicherweise gebildeten Lignin unterscheiden (Vance et al. 1980).

Auch ein akuter Ozonstress induziert die Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese PAL und 4CL auf der Ebene der Transkriptrate und der Enzymaktivität. Außerdem wird die CAD, ein Enzym der Ligninbiosynthese, auf der Ebene der Transkription in Blättern von Petersilie (*Petroselinum crispum*) unter einem akuten Ozonstress induziert (Eckey-Kaltenbach et al. 1994). Auch in Fichten (*Picea abies*) wurde gezeigt, dass die CAD unter einem akuten Ozonstress sowohl auf der Ebene der Transkriptrate (Galliano et al. 1993a) als auch auf der Ebene der Enzymaktivität (Galliano et al. 1993b) induziert wird. Eine verstärkte Aktivität der Ligninbiosynthese findet somit unter einem akuten Ozonstress statt, allerdings wurden die daraus gebildeten Lignine bisher noch nicht genauer charakterisiert (Sandermann et al. 1998).

Viele phenolische Substanzen zeigen unter UV-Licht eine intensiv blaue Autofluoreszenz, die dafür genutzt werden kann, Lignin und andere phenolische Substanzen in ozonbehandelten Blättern histologisch zu lokalisieren (Booker & Miller 1998). Ein akuter Ozonpuls führt in Tabak der Varietät L. cv Bel W3 (Schraudner et al. 1992) und in Petersilie (Eckey-Kaltenbach et al. 1994) zu einer intensiven blauen Autofluoreszenz in den nekrotischen Bereichen der Blätter. Des Weiteren konnte eine blaue Autofluoreszenz in den Zellwänden der Mesophyllzellen von ozonbehandelten Sojabohnenblättern (*Glycine max*) ermittelt werden, die auf einen erhöhten Gehalt an Lignin unter einem akuten Ozonstress hinweisen könnten (Booker et al. 1991). Solche blau autofluoreszierende Bereiche werden auch nach einer pathogeninduzierten HR gebildet (Sandermann 1996), die auf die während einer HR nachweislich erhöhten Lignin-Gehalte (Mohr & Cahill 2001) hinweisen.

Der Ozon- und Pathogenstress führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Induktion der p-CoQA-Isomere und p-CoShiA-Isomere (Kap. 4.3 und 4.5.1). Aus den p-CoQA-Iosmeren bzw. den p-CoShiA-Isomeren entstehen durch das Enzym C3H die CQA-Isomere sowie die CShiA-Isomere (Abb. 5.1). Bei den CQA-Isomeren führte der Ozon- und Pathogenstress jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der Gehalte (Kap. 4.3 und 4.5.1) und die CShiA wurde weder in den Kontrollen noch in den behandelten Proben nachgewiesen.

Die p-CoQA ist ein in Pflanzen häufig vorkommender Metabolit, wie z. B. in Tee (Clifford 1999). Allerdings wurde die p-CoQA noch nicht in Tabak nachgewiesen. Des Weiteren wurde noch von keiner Induktion dieser Substanz in Pflanzen nach einem Ozon- oder Pathogenstress berichtet.

Die aus der p-CoQA durch das Enzym C3H gebildete CQA ist eines der am weitesten verbreiteten Hydroxyzimtsäurederivate (Herrmann K. 1978; Kühnl et al. 1987). Sie wies auch in der vorliegenden Arbeit sehr hohe Gehalte in allen behandelten und in allen Kontrollpflanzen auf (Kap. 4.3 und 4.5.1).

Die p-CoShiA wurde bisher nur in einem Farn mittels NMR nachgewiesen (Saito et al. 1997). Eine Induktion unter einem Pathogen- oder Ozonstress wurde noch nicht beschrieben.

Auch die CShiA wurde bisher nur in Palmen und Farnen nachgewiesen (Harborne et al. 1974; Veit et al. 1992; Saito et al. 1997).

Es wird vermutet, dass die p-CoShiA und CShiA im Gegensatz zu p-CoQA und CQA üblicherweise einer hohen Umsetzungsrate unterliegen und deswegen bisher sehr selten in Pflanzen detektiert wurden (Schoch et al. 2001). Denn die Affinität der Hydroxycinnamoyl-Transferase (HCT) aus Tabak ist für die Shikimisäure als Akzeptor des p-CoumaroylCoAs 100-fach höher als für die Chinasäure (Hoffmann et al. 2003). Außerdem weist auch die C3H eine höhere Umsetzungsrate für p-CoShiA zur CShiA als für p-CoQA zur CQA auf (Schoch et al. 2001) und HCT zeigt für die CShiA eine höhere Umsetzungsrate als die CQA (Hoffmann et al. 2003). Vor kurzem wurde von Coleman et al. (2008) die p-CoShiA auch in einer Pappelmutante detektiert, die eine Reduktion in der Expression der C3H aufwies.

Die Akkumulation der p-CoShiA und der p-CoQA in den Blättern, in denen eine Pathogenabwehr in der vorliegenden Arbeit induziert wurde, könnte somit möglicherweise auf eine Reduktion der Expression der C3H zurückgeführt werden. Dass sich dagegen die Gehalte an CShiA und CQA nicht verändert haben, kann zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass zeitgleich zur Reduktion der Aktivität der C3H auch die Aktivität der HCT reduziert wurde, also das der C3H nachgeschaltete Enzym, das zur Bildung des CaffeoylCoAs aus CShiA und CQA führt. Durch die Reduktion der Aktivität der C3H und der nachgeschalteten HCT würden sowohl die Bildung als auch die weitere Umsetzung von CShiA und CQA gleichermaßen reduziert werden. Eine weitere Erklärung für die nicht signifikant veränderten Gehalte der CQA wäre, dass die hohen Gehalte an CQA in den Blättern durch einen leicht veränderten Zu- und Abfluss nicht beeinflusst werden. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit weder eine Reduktion noch eine Induktion der Gehalte an CQA festgestellt. Die CShiA war des Weiteren weder in den behandelten Proben noch in den Kontrollen nachweisbar. Die Pflanze hatte somit vermutlich im Rahmen der Pathogenabwehr mit einer Reduktion der C3H und eventuell der HCT, die zur Bildung des CaffeoylCoAs führt, reagiert.

Für die HCT wurde in Tabak eine zweite Isoform charakterisiert (Hoffmann et al. 2004), so dass diese beiden Isoformen möglicherweise unterschiedliche Substrate bevorzugen und eventuell auch unterschiedliche Umsetzungsgeschwindigkeiten für das p-CoumaroylCoA sowie die CShiA und CQA aufweisen. Bei vielen Enzymen zeigen ihre Isoformen unter bestimmten Umweltbedingungen unterschiedlich Expressionen (Boerjan et al. 2003).

Es könnte somit eventuell eine Reduktion der Expression der HCT erfolgen, die insbesondere die Überführung der CQA und CShiA in das CaffeoylCoA katalysiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten die Expressionen der beiden Isoformen der HCT sowie der C3H untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit führte sowohl in den mit Ozon behandelten Tabakblättern als auch in den mit *Pss* infizierten Tabakblättern der jeweilige Stressor zu den höchsten Induktionen der *E*-/*Z*-3-p-CoShiA im Vergleich zu den anderen induzierten Metaboliten. Die *E*-/*Z*-4-p-CoQA und *E*-/*Z*-5-p-CoQA zeigten dagegen unter beiden Stressoren nur eine schwache Induktion (Kap. 4.5.6). Die Induktionen dieser Metabolite spiegeln somit die höhere Affinität

der HCT für die Shikimisäure als Akzeptor des p-CoumaroylCoAs gegenüber der Chinasäure (Hoffmann et al. 2003) wider, denn aufgrund der möglichen Reduktion der Enzymaktivität der C3H könnte ein Anteil der gebildeten p-CoShiA nicht in die CShiA überführt werden. Die p-CoQA zeigte eine schwächere Induktion, da diese aufgrund der geringeren Affinität der HCT insgesamt in geringeren Mengen in der Pflanze gebildet wird als die p-CoShiA.

Die mit PQ (100 µM) behandelten Blätter wiesen zwar eine signifikante Induktion der Isomere des p-CoShiA auf, jedoch nicht der p-CoQA. Allerdings war die Induktion der p-CoShiA deutlich schwächer ausgeprägt als bei den ozonbehandelten und den mit *Pss* infizierten Blättern. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die p-CoQA-Isomere auch in den ozonbehandelten Pflanzen nur eine schwache Induktion im Vergleich zu den p-CoShiA-Isomeren zeigten. Die schwächere Induktion der p-CoShiA-Isomere sowie die fehlende Induktion der p-CoQA-Isomere könnte dadurch erklärt werden, dass in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern vermutlich eine deutlich schwächer induzierte HR vorlag als in den ozonbehandelten Blättern, wodurch letztendlich nur eine Induktion der p-CoShiA-Isomere hervorgerufen wurde. Des Weiteren könnte der unkontrollierte nekrotische Zelltod, der in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern wahrscheinlich vorherrschte zusätzlich zu einem Abbau dieser HCAs geführt haben, so dass folglich für die p-CoQA-Isomere keine signifikante Induktion mehr ermittelt werden konnte (Kap. 5.5).

Auffällig ist darüber hinaus, dass sowohl in den ozonbehandelten als auch in den mit *Pss* infizierten Blättern die *Z*-3-p-CoShiA höhere Induktionen als das entsprechende *E*-Isomer zeigte (Kap. 4.5.6). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass eine Umsetzung der p-CoShiA als *E*-Isomer, jedoch nicht als *Z*-Isomer durch die C3H erfolgt (Schoch et al. 2001). Mögliche Funktionen der Z-Isomere müssten noch untersucht werden.

