

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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 Dicafeoylchinasäure.....	72
4.2.3	<i>E</i> - und <i>Z</i> -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 β -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

Inhaltsverzeichnis

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 <i>N. tabacum</i> L. cv Bel W3 in <i>E</i> - 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