Die oben dargestellten Ergebnisse weisen somit stark darauf hin, dass die Ligninbiosynthese in den ozonbehandelten Blättern über die Reduktion der C3H-Aktivität umgesteuert wird. Arbeiten von Franke et al. (2002a) und Coleman et al. (2008) konnten zeigen, dass die Reduktion der Expression der C3H im engen Zusammenhang mit der Zusammensetzung des gebildeten Lignins steht, denn Mutanten von *Arabidopsis* und Pappel (*Populus grandidentata*), die eine Reduktion der C3H auf Transkriptebene aufweisen, bilden Lignin mit hohen Anteilen an H-Einheiten aus. In der vorliegenden Arbeit könnte mit der Hypothese

der Reduktion der Aktivität der C3H somit auch ein Lignin mit einem höheren Gehalt an H-Einheiten gebildet werden. Diese mögliche Veränderung der Zusammensetzung des Lignins ist wahrscheinlicher mit der Induktion der Pathogenabwehr zu assoziieren, da eine Akkumulation der p-CoShiA- und der p-CoQA-Isomere sowohl durch eine Behandlung mit einem akuten Ozonstress als auch durch eine Infektion mit *Pss* hervorgerufen wurde, wohingegen in den mit PQ (10 µM) behandelten Blättern keine Induktion festgestellt wurde.

Für eine Assoziation mit der Pathogenabwehr sprechen auch Versuche mit Fichtenkulturen (*Picea abies*). Eine Behandlung dieser Zellkulturen mit einer autoklavierten Aufbereitung der Zellwände von *Rhizosphaera kalkhoffii* als Elicitor der HR führte zu einer schnellen Zunahme der Aktivität der PAL sowie der CAD auf der Enzymebene. Die Zunahme der Aktivität der Enzyme wurde durch die Bildung von Lignin in der Zellkultur begleitet (Messner & Boll 1993). Das durch diesen Elicitor induzierte Lignin weist ebenfalls einen hohen Anteil an H-Einheiten und C-C-Verknüpfungen auf (Lange et al. 1995).

Die bisher bekannten Reaktionen auf einen akuten Ozonstress in Kombination mit den in dieser Arbeit erzielten Daten deuten somit darauf hin, dass die Ligninbiosynthese in Richtung einer vermehrten Bildung von H-Einheiten induziert wird. So wurde unter anderem eine erhöhte Aktivität der CAD auf der Ebene der Transkriptrate und der Enzyme beschrieben. Bisher wurde jedoch noch nicht das daraus gebildete Lignin ermittelt und deren Zusammensetzung bestimmt (Sandermann et al. 1998). In Pappeln (*Populus tremula X alba*) führt jedoch eine chronische Ozonbehandlung mit einer Konzentration an Ozon von 60 bzw. 120 nl l^{-1} über einen Zeitraum von einem Monat zu einer Induktion der CAD auf Transkript- und Enzymebene. Die Induktion der CAD geht dabei mit einer Akkumulation eines Lignins einher, das einen hohen Anteil an H-Einheiten und C-C-Verknüpfungen aufweist. Das Lignin zeigt dabei einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie das durch den Elicitor induzierte Lignin in der Pathogenabwehr (Cabané et al. 2004). Von Cabané et al. (2004) wurde daher vermutet, dass die ozoninduzierte Lignifizierung im Bereich der Nekrosen im Zusammenhang mit dem PCD steht. Somit könnte diese Art des Lignins möglicherweise auch unter einem akuten Ozonstress gebildet werden und dabei aufgrund der Pathogenabwehr induziert worden sein.

Das unter einer Pathogenabwehr induzierte Lignin ist allerdings eventuell empfindlicher gegenüber einem Befall von pathogenen Pilzen, da durch den hohen Gehalt an H-Einheiten

die Resistenz der Zellwände gegenüber hydrolytischen Enzymen, wie sie durch pathogene Pilze gebildet werden, abnimmt (Franke et al. 2002a). Eine Induktion des Lignins könnte somit eventuell nicht unbedingt als Schutz, im Rahmen der HR, vor einer weiteren Ausbreitung des Pathogens fungieren. Vielmehr ist es denkbar, dass dieser Lignifizierungsprozess in solchen Zellen eine Rolle spielt, die nicht direkt an der HR beteiligt sind, sondern die das direkt benachbarte Gewebe bilden. Diese Zellen wären dann an der Begrenzung des sich ausbreitenden Zelltods durch die hohe antioxidative Kapazität der stärker lignifizierten Zellwände beteiligt, indem sie die einleitenden ROS-Signale abfangen (Pell et al. 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit auch dem Metabolitentyp 3 zugeordneten *E*-/*Z*-5-FQA waren unter allen Behandlungen, die zu einer pathogeninduzierten HR führten, signifikant induziert. Bei allen drei Behandlungen lagen mittlere Induktionen im Vergleich zu den anderen induzierten Metaboliten desselben Stressors vor. Dagegen zeigten die Blätter behandelt mit PQ (10 µM) keine signifikante Induktion der FQA-Isomere (Kap. 4.5.6). Die *E*-/*Z*-5-FQA sind somit wahrscheinlicher einer pathogeninduzierten HR als einem direkten oxidativen Stress zuzuordnen.

Die FQA ist in Pflanzen häufiger vertreten, wie beispielsweise in Kaffeebohnen und Kohl (Clifford 1999). In Tabak wurde die FQA bisher jedoch nur in der Sprossachse von Mutanten nachgewiesen, die eine Reduktion in einem Enzym der Ligninbiosynthese, der CCR, aufwiesen (Dauwe et al. 2007). Ein Nachweis der Induktion dieser Metabolite in Reaktion auf einen Ozon- oder Pathogenstress konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal erbracht werden.

Die Synthese der FQA ist Teil der Phenylpropanoidbiosynthese. Dabei entsteht zunächst aus dem CaffeoylCoA durch die CCoAOMT das FeruloylCoA (Koshiro et al. 2007). Durch eine HCT könnte das FeruloylCoA in Anwesenheit von Chinasäure in die FQA überführt werden. Die in der Studie von Hoffmann et al. (2003) isolierte HCT katalysiert zwar die Bildung der Feruloylshikimisäure aus dem FeruloylCoA, jedoch nicht die Bildung der FQA. Kürzlich wurde in Tabak aber eine weitere Isoform der HCT identifiziert (Hoffmann et al. 2004), die stattdessen eventuell die Bildung der FQA katalysiert. Wie oben bereits erwähnt, könnte diese zweite Isoform auch für die Bildung der p-CoQA und p-CoShiA während einer induzierten

HR verantwortlich sein, so dass eine gleichzeitige Akkumulation dieser Metabolite und des FQAs wahrscheinlich ist.

Die Metabolite des Metabolitentyps 3 mit den quasimolekularen Massen m/z 447,2 sowie m/z 805,6 mit einer RT von 25,0 min können ebenfalls wahrscheinlicher einer Pathogenabwehr zugeordnet werden, da sie in den mit PQ (10 µM) behandelten Blättern nicht induziert wurden und sie dagegen in den ozonbehandelten und in den mit *Pss* infizierten Blättern gegenüber den entsprechenden Kontrollen verstärkt gebildet wurden. Der Metabolit mit der quasimolekularen Masse m/z 447,2 wurde auch in den mit PQ (100 µM) behandelten Proben induziert, wohingegen der Metabolit mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 und einer RT von 25,0 min keine signifikante Änderung zeigte. Das Verhalten des Metaboliten mit der m/z 805,6 und einer RT von 25,0 min unter einer Behandlung mit PQ (100 µM) wird in Kap. 5.5 diskutiert. Beide Metabolite zeigten dabei für alle Stressoren schwächere Induktionen im Vergleich zu den jeweiligen Induktionen der anderen Metabolite unter demselben Stressor (Kap. 4.5.6).

Die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 477,2 ist der einzige ozoninduzierte Metabolit, der durch eine Behandlung der Blätter mit PQ (10 µM) signifikant, wenn auch sehr schwach, induziert wurde (Kap. 4.5.5). Der Metabolit wurde daher vermutlich aufgrund des oxidativen Stresses in der Pflanze induziert. Diese These wird durch die unterschiedlich stark ausgeprägten Induktionen des Metaboliten unter den anderen Stressoren unterstützt. In den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern überwog ein oxidativer Stress vermutlich die schwächer ausgeprägte pathogeninduzierte HR. Folglich wurden in diesen Blattproben die höchsten Induktionen für den Metaboliten mit der quasimolekularen Masse m/z 477,2, im Vergleich zu den Induktionen der anderen unter demselben Stressor verstärkt gebildeten Metabolite, ermittelt. In den ozonbehandelten Blättern führte vermutlich der durch das Ozon direkt hervorgerufene oxidative Stress sowie der durch die in der pathogeninduzierten HR gebildeten ROS zu einer hohen Induktion dieses Metaboliten im Vergleich zu den anderen ozoninduzierten Metaboliten (Kap. 4.6). Dagegen konnten in den mit *Pss* infizierten Pflanzen ausschließlich die während der HR gebildeten ROS zu einem oxidativen Stress führen. Der Metabolit m/z 477,2 wies zu dieser Hypothese passend eine mittlere bis schwache Induktion in den mit *Pss* infizierten Pflanzen gegenüber den unter demselben Stressor induzierten Metaboliten auf. Da dieser Metabolit offensichtlich der einzige ermittelte ozoninduzierte

Metabolit ist, der auch unter einem schwachen oxidativen Stress gebildet wird, wäre eine Strukturaufklärung dieses Metaboliten besonders interessant. Sowohl die erhaltenen Fragmentspektren durch LC-MS/MS-Messungen als auch die Bestimmung der akkuraten Masse mit FTICR-MS ergaben keine Hinweise auf eine mögliche Struktur. Es müssten daher Fragmentierungsreaktionen mit dem FTICR-MS durchgeführt werden, um weitere Hinweise auf eine mögliche Struktur zu erhalten. Des Weiteren könnte eine Isolierung dieser Substanz durchgeführt werden, um mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Strukturaufklärung durchzuführen.

5.4.4 Metabolite des Metabolitentyps 4

Bei den fünf Metaboliten des Metabolitentyps 4 handelt es sich um Substanzen, die in den nach 10 h geernteten, ozonbehandelten Blättern eine Induktion gegenüber den Kontrollen zeigten. In den 30 h nach Behandlungsbeginn geernteten Pflanzen wurde jedoch für alle Metabolite keine weitere Induktion festgestellt. Möglicherweise wurde bereits 10 h nach Behandlungsbeginn ein Plateau für alle ozoninduzierten Metabolite des Metabolitentyps 4 erreicht.

In den mit *Pss* und mit PQ (100 µM) behandelten Proben wurde 30 h nach Behandlungsbeginn für alle Metabolite, bis auf die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 mit einer RT von 24,0 min in den mit PQ (100 µM) behandelten Proben, jeweils eine Induktion der Substanzen gegenüber den entsprechenden Kontrollen festgestellt. Für die mit *Pss* infizierten Pflanzen wurde auch eine Induktion aller Metabolite festgestellt. Dagegen wies in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern der Metabolit mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 und einer RT von 24,0 min als einziger der Metabolite des Metabolitentyps 4 keine Induktion gegenüber den entsprechenden Kontrollen auf. Das Verhalten dieses Metaboliten unter einer Behandlung mit PQ (100 µM) wird in Kap. 5.5 diskutiert. In den mit PQ (10 µM) behandelten Proben wurde für keinen der Metabolite des Metabolitentyps 4 eine signifikante Veränderung ermittelt (Kap. 4.5.5). Die Metaboliten des Metabolitentyps 4 sind daher wahrscheinlicher einer Pathogenabwehr der Tabakpflanzen zuzuordnen.

Vier der Metabolite des Metabolitentyps 4 wurden als Isomere des Feruloyltyramins (FT) identifiziert (Kap. 4.2.1.5). Das *E*-FT-Isomer mit einer RT von 22,3 sowie das *Z*-Isomer mit

einer RT von 24,0 min zeigten dabei mittlere bis hohe Induktionen, wohingegen das *E*-FT-Isomer mit einer RT von 17,7 min nur eine schwache Induktion aufwies im Vergleich zu den anderen Metaboliten, die unter demselben Stressor induziert wurden. Das *Z*-FT-Isomer mit einer RT von 18,8 min wurde in den Blättern, in denen durch die unterschiedlichen Stressoren eine pathogeninduzierte HR hervorgerufen wurde, neu gebildet.

Das FT ist ein Amid, das in Pflanzen durch die Tyramin-HydroxycinnamoylCoA-Transferase (THT) aus FerulyolCoA und Tyramin gebildet wird (Guillet & De Luca 2005). In Tabak der Varietät L. cv Samsun wurde das FT als lösliches Phenol in geringen Mengen nachgewiesen (Dauwe et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden drei der vier FT-Isomere bereits in geringen Mengen in den Kontrollpflanzen ermittelt (Kap. 4.3, 4.5.4 und 4.5.5). Eine Induktion der THT erfolgt, insbesondere in Solanaceaen, unter Pathogenbefall (Negrel et al. 1993; Keller et al. 1996; Guillet & De Luca 2005). In Tabak führt beispielsweise eine inkompatible Interaktion mit einer avirulenten Unterart des Tabakmosaikvirus, neben der HR, zu einer Induktion der THT. Das Produkt der THT, das lösliche FT, wurde dabei nicht detektiert, jedoch wurde durch Versuche mit radioaktiv markiertem Tyramin nachgewiesen, dass das gebildete FT während der HR sehr schnell in die Zellwand eingebaut wird (Negrel & Jeandet 1987). In einer Studie von Newman et al. (2001) wurde gezeigt, dass eine inkompatible Interaktion von Pfeffer (*Capsicum annuum*) mit dem avirulenten Pathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* zu einer Induktion der Enzymaktivität der THT und zu einer Akkumulation des FTs in löslicher Form führt, wohingegen eine kompatible Interaktion zu keiner Induktion führt. Somit ist vermutlich eine Induktion der HR erforderlich, um eine Induktion der THT und des FTs hervorzurufen. Für das FT werden zwei mögliche Funktionen in der Pathogenabwehr vorgeschlagen. Auf der einen Seite wird das FT durch Vernetzung mit Lignin schnell in die Zellwände eingebaut und könnte dadurch die Anfälligkeit der Zellwände gegen den Abbau durch Mikroorganismen verringern und dadurch die Zellwand als chemische Barriere gegen Pathogene stärken. Auf der anderen Seite könnte das FT direkt als antimikrobiell wirksame Substanz im Apoplasten der Blätter fungieren (Schmidt et al. 1998). In einer Studie von Grandmaison et al. (1993) wurde gezeigt, dass FT das Gesamtwachstum von Mykorrhizapilzen hemmt. Des Weiteren hat das FT eine antimikrobielle Wirkung gegenüber dem Bakterium *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Newman et al. 2001).

In einer Studie von Schraudner et al. (1993 und 1994) führt ein akuter Ozonstress in der Tabakvarietät zu einer erhöhten Enzymaktivität der THT und durch Versuche mit radioaktiv markiertem Tyramin wurde gezeigt, dass ein Einbau des FTs in die Zellwände erfolgt. Das FT wurde in dieser Arbeit jedoch nicht in löslicher Form in den ozonbehandelten Blättern nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen erstmals unter einem akuten Ozonstress eine Induktion des löslichen FTs ermittelt (Kap. 3.4). Das ermittelte lösliche FT wird dabei vermutlich überwiegend in die Zellwand eingebaut. Zusätzlich könnte es jedoch in löslicher Form als antimikrobielle Substanz im Apoplasten fungieren. Die unterschiedlich stark ausgeprägten Induktionen der FT-Isomere in den Proben, in denen eine pathogeninduzierte HR ausgelöst wurde (Kap. 4.5.6), könnten darauf hindeuten, dass möglicherweise die FT-Isomere mit schwacher Induktion verstärkt in die Zellwände eingebaut werden, wohingegen die Substanzen mit hoher Induktion möglicherweise als antimikrobielle Substanzen akkumuliert werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Z-Isomere des FTs nicht in die Zellwand eingebaut werden können und aufgrund dessen akkumulieren.

5.5 Metabolite des Metabolitentyps 5

Neben den ozoninduzierten Metaboliten wurden die phenolischen Substanzen 3,4-, 3,5- und 4,5-diCQA sowie *E*-/*Z*-3-, 4- und 5-CQAs als Metabolite des Metabolitentyps 5 charakterisiert. Diese zeigten in der Untersuchung nach einem akuten Ozonstress sowohl 10 h als auch 30 h nach Behandlungsbeginn keine signifikante Veränderung der Peakflächen gegenüber den entsprechenden Kontrollen (Kap. 4.1). Es wurden die Peakflächen der CQA-Isomere sowie der 3,5-diCQA, die von den diCQAs die größte Peakfläche aufwies, unter den unterschiedlichen Stressoren untersucht (Kap. 4.3, 4.5.4 und 4.5.5).

Die CQAs und diCQAs sind weit verbreitete HCAs in der Pflanzenwelt (Herrmann 1978; Kühnl et al. 1987). Trotz dieses häufigen Vorkommens in größeren Mengen in Pflanzen und vieler Jahre Forschung auf diesem Gebiet, herrscht bezüglich ihrer Funktion keine Einigkeit (Grace & Logan 2000). Eine mögliche Funktion liegt aufgrund ihrer nachgewiesenen hohen antioxidativen Kapazität (Meyer et al. 1998; Iwai et al. 2004) in der antioxidativen Abwehr der Pflanze (Grace & Logan 2000). Die CQAs und diCQAs könnten somit unter einem Ozonstress, Pathogenstress und PQ-Stress eine wichtige Funktion ausüben, da bei allen

Stressreaktionen ROS gebildet werden. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur in den ozonbehandelten Pflanzen sondern auch in den mit *Pss* infizierten Blättern jeweils keine signifikante Veränderung der Peakflächen gegenüber den Kontrollen vorlag (Kap. 4.3 und 4.5.4). Auch der durch eine Behandlung mit PQ (10 µM) hervorgerufene oxidative Stress führte zu keiner Veränderung der Gehalte an diesen Metaboliten (Kap. 4.5.5). Das Verhalten der CQAs und diCQAs in der vorliegenden Arbeit deutet daher wahrscheinlicher darauf hin, dass diese Metabolite nicht an einer antioxidativen Abwehr der Pflanze beteiligt sind, die mit einem Abbau dieser Substanzen einhergehen würde. Entsprechend wurden bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit dem Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) Assay der ozonbehandelten, nach 30 h geernteten Proben sowie der entsprechenden Kontrollen in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Gesamtextrakte als auch für die HPLC-Fraktionen vergleichbare TOSC-Werte ermittelt (Kap. 4.4). Die *E*-5-CQA wies in der vorliegenden Arbeit mit 284,6 ± 17,7 mg kg^{-1} Frischgewicht in den ozonbehandelten und mit 288,7 ± 9,4 mg kg^{-1} in den Kontrollblättern einen hohen Gehalt auf (Kap. 3.3.4). Die mit dem Standardadditionsverfahren ermittelten absoluten Gehalte an *E*-5-CQA wiesen, übereinstimmend mit der relativen Quantifizierung (Kap. 4.3), keine signifikanten Unterschiede auf. Der hohe CQA-Spiegel führte vermutlich dazu, dass die Induktion der strukturell verwandten Metabolite unter einem akuten Ozonstress zu keiner signifikanten Veränderung der TOSC-Werte der ozonbehandelten Proben gegenüber den Kontrollen führte. Da die CQA-Isomere im gleichen Zeitfenster wie die ozoninduzierten Metabolite eluieren, würde dies erklären, dass die HPLC-Fraktionen, bei denen es sich jeweils um die HPLC-Eluate des Zeitfensters handelt, in denen die ozoninduzierten Metabolite detektiert werden, vergleichbare TOSC-Werte wie die Gesamtextrakte aufwiesen. Dies spricht gegen die Rolle der CQAs in der antioxidativen Verteidigung.

Ebenfalls gegen eine direkte Rolle in der antioxidativen Verteidigung spricht die Lokalisation der CQAs und diCQAs. Die meisten der löslichen HCAs sind üblicherweise in den Vakuolen der Schließzellen, der Epidermiszellen und der subepidermalen Zellen lokalisiert (Dixon & Paiva 1995; Waldhauser Mösli & Baumann 1996; Hutzler et al. 1998). Aufgrund der Lokalisierung in den Vakuolen sind die HCAs, und damit auch die CQAs und diCQAs, wahrscheinlich nicht primär an einem Abfangen der ROS beteiligt, da die ROS in einem anderen Kompartiment der Zelle vorliegen als die HCAs. Die unter einem akuten Ozonstress aus dem Ozon gebildeten ROS akkumulieren überwiegend im Apoplasten (Conklin & Barth

2004; Apel & Hirt 2004; Kangasjärvi et al. 2005), in dem auch das Antioxidans Ascorbat lokalisiert ist. Ascorbat spielt, insbesondere auch unter einem akuten Ozonstress, in der Abwehr von ROS eine wichtige Rolle (Conklin & Barth 2004; Kangasjärvi et al. 2005; Jaspers et al. 2005). Dies wird unter anderem durch eine Studie von Conklin et al. (2008) unterstützt, in der eine Mutante von *Arabidopsis* mit einer unzureichenden Ascorbat-Biosynthese, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ozonstress zeigt. Außerdem führt ein Besprühen von Tabakblättern mit einer Ascorbat-Lösung zu schwächeren Symptomen an den Blättern nach Ozonexpositionsexperimenten (Menser 1964). Im Gegensatz zu den CQA-Isomeren zeigt das Ascorbat bei Studien mit *Arabidopsis* (Mahalingam et al. 2006) sowie *N. tabacum* L. cv Bel W3 (Pasqualini et al. 2002) 12 h bzw. 8 h nach Beginn einer akuten Ozonexposition eine höhere Konzentration in den behandelten Pflanzen gegenüber den Kontrollen. 24 h bzw. 27 h nach Beginn der Ozonbehandlung haben sich die Ascorbatgehalte durch die im Cytosol enthaltenen Enzyme wieder erholt, so dass zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Pflanzen und den Kontrollen vorliegen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt 30 h nach Beginn der Ozonexposition auch in Tabakblättern der vorliegenden Arbeit das Ascorbat wieder vergleichbare Konzentrationen wie die Kontrollen aufwies und einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität eines Pflanzenrohextrakts hat. Das Ascorbat könnte somit in der vorliegenden Arbeit vermutlich auch zu den vergleichbaren TOSC-Werten zwischen den behandelte Proben und den Kontrollen bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität beigetragen haben (Kap. 4.4).

Wie oben bereits erwähnt, findet die primäre ROS-Akkumulation in Reaktion auf Ozon wahrscheinlicher im Apoplasten statt. Neben dem Ascorbat sind vermutlich auch die im Apoplasten lokalisierten (Mittler 2002), antioxidativ wirksamen Enzyme Superoxiddismutase und Ascorbatperoxidase am Abfangen dieser ROS beteiligt. Von den gebildeten ROS ist das H_2O_2, im Gegensatz zu den anderen ROS, jedoch in der Lage durch Membranen zu diffundieren (Apel & Hirt 2004) und dadurch in das Cytosol zu gelangen. Im Cytosol können die ROS von den dort lokalisierten, antioxidativ wirksamen Enzymen, wie der Superoxiddismutase, der Ascorbatperoxidase sowie der Catalase und anderen Antioxidantien, wie dem auch dort lokalisierten Ascorbat abgefangen werden (Lamb & Dixon 1997). Ein Eindringen der ROS bis in die Vakuolen, in denen die HCAs überwiegend lokalisiert sind,

würde daher eher seltener auftreten und macht die Rolle der HCAs in einer direkten antioxidativen Verteidigung unwahrscheinlich.

Eine andere Situation liegt jedoch vor, wenn die aus dem Ozon gebildeten ROS zu einem sehr ausgeprägten oxidativen Stress führen, der die Kapazität der Antioxidantien im Apoplasten deutlich überschreitet. In diesem Fall würden insbesondere die hochreaktiven $OH^{\cdot}$ durch Lipidperoxidation zu einer Schädigung der Membranlipide sowie zur Schädigung von Nukleinsäuren, Proteinen und Chlorophyll führen. Dies könnte mit einer Dekompartimentierung innerhalb der Zelle einhergehen. Die in den Vakuolen lokalisierten HCAs würden dann mit den ROS interagieren und dadurch im zeitlichen Verlauf abgebaut werden. Unter solchen Bedingungen würde somit überwiegend die direkte toxische Wirkung des Ozons zu einem unkontrollierten nekrotischen Zelltod führen. Die Ausbildung einer pathogeninduzierten HR wäre dagegen deutlich schwächer ausgeprägt. Solche Bedingungen lagen in der vorliegenden Arbeit vermutlich in den ozonbehandelten Blättern 5 vor. In diesen Blättern wurde, im Gegensatz zu den Blättern 4, eine signifikante Abnahme der Peakfläche der 5-CQA im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Außerdem wiesen die Blätter 5 einen hohen Anteil (70-90 % der Blattfläche) an abgestorbenem Pflanzengewebe auf (Kap. 3.6), so dass in diesen Blättern vermutlich überwiegend die direkte toxische Wirkung des Ozons, und weniger die Auswirkungen der pathogeninduzierten HR, zu einem Zelltod führte. In einer anderen Arbeit wurde auch eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration an CQA nach einer akuten Ozonbehandlung von Tabakblättern der Varietät L. cv Bel W3 beschrieben. Der akute Ozonpuls führte in diesen Blättern, im Vergleich zu den Kontrollen, zu einer etwa 3-fachen Verringerung der CQA-Gehalte nach 10 h und zu einer etwa 5-fachen Verringerung der Gehalte nach 24 h (Pasqualini et al. 2003). Die starke Abnahme der Gehalte an CQA könnte bei dieser Untersuchung somit möglicherweise auf die Verwendung von Blattproben mit einem vergleichbar hohen Nekrotisierungsgrad, wie er in der vorliegenden Arbeit bei den ozonbehandelten Blättern 5 vorlag, zurückgeführt werden.

Die Behandlung der Blätter 4 mit einem akuten Ozonpuls führte demgegenüber in der vorliegenden Arbeit vermutlich überwiegend zu einer pathogeninduzierten HR, so dass der programmierte Zelltod (PCD) gegenüber dem nekrotischen unkontrollierten Zelltod überwog. Für die in dieser Arbeit strukturell erstmals aufgeklärten, ozoninduzierten Metabolite wurden dementsprechend bereits andere mögliche Funktionen, unter anderem in der

Ligninbiosynthese sowie in der Verstärkung der Zellwände oder als antimikrobiell wirksame Substanz diskutiert (siehe oben). Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften könnten allerdings auch diese Substanzen als Radikalfänger fungieren, da beispielsweise die strukturell verwandten Substanzen p-Coumarsäure und Ferulasäure hohe antioxidative Kapazitäten aufweisen (Meyer et al. 1998). Die FQA zeigt außerdem die höchste antioxidative Kapazität gegenüber $O_2^{\cdot-}$ im Vergleich zu den Isomeren der CQAs und diCQAs (Iwai et al. 2004). Manche der HCAs können auch kovalent an die Zellwände der Pflanzen gebunden sein (Strack et al. 1988), wie es auch für das induzierte FT beschrieben wurde (Schraudner et al. 1993; Schraudner et al. 1994). Da alle diese Substanzen nicht abgebaut, sondern stattdessen akkumulierten oder konstant blieben, fungierten diese HCAs wahrscheinlich nicht als Radikalfänger der ROS.

Diese Vermutung wird auch durch die Daten gestützt, die durch eine Behandlung mit PQ und einer Infektion mit *Pss* erzielt wurden. Die Behandlung der Blätter mit PQ (100 µM) führte in der vorliegenden Arbeit überwiegend zu einem unkontrollierten nekrotischen Zelltod und nur in einem geringen Ausmaß zu einem PCD durch die pathogeninduzierte HR. Dies war begleitet von einer signifikanten Abnahme der Gehalte an 3,5-diCQA sowie von zwei der CQA-Isomere. Die Peakflächen der anderen CQA-Isomere zeigten eine Tendenz zu einem Abbau an, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Kap. 4.5.5). Des Weiteren wies auch die Substanz mit der quasimolekularen Masse m/z 805,6 und einer RT von 24,0 min eine signifikante Abnahme der Peakfläche auf. Der aufgrund eines vergleichbaren Fragmentmusters vermutlich strukturell verwandte Metabolit mit der quasimolekularen Masse von m/z 805,6 und einer RT von 25,0 min zeigte demgegenüber keine signifikante Veränderung (Kap. 4.5.5). Möglicherweise war bei diesem Metabolit ein Abbau dennoch vorhanden, jedoch schwächer ausgeprägt. Bei allen induzierten Metaboliten der Behandlung mit PQ (100 µM) lag nur eine schwache Induktion im Vergleich zu den Induktionen der ozonbehandelten Proben vor. Dies kann vermutlich auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen lag in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern ein ausgeprägter unkontrollierter nekrotischer Zelltod vor, der wahrscheinlicher zu einem Abbau der Substanzen führte. Zum anderen lag in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern vermutlich nur eine schwach ausgeprägte SA-abhängige HR vor, die somit vermutlich nur zu einer schwachen Induktion der Metabolite führen konnte. Der Abbau der CQA war in den mit PQ (100 µM) behandelten Blättern jedoch nicht stark ausgeprägt, so dass vermutlich die schwache Ausprägung der SA-

abhängigen HR stärkeren Einfluss auf die niedrigen Induktionen der mit PQ (100 µM) behandelten Blätter hatte als die Auswirkungen des unkontrollierten nekrotischen Zelltods.

In den mit PQ (10 µM) behandelten Blättern wiesen die Peakflächen der CQAs und der 3,5-diCQA keine signifikanten Unterschiede gegenüber den entsprechenden Kontrollen auf (Kap. 4.5.5). In diesen Blättern führte ein schwach ausgeprägter oxidativer Stress nur zu geringen morphologischen Veränderungen, so dass wahrscheinlich keine Zerstörung der Membranen der Vakuolen hervorgerufen wurde und aufgrund dessen die HCAs keine Veränderungen aufwiesen. Dies kann als weiterer Beleg dafür gewertet werden, dass die HCAs keine Rolle in der direkten Verteidigung gegen oxidativen Stress spielen.

Die Infektion der Blätter mit *Pss* führte zu keiner signifikanten Veränderung der Gehalte an den CQA-Isomeren sowie der 3,5-diCQA (Kap. 4.5.4). Dies deckt sich mit Ergebnissen in anderen Studien. So zeigten Tabakpflanzen sowohl nach einer Infiltration mit Tabakmosaikvirus (TMV) (Shadle et al. 2003) als auch nach einer Infektion mit dem virulenten Bakterium *Cercospora nicotianae* (Maher et al. 1994) keine signifikante Veränderung der CQA-Gehalte gegenüber Kontrollen. Die Infektion mit TMV führte jedoch zu einer Induktion der SA (Shadle et al. 2003) wie es auch in der vorliegenden Arbeit in den mit *Pss* infizierten Blättern ermittelt wurde. Es führte somit weder eine inkompatible noch eine kompatible Interaktion zu einer signifikanten Ab- oder Zunahme der Gehalte an CQA.

Zusammenfassend haben die CQA-Isomere sowie die diCQAs in der vorliegenden Arbeit somit vermutlich keine primäre Funktion im Abfangen von ROS in den ozonbehandelten und mit *Pss* infizierten Blättern 4. Der CQA-Spiegel in der Pflanze war jedoch unter diesen Stressoren, trotz der vermutlichen Reduktion der Aktivität der C3H, die die Akkumulation der p-CoQA- und p-CoShiA-Isomere in den ozonbehandelten Blättern erklären könnte, konstant. Dies lässt sich möglicherweise durch ein starkes Konzentrationsungleichgewicht zwischen diesen Substanzen erklären. Während sich eine Reduktion der C3H-Aktivität auf die vermutlich deutlich geringere Konzentration der p-CoQA und der p-CoShiA in den Blättern auswirkt, wirkt sich diese auf die hohen CQA-Konzentrationen kaum aus. Warum Tabak so hohe Konzentrationen an CQA aufweist, die unter den beschriebenen Stressoren kaum Änderungen zeigen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Insbesondere wäre es dabei sinnvoll mit Tabakmutanten zu arbeiten, um Hinweise zu erhalten, wie die Pflanzen auf

einen Ozon- oder Pathogenstress reagieren, wenn die Aktivität bestimmter Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese, wie beispielsweise der C3H oder der HCT, beeinträchtigt ist. Markierungsexperimente mit $^{13}CO_2$ könnten Hinweise darauf geben, ob eine Umsetzung der CQA nach einem akuten Ozonstress oder einer Infektion mit *Pss* erfolgt. Durch das Ernten der Tabakpflanzen zu zusätzlichen anderen Zeitpunkten als 10 h und 30 h nach Beginn der Ozonbehandlung könnte abgesichert werden, dass auch zu anderen Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen in den Gehalten der CQAs gegenüber den Kontrollen vorliegen.

6 Literaturverzeichnis

Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I. & Solano, R. **2007**: Modulation of plant defenses by ethylene. Journal of Plant Growth Regulation 26, 160-177.

Allan, A. C. & Fluhr, R. **1997**: Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. Plant Cell 9, 1559-1572

Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J. A., Roca, M. J. & Rabe, V. **2006**: Liquid chromatograpic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A 1120, 221-229.

Alvarez, M. E. **2000**: Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. Plant Molecular Biology 44, 429-442.

Ananieva, E. A., Alexieva, V. S. & Popova, L. P. **2002**: Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. Journal of Plant Physiology 159, 685-693.

Ananieva, E. A., Christov, K. N. & Popova, L. P. **2004**: Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to Paraquat. Journal of Plant Physiology 161, 319-328.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Ryan, D. **2000**: Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst 125, 989-1009.

Apel, K. & Hirt, H. **2004**: Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373-399.

Ashmore, M. R. **2005**: Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. Plant Cell and Environment 28, 949-964.

Atkinson, M. M., Keppler, L. D., Orlandi, E. W., Baker, C. J. & Mischke, C. F. 1990: Involvement of plasma-membrane calcium influx in bacterial induction of the K+/H+ and hypersensitive responses in tobacco. Plant Physiology 92, 215-221.

Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D. & Robards, K. **2005**: Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer* (maple), *Betula* (birch), *Coniferus*, *Eucalyptus*, *Juniperus* (cedar), *Picea* (spruce) and *Quercus* (oak). Analyst 130, 809-823.

Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. **2003**: Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54, 519-546.

Bol, J. F., Linthorst, H. J. M. & Cornelissen, B. J. C. **1990**: Plant pathogenesis-related proteins induced by virus-infection. Annual Review of Phytopathology 28, 113-138.

Booker, F. L., Fiscus, E. & Miller, J. **1991**: Ozone-induced changes in soybean cell wall physiology. In: Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism (Pell, E. J. & Steffen, K., eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 229-232.

Booker, F. L. & Miller, J. E. **1998**: Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. Journal of Experimental Botany 49, 1191-1202.

Böttcher, C., Roepenack-Lahaye, E., Willscher, E., Scheel, D. & Clemens, S. **2007**: Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Analytical Chemistry 79, 1507-1513.

Boudet, A. M. **2000**: Lignins and lignification: Selected issues. Plant Physiology and Biochemistry 38, 81-96.

Boudet, A. M. **2007**: Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68, 2722-2735.

Brandl, W. & Herrmann, K. **1983**: Analytical and preparative high-performance liquid-chromatography of hydroxycinnamic acid esters. Journal of Chromatography 260, 447-455.

Cabané, M., Pireaux, J. C., Léger, E., Weber, E., Dizengremel, P., Pollet, B. & Lapierre, C. **2004**: Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. Plant Physiology 134, 586-594.

Calatayud, V., Sanz, M. J., Calvo, E., Cervero, J., Ansel, W. & Klumpp, A. **2007**: Ozone biomonitoring with Bel W3 tobacco plants in the city of Valencia (Spain). Water Air and Soil Pollution 183, 283-291.

Clifford, M. N. **1999**: Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture 79, 362-372.

Clifford, M. N. **2003**: The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. In: Methods in polyphenol analysis (Williamson, G. & Santos-Buelga, C., eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 314-337.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S. & Kuhnert, N. **2003**: Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2900-2911.

Clifford, M. N., Kirkpatrick, J., Kuhnert, N., Roozendaal, H. & Salgado, P. R. **2008**: LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. Food Chemistry 106, 379-385.

Clifford, M. N., Knight, S. & Kuhnert, N. **2005**: Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 3821-3832.

Clifford, M. N., Wu, W. G., Kirkpatrick, J. & Kuhnert, N. **2007**: Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSn. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 929-936.

Clifford, M. N., Zheng, W. & Kuhnert, N. **2006**: Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MSn. Phytochemical Analysis 17, 384-393.

Coleman, H., Park, J., Nair, R., Chapple, C. & Mansfield, S. **2008**: RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3´hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 4501-4506.

Conklin, P. L. & Barth, C. **2004**: Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. Plant Cell and Environment 27, 959-970.

Conklin, P. L., Williams, E. H. & Last, R. L. **2008**: Enviromental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93, 9970-9974.

Cuyckens, F. & Claeys, M. **2002**: Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. Rapid Communications in Mass Spectrometry 16, 2341-2348.

Dangl, J. L., Dietrich, R. A. & Richberg, M. H. **1996**: Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8, 1793-1807.

Dauwe, R., Morreel, K., Goeminne, G., Gielen, B., Rohde, A., Van Beeumen, J., Ralph, J., Boudet, A. M., Kopka, J., Rochange, S. F., Halpin, C., Messens, E. & Boerjan, W. **2007**: Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. Plant Journal 52, 263-285.

de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C. & Brinkman, U. A. T. **2006**: Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography A 1112, 31-63.

Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S. & Wang, L. J. **2002**: The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. Molecular Plant Pathology 3, 371-390.

Dixon, R. A. & Paiva, N. L. **1995**: Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7, 1085-1097.

Dunn, W. B., Bailey, N. J. C. & Johnson, H. E. **2005**: Measuring the metabolome: current analytical technologies. Analyst 130, 606-625.

Dunn, W. B. & Ellis, D. I. **2005**: Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. Trac-Trends in Analytical Chemistry 24, 285-294.

Dyer, W. & Weller, S. **2005**: Plant response to herbicides. In: Plant abitotic stress (Jenks, M. & Hasegawa, P., eds). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 171-202.

Eckey-Kaltenbach, H., Ernst, D., Heller, W. & Sandermann, H. **1994**: Biochemical-plant responses to ozone: 4. Cross-induction of defensive pathways in parsley (Petroselinum-Crispum L) plants. Plant Physiology 104, 67-74.

Eckey-Kaltenbach, H., Heller, W., Sonnenbichler, J., Zetl, I., Schäfer, W., Ernst, D. & Sandermann, H. **1993**: Oxidative stress and plant secondary metabolism: 6"-O-malonylapiin in parsley. Phytochemistry 34, 687-691.

Elstner, E. **1984**: Schadstoffe, die über die Luft zugeführt werden. In: Pflanzentoxikologie (Hock, B. & Elstner, E., eds). Bibliographisches Institut-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, pp. 67-94.

Engelsma, G. **1974**: Mechanism of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity induced by ultraviolet and blue-light in *Gherkin* hypocotyls. Plant Physiology 54, 702-705.

Ernst, D., Schraudner, M., Langebartels, C. & Sandermann, H. **1992**: Ozone-induced changes of messenger-RNA levels of beta-1,3-glucanase, chitinase and pathogenesis-related protein 1B in tobacco plants. Plant Molecular Biology 20, 673-682.

Escribano-Bailón, M. & Santos-Buelga, C. **2003**: Polyphenol extraction from foods. In: Methods in polyphenol analysis (Santos-Buelga, C. & Williamson, G., eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 1-16.

Euerby, M. R. & Petersson, P. **2005**: Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis. Journal of Chromatography A 1088, 1-15.

Fang, N. B., Yu, S. G. & Prior, R. L. **2002**: LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3579-3585.

Farag, M. A., Huhman, D. V., Lei, Z. T. & Sumner, L. W. **2007**: Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. Phytochemistry 68, 342-354.

Fernie, A. R., Trethewey, R. N., Krotzky, A. J. & Willmitzer, L. **2004**: Innovation - Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 763-769.

Fiehn, O. **2002**: Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology 48, 155-171.

Francini, A., Nali, C., Picchi, V. & Lorenzini, G. **2007**: Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. Environmental and Experimental Botany 60, 11-19.

Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M. & Chapple, C. **2002a**: Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. Plant Journal 30, 47-59.

Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C. & Chapple, C. **2002b**: The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. Plant Journal 30, 33-45.

Galliano, H., Cabane, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Sandermann, H. & Ernst, D. **1993a**: Molecular-cloning, sequence-analysis and elicitor-induced ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol-dehydrogenase from norway spruce (*Picea Abies* L). Plant Molecular Biology 23, 145-156.

Galliano, H., Heller, W. & Sandermann, H. **1993b**: Ozone induction and purification of spruce cinnamoyl alcohol-dehydrogenase. Phytochemistry 32, 557-563.

Grace, S. C. & Logan, B. A. **2000**: Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 355, 1499-1510.

Grandmaison, J., Olah, G. M., Vancalsteren, M. R. & Furlan, V. **1993**: Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. Mycorrhiza 3, 155-164.

Grimes, H. D., Perkins, K. K. & Boss, W. F. **1983**: Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological conditions - A spin trapping study. Plant Physiology 72, 1016-1020.

Grynkiewicz, G., Achmatowicz, O., Hennig, J., Indulski, J. & Klessig, D. F. **1993**: Synthesis and characterization of the salicylic-acid beta-D-glucopyranoside. Polish Journal of Chemistry 67, 1251-1254.

Guillet, G. & De Luca, V. **2005**: Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines. Plant Physiology 137, 692-699.

Hall, R. D. **2006**: Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. New Phytologist 169, 453-468.

Harborne, J. B., Williams, C. A., Greenham, J. & Moyna, P. **1974**: Distribution of charged flavones and caffeoylshikimic acid in *Palmae*. Phytochemistry 13, 1557-1559.

Haskins, F. A., Williams, L. G. & Gorz, H. J. **1964**: Light-induced trans to cis conversion of beta-D-glucosyl o-hydroxycinnamic acid in *Melilotus Alba* leaves. Plant Physiology 39, 777-781.

Heath, R. L. & Taylor, G. E. **1997**: Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: Forest Decline and ozone: A comparison of controlled chamber and field experiments (Sandermann, H., Wellburn, A. R. & Heath, R. L., eds). Springer, Berlin, pp. 317-368.

Heggestad, H. E. **1991**: Origin of Bel W3, Bel C and Bel B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. Environmental Pollution 74, 264-291.

Heiden, A. C., Hoffmann, T., Kahl, J., Kley, D., Klockow, D., Langebartels, C., Mehlhorn, H., Sandermann, H., Schraudner, M., Schuh, G. & Wildt, J. **1999**: Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. Ecological Applications 9, 1160-1167.

Hennig, J., Malamy, J., Grynkiewicz, G., Indulski, J. & Klessig, D. F. **1993**: Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. Plant Journal 4, 593-600.

Hernando, M. D., Ferrer, C., Ulaszewska, M., Garcia-Reyes, J. F., Molina-Diaz, A. & Fernandez-Alba, A. R. **2007**: Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 1815-1831.

Herrin, D. & Schmidt, G. **1988**: Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. BioTechniques 6, 196-200.

Herrmann K. **1978**: Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren enthaltende Naturstoffe in Pflanzen. Progr.Chem.Org.Nat.Prod. 35, 73-132.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. & Legrand, M. **2004**: Silencing of hydroxycinnamoyl Coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 16, 1446-1465.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. & Legrand, M. **2003**: Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. Journal of Biological Chemistry 278, 95-103.

Humphreys, J. M. & Chapple, C. **2002**: Rewriting the lignin roadmap. Current Opinion in Plant Biology 5, 224-229.

Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenbock, G. & Schnitzler, J. P. **1998**: Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. Journal of Experimental Botany 49, 953-965.

Iriti, M. & Faoro, F. **2008**: Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. Water Air and Soil Pollution 187, 285-301.

Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K. & Fujita, T. **2004**: In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 4893-4898.

Janzik, I., Preiskowski, S. & Kneifel, H. **2005**: Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3). Planta 1-8.

Jaspers, P., Kollist, H., Langebartels, C. & Kangasjärvi, J. **2005**: Plant responses to ozone. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants (Smirnoff, N., ed). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 268-292.

Joo, J. H., Wang, S. Y., Chen, J. G., Jones, A. M. & Fedoroff, N. V. **2005**: Different signalling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. Plant Cell 17, 957-970.

Justesen, U. **2000**: Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. Journal of Chromatography A 902, 369-379.

Kangasjärvi, J., Jaspers, P. & Kollist, H. **2005**: Signalling and cell death in ozone-exposed plants. Plant Cell and Environment 28, 1021-1036.

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R. **1994**: Plant Defense systems induced by ozone. Plant Cell and Environment 17, 783-794.

Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D. & Strack, D. **1996**: Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 42, 389-396.

Kerns, E. H., Kleintop, T., Little, D., Tobien, T., Mallis, L., Di, L., Hu, M., Hong, Y. & McConnell, O. J. **2004**: Integrated high capacity solid phase extraction-MS/MS system for pharmaceutical profiling in drug discovery. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 34, 1-9.

Kerstiens, G. & Lendzian, K. J. **1989**: Interactions between ozone and plant cuticles .1. Ozone deposition and permeability. New Phytologist 112, 13-19.

Kiehne, A. **1996**: Untersuchungen über Polyphenole in Tee und Kaffee mittels HPLC und Thermospray HPLC-MS. Dissertation, TU Braunschweig.

Kley, D., Kleinmann, M., Sanderman, H. & Krupa, S. **1999**: Photochemical oxidants: state of the science. Environmental Pollution 100, 19-42.

Klumpp, A., Ansel, W., and Klumpp, G. **2004**: European network for the assessment of air quality by the use of bioindicator plants. University of Hohenheim, Germany.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M. J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, A., Penuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J. P. & Calatayud, V. **2006**: Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. Atmospheric Environment 40, 7437-7448.

Koshiro, Y., Jackson, M. C., Katahira, R., Wang, M. L., Nagai, C. & Ashihara, H. **2007**: Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. Zeitschrift für Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences 62, 731-742.

Kromidas, S. **2000**: Handbuch Validierung in der Analytik, 1. ed. WILEY-VCH, Weinheim, Germany.

Kühnl, T., Koch, U., Heller, W. & Wellmann, E. **1987**: Chlorogenic acid biosynthesis - characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinate/shikimate 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus-Carota* L) cell-suspension cultures. Archives of Biochemistry and Biophysics 258, 226-232.

Laffray, X., Rose, C. & Garrec, J. P. **2007**: Estimation of ozone concentration in a valley of the alps mountains based on Bel W3 tobacco leaf injury. Water Air and Soil Pollution 186, 29-42.

Lai, J. P., Lim, Y. H., Su, J., Shen, H. M. & Ong, C. N. **2007**: Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three *Compositae* plants by LC/DAD-APCI/MS. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 848, 215-225.

Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H. **1989**: Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. Plant Physiology 90, 1163-1167.

Lam, E., Kato, N. & Lawton, M. **2001**: Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature 411, 848-853.

Lamb, C. & Dixon, R. A. **1997**: The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48, 251-275.

Lange, B. M., Lapierre, C. & Sandermann, H. **1995**: Elicitor-induced spruce stress lignin - structural similarity to early developmental lignins. Plant Physiology 108, 1277-1287.

Langebartels, C., Schraudner, M., Heller, W., Ernst, D. & Sandermann, H. **2002**: Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: Oxidative stress in plants (Inzé D., van Montague M., eds). Taylor and Francis, London 105-135.

Lichtenthäler, R. & Marx, F. **2005**: Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 103-110.

Lichtenthäler, R., Marx, F. & Kind, O. M. **2003**: Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. European Food Research and Technology 216, 166-173.

Lin, L. Z. & Harnly, J. M. **2007**: A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 1084-1096.

Long, M., Millar, D. J., Kimura, Y., Donovan, G., Rees, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M. & Bolwell, G. P. **2006**: Metabolite profiling of carotenoid and phenolic pathways in mutant and transgenic lines of tomato: Identification of a high antioxidant fruit line. Phytochemistry 67, 1750-1757.

Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H. & Ayoubi, P. **2006**: Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell and Environment 29, 1357-1371.

Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W. T., Elkind, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. **1994**: Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 7802-7806.

Marston, A. **2007**: Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. Phytochemistry 68, 2786-2798.

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. **2003**: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry 75, 3019-3030.

Memelink, J., Linthorst, H. J. M., Schilperoort, R. A. & Hoge, J. H. C. **1990**: Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. Plant Molecular Biology 14, 119-126.

Menser, A. **1964**: Responseof plants to air pollutants: III. A relation between ascorbate levels and ozone susceptibility of light pre-conditioned tobacco leaves. Plant Physiology 39, 564-567.

Messner, B. & Boll, M. **1993**: Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell-suspension culture of spruce (*Picea Abies*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 34, 261-269.

Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L. & Frankel, E. N. **1998**: Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 1783-1787.

Mittler, R. **2002**: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7, 405-410.

Mohr, P. G. & Cahill, D. M. **2001**: Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 58, 31-41.

Möller, B. & Herrmann, K. **1982**: Analysis of quinic acid-esters of hydroxycinnamic acids in plant-material by capillary gas-chromatography and high-performance liquid-chromatography. Journal of Chromatography 241, 371-379.

Negrel, J., Javelle, F. & Paynot, M. **1993**: Wound-induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum-Tuberosum*) tuber disks. Journal of Plant Physiology 142, 518-524.

Negrel, J. & Jeandet, P. **1987**: Metabolism of tyramine and feruloyltramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 26, 2185-2190.

Newman, M. A., Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J. & Dow, J. M. **2001**: Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hrp gene-dependent and hrp gene-independent mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions 14, 785-792.

Niessen, W. M. A. **1999**: State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 856, 179-197.

Niki, T., Mitsuhara, I., Seo, S., Ohtsubo, N. & Ohashi, Y. **1998**: Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant and Cell Physiology 39, 500-507.

O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J. & Klee, H. J. **2001**: Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. Plant Journal 25, 315-323.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D. & Robards, K. **2005**: Investigation of australian olive mill waste for recovery of biophenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 9911-9920.

Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kanna, M., Ioki, M., Kamada, H. & Saji, H. **2005**: Salicylic acid accumulation under O_3 exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. Plant and Cell Physiology 46, 1062-1072.

Ohashi, Y. & Ohshima, M. **1992**: Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. Plant and Cell Physiology 33, 819-826.

Olsson, L. C., Veit, M., Weissenbock, G. & Bornman, J. F. **1998**: Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. Phytochemistry 49, 1021-1028.

Örvar, B. L., McPherson, J. & Ellis, B. E. **1997**: Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. Plant Journal 11, 203-212.

Overmyer, K., Brosché, M. & Kangasjärvi, J. **2003**: Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. Trends in Plant Science 8, 335-342.

Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B. & Galensa, R. **2004**: Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3784-3791.

Parejo, I., Jauregui, O., Sanchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. **2004**: Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3679-3687.

Parr, A. J. & Bolwell, G. P. **2000**: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 985-1012.

Pasqualini, S., Della Torre, G., Ferranti, F., Ederli, L., Piccioni, C., Reale, L. & Antonielli, M. **2002**: Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. Physiologia Plantarum 115, 204-212.

Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Della Torre, G. & Ferranti, F. **200**3: Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. Plant Physiology 133, 1122-1134.

Pell, E. J., Schlagnhaufer, C. D. & Arteca, R. N. **1997**: Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. Physiologia Plantarum 100, 264-273.

Rao, M. V. & Davis, K. R. **2001**: The physiology of ozone induced cell death. Planta 213, 682-690.

Rao, M. V., Koch, J. R. & Davis, K. R. **2000a**: Ozone: A tool for probing programmed cell death in plants. Plant Molecular Biology 44, 345-358.

Rao, M. V., Lee, H., Creelman, R. A., Mullet, J. E. & Davis, K. R. **2000b**: Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. Plant Cell 12, 1633-1646.

Rao, M. V., Lee, H. & Davis, K. R. **2002**: Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. Plant Journal 32, 447-456.

Rauha, J. P., Vuorela, H. & Kostiainen, R. **2001**: Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry 36, 1269-1280.

Rodrigues, R. B., Lichtenthäler, R., Zimmermann, B. F., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H. & Marx, F. **2006**: Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 4162-4167.

Roepenack-Lahaye, E., Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D. & Clemens, S. **2004**: Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Plant Physiology 134, 548-559.

Saito, T., Yamane, H., Murofushi, N., Takahashi, N. & Phinney, B. O. **1997**: 4-O-caffeoylshikimic and 4-O-(p-coumaroyl)shikimic acids from the dwarf tree fern, *Dicksonia antarctica*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61, 1397-1398.

Sambrook, J. & Russel, D. **2001**: Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sanchez-Rabaneda, F., Jauregui, O., Casals, I., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M. & Lamuela-Raventos, R. M. **2003**: Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). Journal of Mass Spectrometry 38, 35-42.

Sanchez-Rabaneda, F., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. **2004**: Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18, 553-563.

Sandermann, H. **1996**: Ozone and plant health. Annual Review of Phytopathology 34, 347-366.

Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. & Langebartels, C. **1998**: Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends in Plant Science 3, 47-50.

Sant' Anna, S. M. R., Esposito, M. P., Domingos, M. & Souza, S. R. **2008**: Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in Sao Paulo, Brazil. Environmental Pollution 151, 389-394.

Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. & Boller, T. **1986**: Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324, 365-367.

Schmidt, A., Scheel, D. & Strack, D. **1998**: Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. Planta 205, 51-55.

Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P. & Werck-Reichhart, D. **2001**: CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3 '-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. Journal of Biological Chemistry 276, 36566-36574.

Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C. & Sandermann, H. **1992**: Biochemical-plant responses to ozone .3. Activation of the defense-related proteins beta-1,3-glucanase and chitinase in tobacco-leaves. Plant Physiology 99, 1321-1328.

Schraudner, M., Graf, U., Langebartels, C. & Sandermann, H. **1994**: Ambient ozone can induce plant defense reactions in tobacco. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B-Biological Sciences 102, 55-61.

Schraudner, M., Langebartels, C., Negrel, J. & Sandermann, H. **1993**: Plant defence reactions induced in tobacco by the air pollutant ozone. In: Mechanisms of plant defence responses (Fritig, B. & Legrand, M., eds). Kleuwer Press, Dordrecht, pp. 286-290.

Schraudner, M., Langebartels, C. & Sandermann, H. **1997**: Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. Physiologia Plantarum 100, 274-280.

Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inzé, D., Langebartels, C. & Sandermann, H. **1998**: Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. Plant Journal 16, 235-245.

Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R. & Schieber, A. **2004**: Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 4090-4096.

Seger, C. & Sturm, S. **2007**: Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: Current standings and future aims. Journal of Proteome Research 6, 480-497.

Severino, J. F., Stich, K. & Soja, G. **2007**: Ozone stress and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centaurea jacea* leaves. Environmental Pollution 146, 707-714.

Shadle, G. L., Wesley, S. V., Korth, K. L., Chen, F., Lamb, C. & Dixon, R. A. **2003**: Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry 64, 153-161.

Silverman, F. P., Petracek, P. D., Fledderman, C. M., Ju, Z. G., Heiman, D. F. & Warrior, P. **2005**: Salicylate activity. 1. Protection of plants from Paraquat injury. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 9764-9768.

Stobiecki, M., Skirycz, A., Kerhoas, L., Kachlicki, P., Muth, D., Einhorn, J. & Mueller-Roeber, B. **2006**: Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. Metabolomics 2, 197-219.

Strack, D., Heilemann, J., Klinkott, E. S. & Wray, V. **1988**: Cell wall-bound phenolics from norway spruce (*Picea abies*) needles. Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences 43, 37-41.

Swatsitang, P., Tucker, G., Robards, K. & Jardine, D. **2000**: Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. Analytica Chimica Acta 417, 231-240.

Takahama, U. **1998**: Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. Plant and Cell Physiology 39, 681-689.

Tang, L. & Kebarle, P. **1993**: Dependence of ion intensity in electrospray mass-spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. Analytical Chemistry 65, 3654-3668.

Taylor, P. J. **2005**: Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clinical Biochemistry 38, 328-334.

Tietjen, K. G., Hunkler, D. & Matern, U. **1983**: Differential response of cultured parsley cells to elicitors from 2 non-pathogenic strains of fungi .1. Identification of induced products as coumarin derivatives. European Journal of Biochemistry 131, 401-407.

Tura, D. & Robards, K. **2002**: Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. Journal of Chromatography A 975, 71-93.

Umweltbundesamt. **2007**. Ozonsituation im Sommer 2007 in der Bundesrepublik Deutschland. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 1-15.

van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. **2006**: Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44, 135-162.

Vance, C. P., Kirk, T. K. & Sherwood, R. T. **1980**: Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology 18, 259-288.

Veit, M., Weidner, C., Strack, D., Wray, V., Witte, L. & Czygan, F. C. **1992**: The distribution of caffeic acid conjugates in the *Equisetaceae* and some ferns. Phytochemistry 31, 3483-3485.

Villas-Boas, S., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. **2005**: Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 24, 613-646.

Vollenweider, P., Ottiger, M. & Gunthardt-Goerg, M. S. **2003**: Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. Environmental Pollution 124, 101-118.

Waldhauser Mösli, S. S. & Baumann, T. W. **1996**: Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. Phytochemistry 42, 985-996.

Windig, W., Phalp, J. M. & Payne, A. W. **1996**: A noise and background reduction method for component detection in liquid chromatography mass spectrometry. Analytical Chemistry 68, 3602-3606.

Wohlgemuth, H. **2002**: Untersuchungen zur Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei ozoninduziertem Zelltod in Pflanzen. Dissertation, LMU München.

Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H. J., Overmyer, K., Kangasjärvi, J., Sandermann, H. & Langebartels, C. **2002**: Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. Plant Cell and Environment 25, 717-726.

Wong, W. S., Guo, D., Wang, X. L., Yin, Z. Q., Xia, B. & Li, N. **2005**: Study of cis-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 43, 929-937.

Yalpani, N., Enyedi, A. J., Leon, J. & Raskin, I. **1994**: Ultraviolet-light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus-resistance in tobacco. Planta 193, 372-376.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. **1993**: Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. Plant Physiology 103, 315-321.

Yamamoto, E. & Towers, G. H. N. **1985**: Cell-wall bound ferulic acid in barley seedlings during development and its photoisomerization. Journal of Plant Physiology 117, 441-449.

Ye, M., Yan, Y. N. & Guo, D. A. **2005**: Characterization of phenolic compounds in the chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 1469-1484.

Youngman, R. & Elstner, E. **1984**: Wirkungsmechanismen von Herbiziden. In: Pflanzentoxikologie (Hock, B. & Elstner, E., eds). Bibliographisches Institut-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, pp. 132-151.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH) in Kooperation mit dem Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre (ICG-3, Phytosphäre) des Forschungszentrums Jülich.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rudolf Galensa bedanke ich mich herzlich für das rege Interesse an meiner Arbeit sowie die fortwährende Unterstützung.
Herrn Dr. Stephan Küppers danke ich für die Aufnahme in die ZCH und das Interesse an meiner Arbeit.
Bei Herrn Dr. Stephan Küppers und Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit zwischen der ZCH und dem ICG-3.
Frau Prof. Dr. Gabriele König danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.
Mein besonderer Dank gilt Frau JuProf. Dr. Ingar Janzik für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die Bereitschaft, als Mitglied der Prüfungskommission zur Verfügung zu stehen.
Mein ganz herzlicher Dank gilt Frau JuProf. Dr. Ingar Janzik, Frau Dr. Sabine Willbold und Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.
Herrn Privatdozent Dr. Friedhelm Marx danke ich für die Bereitschaft, als Mitglied der Prüfungskommission zur Verfügung zu stehen.
Bei Frau Dr. Roberta Rodrigues und Frau Tina Dimmer möchte ich mich für die durchgeführten TOSC-Analysen bedanken.
Herrn Prof. Dr. U. Conrath danke ich für die Bereitstellung der TMV-Stammlösung und Herrn Dr. Jürgen Lewald danke ich für die Einarbeitung in die Durchführung einer Infektion von Tabakpflanzen mit Tabakmosaikviren.
Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel, BioSpec, Forschungszentrum Jülich danke ich herzlich für die Zusammenarbeit am FTICR-MS.
Bei Frau Sabine Preiskowski möchte ich mich für die Durchführung der Northern Analysen bedanken.
Herrn Prof. Dr. Helmut Kneifel danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen.

Frau Lilia Härter und Frau Andrea Scholl danke ich für ihr wertvolles Engagement während ihrer Projektarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Ingar, Sabine, W., Bea, Andrea, Sabine P., Ralf, Kathi, Kate, Sven, Anja, Ricarda, Kim, Patric und Simone für die innerhalb und außerhalb des Labors verbrachte schöne Zeit.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der ZCH und des ICG-3 für die gute Arbeitsatmosphäre danken.

Meinem Freund Michael, meinen Eltern und meinem Bruder Lennart gilt mein besonderer und herzlicher Dank für die große Unterstützung.

1. **Einsatz von multispektralen Satellitenbilddaten in der Wasserhaushalts- und Stoffstrommodellierung – dargestellt am Beispiel des Rureinzugsgebietes**
   von C. Montzka (2008), XX, 238 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-508-1

2. **Ozone Production in the Atmosphere Simulation Chamber SAPHIR**
   by C. A. Richter (2008), XIV, 147 pages
   ISBN: 978-3-89336-513-5

3. **Entwicklung neuer Schutz- und Kontaktierungsschichten für Hochtemperatur-Brennstoffzellen**
   von T. Kiefer (2008), 138 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-514-2

4. **Optimierung der Reflektivität keramischer Wärmedämmschichten aus Yttrium-teilstabilisiertem Zirkoniumdioxid für den Einsatz auf metallischen Komponenten in Gasturbinen**
   von A. Stuke (2008), X, 201 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-515-9

5. **Lichtstreuende Oberflächen, Schichten und Schichtsysteme zur Verbesserung der Lichteinkopplung in Silizium-Dünnschichtsolarzellen**
   von M. Berginski (2008), XV, 171 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-516-6

6. **Politikszenarien für den Klimaschutz IV – Szenarien bis 2030**
   hrsg.von P. Markewitz, F. Chr. Matthes (2008), 376 Seiten
   ISBN 978-3-89336-518-0

7. **Untersuchungen zum Verschmutzungsverhalten rheinischer Braunkohlen in Kohledampferzeugern**
   von A. Schlüter (2008), 164 Seiten
   ISBN 978-3-89336-524-1

8. **Inorganic Microporous Membranes for Gas Separation in Fossil Fuel Power Plants**
   by G. van der Donk (2008), VI, 120 pages
   ISBN: 978-3-89336-525-8

9. **Sinterung von Zirkoniumdioxid-Elektrolyten im Mehrlagenverbund der oxidkeramischen Brennstoffzelle (SOFC)**
   von R. Mücke (2008), VI, 165 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-529-6

10. **Safety Considerations on Liquid Hydrogen**
    by K. Verfondern (2008), VIII, 167 pages
    ISBN: 978-3-89336-530-2

11. **Kerosinreformierung für Luftfahrtanwendungen**
    von R. C. Samsun (2008), VII, 218 Seiten
    ISBN: 978-3-89336-531-9

12. **Der 4. Deutsche Wasserstoff Congress 2008 – Tagungsband**
    hrsg. von D. Stolten, B. Emonts, Th. Grube (2008), 269 Seiten
    ISBN: 978-3-89336-533-3

13. **Organic matter in Late Devonian sediments as an indicator for environmental changes**
    by M. Kloppisch (2008), XII, 188 pages
    ISBN: 978-3-89336-534-0

14. **Entschwefelung von Mitteldestillaten für die Anwendung in mobilen Brennstoffzellen-Systemen**
    von J. Latz (2008), XII, 215 Seiten
    ISBN: 978-3-89336-535-7

15. **RED-IMPACT**
    Impact of Partitioning, Transmutation and Waste Reduction Technologies on the Final Nuclear Waste Disposal
    SYNTHESIS REPORT
    ed. by W. von Lensa, R. Nabbi, M. Rossbach (2008), 178 pages
    ISBN 978-3-89336-538-8

16. **Ferritic Steel Interconnectors and their Interactions with Ni Base Anodes in Solid Oxide Fuel Cells (SOFC)**
    by J. H. Froitzheim (2008), 169 pages
    ISBN: 978-3-89336-540-1

17. **Integrated Modelling of Nutrients in Selected River Basins of Turkey**
    Results of a bilateral German-Turkish Research Project
    project coord. M. Karpuzcu, F. Wendland (2008), XVI, 183 pages
    ISBN: 978-3-89336-541-8

18. **Isotopengeochemische Studien zur klimatischen Ausprägung der Jüngeren Dryas in terrestrischen Archiven Eurasiens**
    von J. Parplies (2008), XI, 155 Seiten, Anh.
    ISBN: 978-3-89336-542-5

19. **Untersuchungen zur Klimavariabilität auf dem Tibetischen Plateau - Ein Beitrag auf der Basis stabiler Kohlenstoff- und Sauerstoffisotope in Jahrringen von Bäumen waldgrenznaher Standorte**
    von J. Griessinger (2008), XIII, 172 Seiten
    ISBN: 978-3-89336-544-9

20. **Neutron-Irradiation + Helium Hardening & Embrittlement Modeling of 9%Cr-Steels in an Engineering Perspective (HELENA)**
by R. Chaouadi (2008), VIII, 139 pages
ISBN: 978-3-89336-545-6

21. **Messung und Bewertung von Verkehrsemissionen**
von D. Klemp, B. Mittermaier (2008), ca. 230 Seiten
ISBN: 978-3-89336-546-3

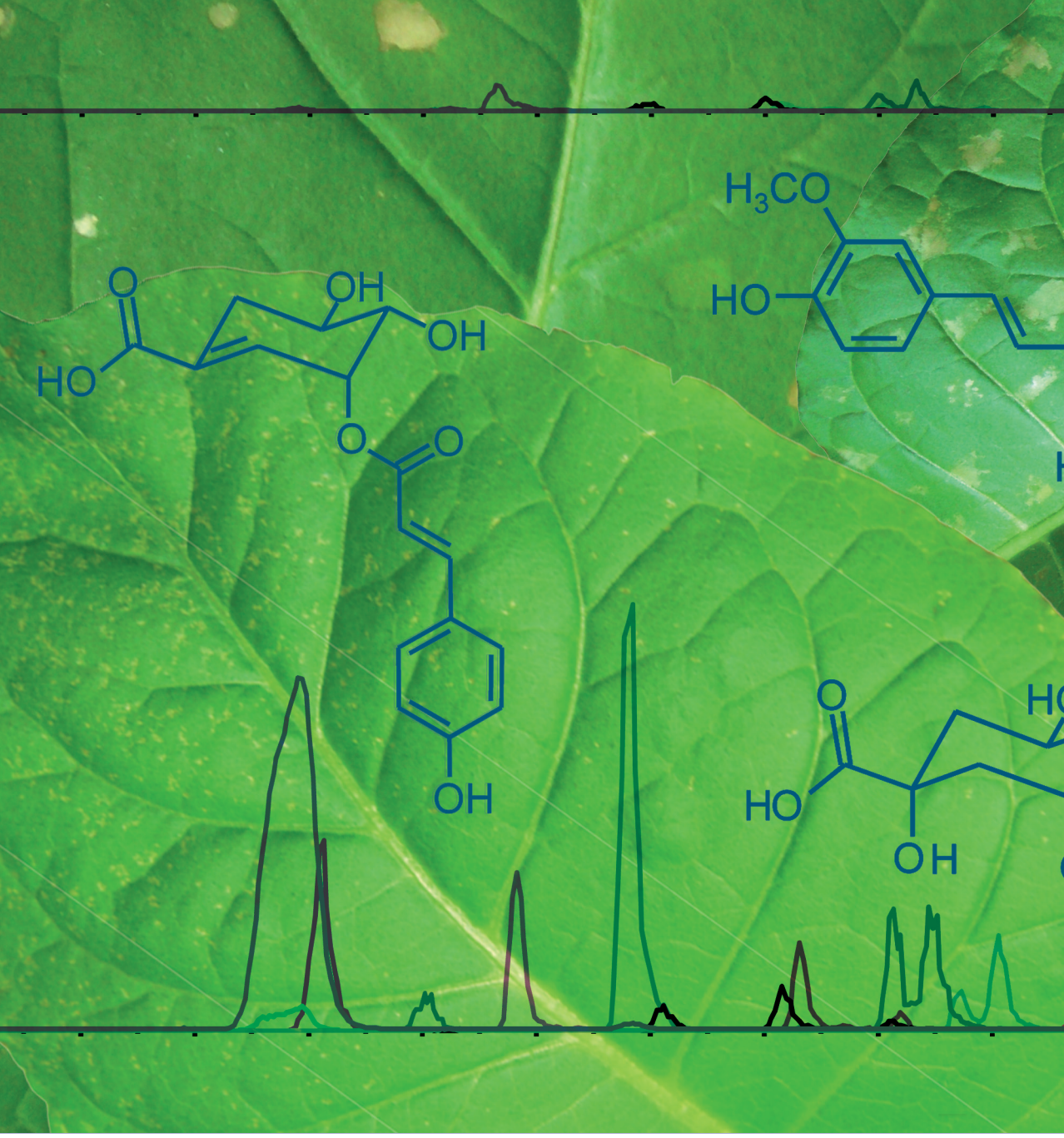
22. **Verbundvorhaben APAWAGS (AOEV und Wassergenerierung) – Teilprojekt: Brennstoffreformierung – Schlussbericht**
von R. Peters, R. C. Samsun, J. Pasel, Z. Porš, D. Stolten (2008), VI, 106 Seiten
ISBN: 978-3-89336-547-0

23. **FREEVAL**
Evaluation of a Fire Radiative Power Product derived from Meteosat 8/9 and Identification of Operational User Needs
Final Report
project coord. M. Schultz, M. Wooster (2008), 139 pages
ISBN: 978-3-89336-549-4

24. **Untersuchungen zum Alkaliverhalten unter Oxycoal-Bedingungen**
von C. Weber (2008), VII, 143, XII Seiten
ISBN: 978-3-89336-551-7

25. **Grundlegende Untersuchungen zur Freisetzung von Spurstoffen, Heißgaschemie, Korrosionsbeständigkeit keramischer Werkstoffe und Alkalirückhaltung in der Druckkohlenstaubfeuerung**
von M. Müller (2008), 207 Seiten
ISBN: 978-3-89336-552-4

26. **Analytik von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 mittels LC-MS**
von I. Koch (2008), III, V, 153 Seiten
ISBN: 978-3-89336-553-1



Band | Volume 26
ISBN 978-3-89336-553-1

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM