



FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA



Chemisch-Geowissenschaftliche
Fakultät



Max Planck Institute
for Chemical Ecology

MASTERARBEIT

Lipidmodulationen bei der
Verteidigung von Diatomeen
gegen Predatoren und den
Pathogen *L. coscinodisci*

Samo Marcinko
geboren am 09. Juni 1995
in Nürnberg

Jena, 12.08.2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Georg Pohnert

Zweitgutachter: Dr. rer. nat. Thomas Wichard

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Phytoplankton. Unscheinbar – und unwichtig?	1
1.2	Diatomeen	3
1.3	Biologische Stressoren	5
1.4	Verteidigungsmechanismen von Phytoplankton	7
1.5	PUFAs und Oxylipine in Diatomeen	10
1.6	Metabolomics	12
1.7	Zielsetzung	15

2 Methoden und Materialien

2.1	Kultivierung	17
2.2	Extraktion	17
2.3	Instrumentelle Analytik	21
2.4	Datenprozessierung und -auswertung	22

3 Ergebnisse

3.1	Experiment 1: Modulation von PUFAs in <i>C. granii</i> durch dreißigminütige Exposition mit <i>L. coscinodisci</i>	27
3.2	Experiment 2: Verwundungsaktivierte PUFA- und Oxylipin-Modulation in den Diatomeen <i>C. granii</i> , <i>C. radiatus</i> und <i>C. wailesii</i>	34
3.3	Experiment 3: PUFA-Modulation in den Diatomeen <i>C. granii</i> , <i>C. radiatus</i> und <i>C. wailesii</i> durch eintägige Exposition mit <i>L. coscinodisci</i>	53

4 Diskussion der Ergebnisse und biologische Einordnung

4.1	Experiment 1: Modulation von PUFAs in <i>C. granii</i> durch dreißigminütige Exposition mit <i>L. coscinodisci</i>	64
4.2	Experiment 2: Verwundungsaktivierte Modulation von PUFAs und Oxylipinen in den Diatomeen <i>C. granii</i> , <i>C. radiatus</i> und <i>C. wailesii</i>	67
4.3	Experiment 3: Modulation von PUFAs in <i>C. granii</i> , <i>C. radiatus</i> und <i>C. wailesii</i> durch eintägige Exposition mit <i>L. coscinodisci</i>	71

5 Zusammenfassung

6 Literaturverzeichnis

7 Anhang

I Abkürzungsverzeichnis

CG	<i>Coscinodiscus granii</i>
CR	<i>Coscinodiscus radiatus</i>
CW	<i>Coscinodiscus wailesii</i>
DPA	Docosapentaensäure
EpHDHE	Epoxyhydrodocosahexaensäure
EpHEPE	Epoxyhydroxeicosapentaensäure
EpHETE	Epoxyhydroxyarachidonsäure
HEPE	Hydroxeicospentaensäure
PGB3	Prostaglandin B3
PGJ2	Prostaglandin J2
SA	Stearidonsäure

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von zentrischer (links) und pennater Form (rechts) der Diatomeen.....	3
Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der zentrischen Diatomeenspezies <i>Coscinodiscus granii</i> (links), <i>Coscinodiscus radiatus</i> (Mitte) und <i>Coscinodiscus wailesii</i> (rechts).....	4
Abbildung 3: Ablauf der Infektion einer <i>Coscinodiscus</i> Zelle mit dem Parasitoiden <i>L. coscinodisci</i>	6
Abbildung 4: Reaktionsschema der Fettsäureoxidation	11
Abbildung 5: Metabolomischer Workflow mit Bezug auf diese Masterarbeit	12
Abbildung 6: Workflow der Datenprozessierung mittels Compound Discoverer	23
Abbildung 7: Workflow zur Extraktion im ersten Experiment.....	28
Abbildung 8: Total Ion Chromatograms (TIC) der massenspektrometrischen Messungen im ersten Experiment	29
Abbildung 9: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA zur Oxylinmodulation von <i>C. granii</i> durch dreißigminütige Exposition mit dem Parasitoiden <i>L. coscinodisci</i>	33
Abbildung 10: a) Workflow zur Extraktionsmethode A nach Jagusch ^[87] ; b) Workflow Extraktionsmethode B	35
Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse zum zweiten Experiment mit der Extraktionsmethode A	37
Abbildung 12: PCA-Score-Plot zum zweiten Experiment mit der Extraktionsmethode B;	38
Abbildung 13: PCA-Score-Plot zum zweiten Experiment; Exo- und Endometabolom von <i>C. radiatus</i>	39
Abbildung 14: PCA-Score-Plots zum zweiten Experiment; Exo- und Endometabolom von <i>C. wailesii</i>	39

Abbildung 15: Volcano-Plots der Differentialanalysen zu <i>C. granii</i> (a), <i>C. radiatus</i> (b) und <i>C. walesii</i> (c) im zweiten Experiment.....	43
Abbildung 16: Box-Whisker-Plots in <i>C. granii</i> (a) und <i>C. walesii</i> (b) zu dem Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA).....	44
Abbildung 17: Volcano Plots der Differentialanalyse zum Endometabolom von <i>C. granii</i> (a) und Exometabolom (b) in Experiment 2 und über Extraktionsmethode B	45
Abbildung 18: Box-Whisker-Plots zum Feature $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA).....	46
Abbildung 19: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA sowie Box-Whisker-Plots des Features $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA) im Endometabolom (c) und Exometabolom (d) von <i>C. radiatus</i> im zweiten Experiment.....	48
Abbildung 20: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA sowie Box-Whisker-Plots des Features $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE) im Endometabolom (c) und Exometabolom (d) von <i>C. walesii</i> im zweiten Experiment	50
Abbildung 21: Workflow Extraktion und Messung Experiment 3	53
Abbildung 22: Säulendiagramm mit den bestimmten Zelldichten für die Kontrollen (C) und Expositionsgruppen (T) der Spezies <i>C. granii</i> (CG), <i>C. radiatus</i> (CR) und <i>C. walesii</i> (CW) mit Standardabweichung.....	54
Abbildung 23: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von <i>C. granii</i>	56
Abbildung 24: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von <i>C. radiatus</i>	57
Abbildung 25: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von <i>C. walesii</i>	58
Abbildung 26: Säulendiagramm (links) mit Standardabweichung und Box-Whisker-Plot zu dem Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA) in <i>C. granii</i>	60
Abbildung 27: Ergebnisse des t-Tests für das Endometabolom von <i>C. granii</i> (links) und <i>C. radiatus</i> (rechts) nach 24h Exposition mit <i>L. coscinodisci</i> ;	61
Abbildung 29: Säulendiagramm (links) mit Standardabweichung und Box-Whisker-Plot zu dem Feature $C_{20}H_{32}O_2$ (vermutlich Arachidonsäure) in <i>C. granii</i>	62

Abbildung 29: MSMS des Features $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA)	83
Abbildung 30: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA, blau markiert) in <i>C. granii</i>	84
Abbildung 32: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA, blau markiert) in <i>C. granii</i>	85
Abbildung 33: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE, blau markiert) in <i>C. granii</i>	86
Abbildung 34: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA, blau markiert) in <i>C. granii</i>	87
Abbildung 34: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA, blau markiert) in <i>C. granii</i>	88
Abbildung 35: MSMS des Features $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA)	89

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die gezielt im Zuge der Targeted Analysis gesuchten Verbindungen.....	25
Tabelle 2: Übersicht über die Ergebnisse der Targeted Analysis für Experiment 2.....	41
Tabelle 3: Übersicht über alle signifikanten Features des zweiten Experiments	41
Tabelle 4: Übersicht über weitere gefundene Features im zweiten Experiment (Extraktionsmethode A)	51
Tabelle 5: Übersicht über weitere gefundene Features im zweiten Experiment (Extraktionsmethode B)	52
Tabelle 6: Übersicht über alle weiteren gefundenen Features im dritten Experiment.....	63

1 Einleitung

1.1 Phytoplankton. Unscheinbar – und unwichtig?

Etwa 70 Gigatonnen unseres atmosphärischen CO₂ werden jährlich durch photosynthesebetreibende Pflanzen im Rahmen des globalen Kohlenstoffkreislaufs fixiert.^[1] Neben seiner Funktion als Regulator des Treibhauseffekts, spielt dieser Transfer von Kohlenstoff auch eine enorm wichtige Rolle als Grundstein unserer Nahrungskette.^[1] Zu den wohl bekanntesten Vertretern der Pflanzen, die durch Photosynthese CO₂ in organischen Kohlenstoff umwandeln, gehören wohl die tropischen Regenwälder, die etwa für die Hälfte des an Land gebundenen CO₂ verantwortlich sind.^[2] Die gleiche Menge an Kohlenstoffdioxid wird auch von Kieselalgen fixiert.^[3] Ihr Genus gehört einer viel unscheinbareren Gruppe pflanzlicher Organismen an. Dem Phytoplankton.

Das Phytoplankton umschreibt eine große Klasse an verschiedenen, mikroskopisch kleinen, einzelligen Lebewesen, die zur Photosynthese fähig und in unseren Binnengewässern und Ozeanen leben.^[4] Zählt man die Primärproduktion an Land und im Wasser zusammen, macht das Phytoplankton etwa 40 % dieser aus und bildet dadurch den Grundstein des marinen Nahrungsnetzes.^[3,5] Es lässt sich im Allgemeinen in eine prokaryotische Gruppe (z.B. Cyanobakterien) und eine eukaryotische Gruppe unterteilen. Zu letzterer gehören unter anderem die Dinoflagellaten und die bereits erwähnten Kieselalgen, die auch als Diatomeen bezeichnet werden.^[4,6] Um ausreichend zu wachsen, sind die Zellen des Phytoplanktons abhängig von der Verfügbarkeit bestimmter Nährstoffe, wie zum Beispiel anorganischem Stickstoff, Phosphor und Silizium.^[3] Sind das Nährstoffangebot und weitere Faktoren, wie Licht und Temperatur gut, können die Zellen sich relativ ungestört reproduzieren, wodurch aus kleinen Mikroalgengemeinschaften manchmal große Populationen entstehen können. Diese Algenblüten sind manchmal sogar aus dem All zu erkennen.^[6] In seltenen Fällen können die Populationen auch in großer Zahl aus Spezies bestehen, die dazu fähig sind, toxische Verbindungen zu produzieren. Dazu gehört zum Beispiel die Dinoflagellatenart *Alexandrium minutum*, die PST (Paralytic Shellfish Toxin) synthetisieren und bei Fischen, Vögeln und Menschen schwere Vergiftungen

hervorrufen kann.^[7,8] Folge davon sind nicht nur gesundheitlicher Natur, sondern mit Hinblick auf die Fischereiwirtschaft auch ökonomischer.^[9,10]

Phytoplanktonzellen sind weiterhin extrem divers in ihrer Morphologie und können diese auch an gegebene Umweltbedingungen anpassen.^[11] Außerdem sind sie dazu fähig, ein großes Spektrum verschiedener Verbindungen zu produzieren und diese in ihre Umgebung freizusetzen. Diese Chemikalien können dazu dienen, Informationen innerhalb der Gemeinschaft auszutauschen oder bestimmte Stoffwechselfvorgänge in anderen Zellen auszulösen.^[12–14] Außerdem werden sie zur Kommunikation zwischen Bakterienkulturen und den Mikroalgen eingesetzt ^[15] oder auch zur Verteidigung gegen Pathogene und Fraßfeinde.^[16–18]

Insgesamt sind die Vorgänge in den Mikroversen unsere Meere, Flüsse und Seen also deutlich komplexer als man vielleicht auf den ersten Blick vermuten würde. Viele der ablaufenden Prozesse sind nach wie vor unverstanden und Gegenstand der chemisch ökologischen Forschung. Da eine große Zahl an Stoffen, die von Phytoplankton produziert werden, zum Beispiel ein hohes Potenzial für die Produktion von Biotreibstoff ^[19] oder auch als Zytostatika in der Krebsforschung bieten ^[20], dienen zukünftige Forschungsergebnisse nicht nur der Erweiterung unserer Kenntnis über marine Ökosysteme, sondern eröffnen auch Möglichkeiten in der direkten Anwendung.

1.2 Diatomeen

Die mit Abstand größte Klasse mit etwa zwei Dritteln des weltweiten Vorkommens von Phytoplankton stellen die Diatomeen – oder auch Kieselalgen – dar.^[21] Es handelt sich bei ihnen um eukaryotische Einzeller, die von außen in einem charakteristischen goldbräunlichen Farbton erscheinen (Abbildung 2). Die Ursache für die Farbigkeit liegt in dem Carotinoid Fucoxanthin, das ihre Chloroplasten enthalten.^[21] Darüber hinaus zeichnen sie sich morphologisch vor allem durch ihre Hülle, die sogenannte Frustel, aus. Diese besteht überwiegend aus Silikaten und bildet eine schachtelartige Verknüpfung zweier Schalenhälften, die sehr stark einer Petrischale ähnelt. Die innere Schale wird dabei als Hypotheka, die äußere als Epitheka bezeichnet. Anhand der Oberflächen dieser Schalen können Kieselalgen in eine zentrische oder pennate Form unterteilt werden (Abbildung 1). Die Bildung der Frustel fixiert jährlich eine große Menge an Silizium, weshalb die Diatomeen auch ein wichtiger Bestandteil des weltweiten Siliziumkreislaufs sind.^[22,23]

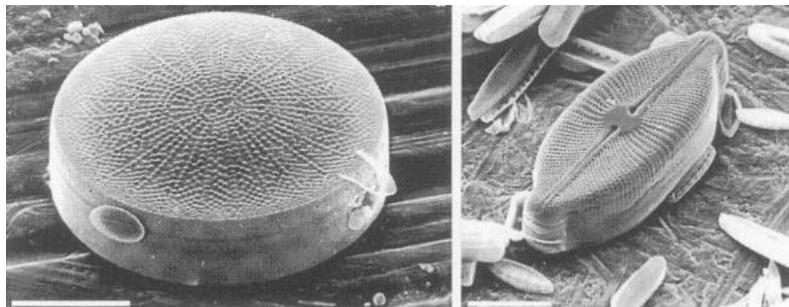


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von zentrischer (links) und pennater Form (rechts) der Diatomeen. Der Maßstab entspricht 10 (links) bzw. 20 μm (rechts). Vor allem bei Ersterer ist die Ähnlichkeit der Form zu einer Petrischale mit der inneren Hypotheka und der äußeren Epitheka gut zu erkennen. Abbildung entnommen aus Smol et al. ^[24] und überarbeitet.

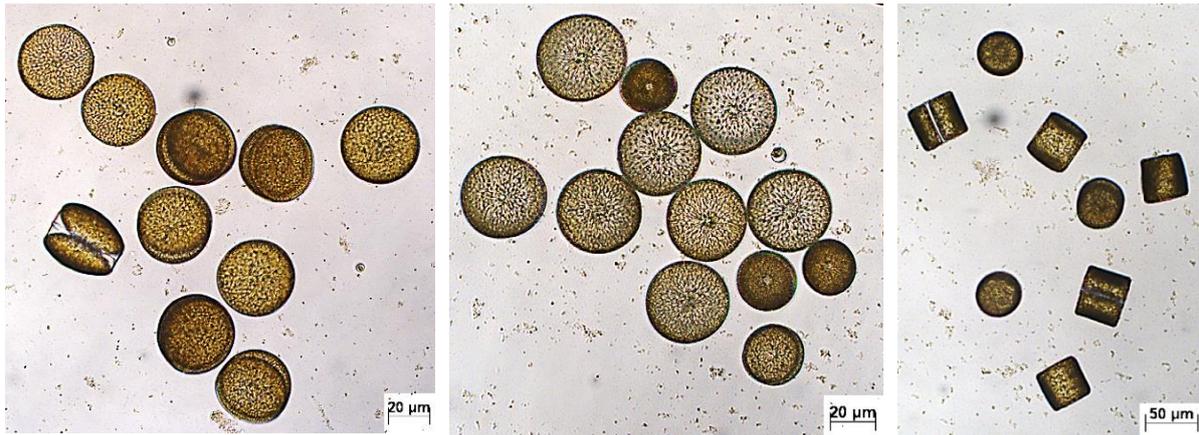


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der zentrischen Diatomeenspezies *Coscinodiscus granii* (links), *Coscinodiscus radiatus* (Mitte) und *Coscinodiscus walesii* (rechts). Die typisch goldbraune Farbe ist gut zu erkennen.

Diatomeen sind unter gewissen Bedingungen dazu fähig, Chemikalien freizusetzen, die je nach vorliegender Situation eine unterschiedliche Funktion erfüllen. Innerhalb der gleichen Art spielen sie zum Beispiel als Pheromone bei der sexuellen Reproduktion eine wichtige Rolle. Die Fortpflanzung erfolgt dabei einem typischen, sich wiederholendem Ablauf.^[25] So werden Diatomeen im Laufe ihres Lebens durch Mitose stetig kleiner. Erreichen sie einen speziesabhängigen Minimalschwellenwert in ihrer Zellgröße, wird die Ausbildung zweier sogenannter Mating-types (MT^- und MT^+) initiiert. Durch die Abgabe von Pheromonen wird schließlich der Zelltyp MT^+ durch MT^- angezogen und es kommt zu einer geschlechtlichen Fortpflanzung, wodurch am Ende wieder eine Diatomeenzelle in Originalgröße entsteht.^[25,26]

Neben dieser Kommunikation zwischen Zellen der gleichen Art, gibt es aber auch die Möglichkeit, dass andere Phytoplanktonarten durch die Aussendung von Allelochemikalien beeinflusst werden. Dieser Einfluss kann dabei negative Folgen für die andere Art und beispielsweise eine Hemmung ihrer Entwicklung verursachen ^[27] oder auch positive Effekte bewirken, wie zum Beispiel die Unterstützung des Wachstums.^[28] Auch die Interaktion mit Bakterien kann durch die Kommunikation über Infochemikalien erfolgen.^[29]

In Gefahrensituation sind Diatomeen aber auch fähig, Verbindungen zu produzieren, die zur Verteidigung dienen. Vor allem in den letzten zwanzig Jahren wurden einige Arbeiten veröffentlicht, die gezeigt haben, dass sich Diatomeen durch die Aussendung

von Verbindungen erfolgreich auf chemischem Wege verteidigen können. Dazu zählen beispielsweise Abwehrreaktionen gegen Fraßfeinde^[30,31] oder Bakterien.^[18,29]

Ein Genus der Kieselalgen, der in dieser Arbeit verstärkt betrachtet wird, ist *Coscinodiscus*, dessen Vertreter vor allem in Küstennähe kalter Gewässer der nördlichen Hemisphäre zu finden sind und damit auch in Deutschland.^[32] Sie treten aber auch in anderen Teilen der Welt auf und können sich an verschiedene Temperaturen und Salzgehalte im Wasser anpassen.^[33,34]

1.3 Biologische Stressoren

Es gibt verschiedene Umweltfaktoren, die die Ausprägung von Phytoplanktonpopulationen beeinflussen und den Beginn und das Ende ihres Auftretens festlegen können. Einerseits sind dies abiotische Einflüsse, wie zum Beispiel die Temperatur oder das Licht, aber auch andere Faktoren wie das Nährstoffangebot.

Dem gegenüber stehen verschiedene äußere Stressoren, die auf lebenden Organismen beruhen und als biotischen Stressoren bezeichnet werden. Zu ihnen gehören zum Beispiel infektiöse Pathogene oder Predatoren (Fraßfeinde). Epidemien mit Pathogenen und Predatoren können Diatomeenpopulationen signifikant beeinflussen und sind dadurch ein entscheidender Faktor für die Ausprägung und Dynamik von Phytoplanktonblüten. Damit wird durch diese biotischen Stressoren Einfluss auf das Fundament des marinen Nahrungsnetzes genommen, wodurch in der Folge auch viele andere Lebewesen höherer trophischer Stufen betroffen sind.^[35–37]

Marines Phytoplankton kann, ähnlich wie terrestrische Pflanzen auch, von Pathogenen infiziert werden. Neben verschiedenen Pilz- und Bakterienarten^[18,38] kann es sich bei diesen zum Beispiel auch um den Oomyceten *Lagenisma coscinodisci* handeln.^[39] *L. coscinodisci* ist ein obligater Parasitoid und damit nicht fähig, sich ohne einen Wirt fortzupflanzen oder zu überleben. Als Parasitoiden unterscheiden sie sich von normalen Parasiten vor allem darin, dass der Wirt zum Ende des Infektionszyklus stets getötet wird.^[40] Eine Infektion mit *L. coscinodisci* erfolgt bevorzugt in dem Phytoplanktongenus *Coscinodiscus*. Er tritt in der Natur auch in den gleichen Lebensräumen wie *Coscinodiscus*-Arten auf.^[39]

Die Oomyceten, oder auch Eipilze, sind Ergebnis einer konvergenten Evolution mit den Echten Pilzen (Eumycota), bilden aber ein von den Eumycota unabhängiges Taxon.^[41] Tatsächlich teilen sich beide Gruppen auch einige Eigenschaften, jedoch werden Oomyceten phylogenetisch den Stramenopila (bzw. Straminipila) zugeordnet und damit eher in den Verwandtenkreis der Diatomeen, die auch zur Gruppe der Stramenopila gehören.^[42,43] Oomyceten kommen ubiquitär vor, können also in verschiedensten terrestrischen und marinen Ökosystemen angetroffen werden und gehören dadurch zu den erfolgreichsten Vertretern der Eukaryoten.^[42,43]

Eine Infektion mit dem Parasitoid erfolgt dabei nach einem charakteristischen Kreisprozess (Abbildung 3). Eine freilebende und begeißelte Zoospore lagert sich zunächst an der Wirtszelle an. Nach der Penetration bildet sich intrazellulär ein Thallus mit Hyphen. Dieser entwickelt sich im Laufe der Infektion zu einem Sporangium, das über ein Röhrensystem neue Zoosporen aus der Zelle abgibt. Diese können sich wieder frei bewegen, lagern sich an eine neue Wirtszelle an und der Kreislauf beginnt von Neuem.^[32]

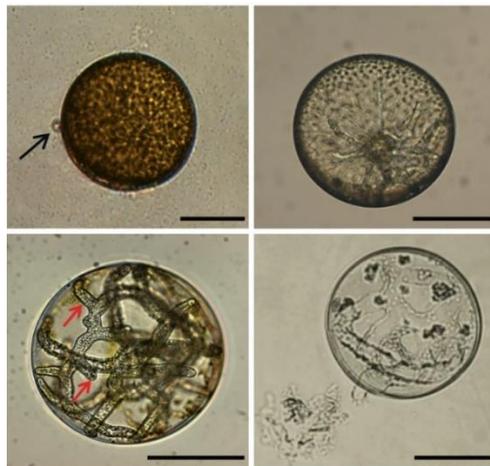


Abbildung 3: Ablauf der Infektion einer *Coscinodiscus*-Zelle mit dem Parasitoiden *L. coscinodisci*. Zunächst lagert sich eine frei schwimmende Zoospore an die Wirtszelle an (links oben), dann bildet sich intrazellulär ein Thallus mit Hyphen (rechts oben). Aus dem Thallus bildet sich das Sporangium mit Röhrensystem (links unten), das Zoosporen in die Umgebung abgibt. Zum Schluss verbleibt die leere, tote Zelle (rechts unten); Maßstab 20 μm ; Abbildung übernommen aus Vallet et al.^[32]

Während der Parasitoid sich innerhalb der Zelle entwickelt, ernährt er sich von dem lebenden Wirt. Dadurch dauert es bei einer Infektion von Vertretern des Genus *Coscinodiscus* ca. 2 Tage bis *L. coscinodisci* seinen Lebenszyklus vollendet hat und die Wirtszelle schließlich abstirbt. Vallet et al. haben darüber hinaus beobachten

können, dass der Parasitoid während dieser Zeit den Stoffwechsel des Wirts manipulieren kann, wodurch die Infektiosität ansteigt.^[32]

Die Anfälligkeit für eine Infektion mit *L. coscinodisci* unterscheidet sich von Art zu Art sehr stark. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Hannah Busch konnte beispielsweise herausgefunden werden, dass es sich bei der Spezies *Coscinodiscus granii* um eine stark anfällige Art handelt, während *Coscinodiscus wailesii* und *Coscinodiscus radiatus* gegenüber einer Infektion mit *L. coscinodisci* resistent sind.^[44]

Auf der anderen Seite nehmen auch Predatoren durch den Fraß der Mikroalgen (auch Weiden, bzw. „Grazing“ genannt) Einfluss auf Populationen von Phytoplankton. Die größten Gruppen der Predatoren bilden dabei das Mikro- und Mesozooplankton. Letztere besteht basierend auf der Zahl an Individuen zum größten Teil aus den Copepoden (Ruderfußkrebse), die zu den *Crustacea* (Krebstiere) gezählt werden und zu den wichtigsten marinen Primärkonsumenten zählen.^[45,46] Sie sind damit ein entscheidendes Bindeglied im marinen Nahrungsnetz zwischen den Mikroalgen und Lebewesen höherer Trophiestufen, wie etwa den Fischen. In den 1990er Jahren konnten erstmals Effekte der Diatomeen auf den Fortpflanzungserfolg von Copepoden entdeckt werden und stießen in diesem Zusammenhang Forschungen zur Verteidigung von Diatomeen gegen diese Predatoren an.^[47–49]

1.4 Verteidigungsmechanismen von Phytoplankton

Durch das lokale Zusammenleben der Systeme Phytoplankton-Parasitoid und Phytoplankton-Predator kann es im Laufe der Evolution zu einem wechselseitigen biologischen Wettrüsten zwischen den Organismen kommen. Diese Art der Co-Evolution ist Gegenstand aktueller Forschung und könnte ein plausibler Grund für die Entwicklung von Verteidigungsmechanismen auf beiden Seiten sein.^[50–52]

So zeigen einerseits verschiedene Pathogenarten die Fähigkeit, Metabolite, die von den Algen abgegeben werden, zu erkennen. Dadurch werden sie gezielt von potenziellen Wirten angezogen und steigern so ihren Infektionserfolg. Dieser als Chemotaxis bezeichneter Prozess konnte schon für die Infektion von Dinoflagellaten- und Diatomeenspezies beobachtet werden.^[53,54]

Auf der anderen Seite sind die Mikroalgen dazu fähig, sich gegen Stressoren von außen zu verteidigen. Dies kann beispielsweise auf chemischem Wege, durch die Produktion bestimmter Verbindungen erfolgen. Dafür gibt es mit der konstitutiven, induzierten und aktivierten Verteidigung drei Mechanismen, die eine wichtige Rolle in der chemischen Abwehr spielen. Während bei der konstitutiven Verteidigung die aktiven Verbindungen dauerhaft gespeichert werden, werden bei der induzierten und aktivierten Verteidigung weniger reaktive Verbindungen gelagert, die erst bei Vorliegen einer Gefahrensituation in die eigentlichen Abwehrmetaboliten umgewandelt werden.

Die induzierte Verteidigung tritt häufig bei Wechselwirkungen zwischen Phytoplankton und Parasit auf und erfolgt rezeptorvermittelt. Dadurch werden nach der Erkennung von Pathogenen entsprechende Gene in der Mikroalge verstärkt exprimiert, was schließlich auch zu einer Hochregulation von zugehörigen Verteidigungsverbindungen führt.^[18,55] Dabei handelt es sich jedoch um einen zeitintensiven Mechanismus, der bis zu wenige Tagen dauern kann. Meyer et al. haben zum Beispiel herausgefunden, dass die Erkennung der Bakterienart *Kordia algicida* in der resistenten Diatomeenspezies *Chaetoceros didymus* eine erhöhte Produktion von C₂₀-Oxylipinen induziert.^[18] Long et al. zeigten darüber hinaus vor Kurzem, dass in das umgebende Medium freigesetzte Metabolite von Vertretern der *Dinophyceae* die frei lebende Form von Parasiten des Genus *Amoebophrya* sp. töten können.^[56]

Die aktivierte Verteidigung findet meist bei Zellbeschädigung statt, zum Beispiel wenn die Mikroalgen durch Predatoren gefressen werden. Dabei werden während einer Algenblüte und dem Auftauchen und beginnendem Fraß durch beispielsweise Copepoden einige Zellen der Population geopfert, die bei Zerfall durch freiwerdende Lipide aus der Zellmembran und den Chloroplasten polyungesättigte freie Fettsäuren und deren Oxidationsprodukte, die Oxylipine, bilden können. Diese werden wiederum durch Enzyme zu den polyungesättigten Aldehyden umgesetzt (siehe auch Kapitel 1.5) und stören den Fortpflanzungserfolg der Copepoden. Damit würde zwar ein kleiner Teil der Zellen geopfert, die restliche Algenpopulation jedoch geschützt.^[57] Es erfolgt hierbei keine permanente Speicherung der Metabolite, sondern eine enzymvermittelte, innerhalb von Sekunden stattfindende, lokale Aufkonzentration der Verbindungen.^[17,57]

Der große Vorteil der induzierten und aktivierten Verteidigung ist einerseits eine signifikante Energieersparnis im Vergleich zur konstitutiven Verteidigung. So wird die entsprechende Abwehrkaskade nur aktiviert wenn auch eine gewisse Notwendigkeit dafür vorliegt. Es werden also nicht durchgehend Energieressourcen verbraucht, um die Verteidigungsstoffe zu speichern, wodurch sie für andere Prozesse, wie das Zellwachstum, verwendet werden können. Auch das Risiko einer Autointoxikation wird dadurch minimiert.^[57–59]

Ferner hat sich auch gezeigt, dass manche Arten von Mikroalgen, wie beispielsweise der Dinoflagellat *Alexandrium fundyense*, nicht nur auf eine direkte Anwesenheit des Pathogens *Amoebophrya* sp., sondern auch schon bei dem Auftreten chemischer Signale im umgebenen Wasser durch eine verstärkte Expression bestimmter Gene reagieren können. Dadurch können die Algen eine Art Vorwarnstufe erreichen, die sie vor einer nahenden Infektion besser schützen können.^[60]

Neben der Chemischen Verteidigung gibt es auch andere Möglichkeiten, wie sich Phytoplankton zur Wehr setzen kann. Eine Möglichkeit beruht auf morphologischen Änderungen der Zellen. So können Grünalgen des Genus *Micractinium* zum Schutz gegen Rädertierchen fraßinduziert Borsten ausbilden^[61] oder Mitglieder der Diatomeenfamilie *Bacillariophyceae* ihre Zellwand durch eine erhöhte Einlagerung von Silikat verdicken („Silification“), sobald Vertreter von ihnen gefressen werden.^[62]

Auch Veränderungen der Koloniestrukturen können als Reaktion von Phytoplankton auf chemische Hinweise von Fressfeinden auftreten. Diese Änderungen können abhängig von der Art des biologischen Feinds sein, wie im Falle von *Phaeocystis globosa*. Die Algenart organisiert sich, je nachdem ob Ruderfußkrebse oder Wimpertierchen als äußere Gefahr auftreten, entweder verstärkt als vereinzelte Zellen oder in größeren Kolonien.^[55] Selander et al. konnten zudem Chemikalien nachweisen, die von Copepoden freigesetzt werden und in Mikroalgen neben einer erhöhten Toxinproduktion Veränderungen in der Koloniestruktur hin zu kleineren Gemeinschaften und Zellketten induziert haben. Diese Verbindungen werden auch Copepodamide genannt und sind sehr polare Vertreter der Lipide. Sie konnten sowohl im Labor als auch im Feld in Algenblüten nachgewiesen werden.^[63]

1.5 PUFAs und Oxylipine in Diatomeen

Lipide umfassen eine große Gruppe verschiedener Verbindungen des Fettstoffwechsels. Wichtige Vertreter, die zu ihnen gezählt werden, sind die Oxylipine und deren Precursor, die polyungesättigten freien Fettsäuren (PUFAs). Erstere umfassen eine Gruppe von Stoffen, die sowohl bei Tieren, aber auch bei terrestrischen Pflanzen, Pilzen und marinen Mikroalgen auftreten können. Sie spielen in der Welt des Phytoplanktons eine wichtige Rolle als Infochemikalien und als Verteidigungsmetabolite ^[13,64] und können dadurch den Verlauf ganzer Algenblüten entscheidend beeinflussen. Darüber hinaus bietet diese Verbindungsklasse viele Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie und Medizin. So zeigen sie beispielsweise über die Aktivierung von Apoptose bei Tumorzellen ein hohes Potential in der Krebsforschung.^[16] Innerhalb des Phytoplanktons ist überwiegend das Taxon der Diatomeen als Oxylipinproduzent bekannt.^[65,66]

Physiologisch handelt es sich bei den Oxylipinen um eine Gruppe von Sekundärmetaboliten, die als Abbauprodukte von polyungesättigten Fettsäuren (PUFAs) auftreten können. Diese entstehen bei Phytoplanktonzellen häufig im Laufe des Zerfalls von Zellen aus den freigesetzten Galactolipiden und Phospholipiden der Zellmembran^[65], können aber auch von intakten Zellen freigesetzt werden.^[18] Typische Vertreter dieser PUFAs sind solche mit einem C₂₂-, C₂₀- oder C₁₆-Stamm, wie zum Beispiel die Docosahexaensäure (DHA), Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und Hexadecatriensäure (HDTA). Sie können Ausgangsprodukte verschiedenster Oxylipine sein (Abbildung 4). Dementsprechend lässt das Auftreten und die Hochregulation von PUFAs tendenziell auch eine ähnliche Modulation bei den entsprechenden Oxylipinen vermuten.^[67]

Die freigesetzten Fettsäuren werden enzymvermittelt über eine Lipooxygenase (LOX) abgebaut. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation mittels molekularen Sauerstoffs an einem spezifischen Kohlenstoffatom der Fettsäurekette. Entsprechend dieser Position des C-Atoms erhält die LOX einen passenden Präfix, wie beispielsweise 15S-LOX. Das Auftreten dieser stereospezifischen Lipooxygenasen ist dabei auch immer abhängig von der untersuchten Spezies.^[68]

Durch den ersten Reaktionsschritt entstehen aus den PUFAs reaktive Hydroperoxide, die durch verschiedenste Enzyme weiter umgesetzt werden können.^[69] Dazu gehören neben den Hydroperoxidlyasen auch mehrere weitere Enzyme, wie zum Beispiel Reduktasen oder Synthasen, die Reaktionen zu Hydroxy- und/oder Hydroxyepoxy-Fettsäuren katalysieren können (Abbildung 4).^[70] Bekannte Vertreter sind hier HETE und HEPE, die hydroxilierten Produkte von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure.

Neben diesen langkettigen, nicht volatilen Oxylipinen, können auch leichtflüchtige kurzkettigere entstehen. Zu ihnen gehören die polyungesättigten Aldehyde (PUAs), deren Funktion als chemische Verteidigungsmetaboliten in Diatomeen und ihre reproduktionstoxische Wirkung auf Fraßfeinde, wie den Copepoden, bereits erforscht wurde.^[16,17] Auch bei anderen wirbellosen Meeresbewohnern konnten toxische Effekte der PUAs festgestellt werden.^[71,72] Casotti et al. zeigten zudem, dass PUAs auch toxisch gegenüber den Diatomeen selbst sind und ihr Zellwachstum hemmen können.^[14] Damit können sie als Infochemikalien in der Regulation von Algenpopulationen eine wichtige Rolle spielen.^[64] Dem Aldehyd Decadienal wird in diesem Kontext eine Funktion zugesprochen.^[13] Nach Vardi et al. kann durch die Exposition mit Decadienal und eine darauf folgende Hochregulation von Stickstoffmonoxid in Diatomeenzellen den Zelltod initiieren. Damit könnten PUAs einen großen Anteil am Verlauf und dem Ende von Diatomenblüten haben.^[13]

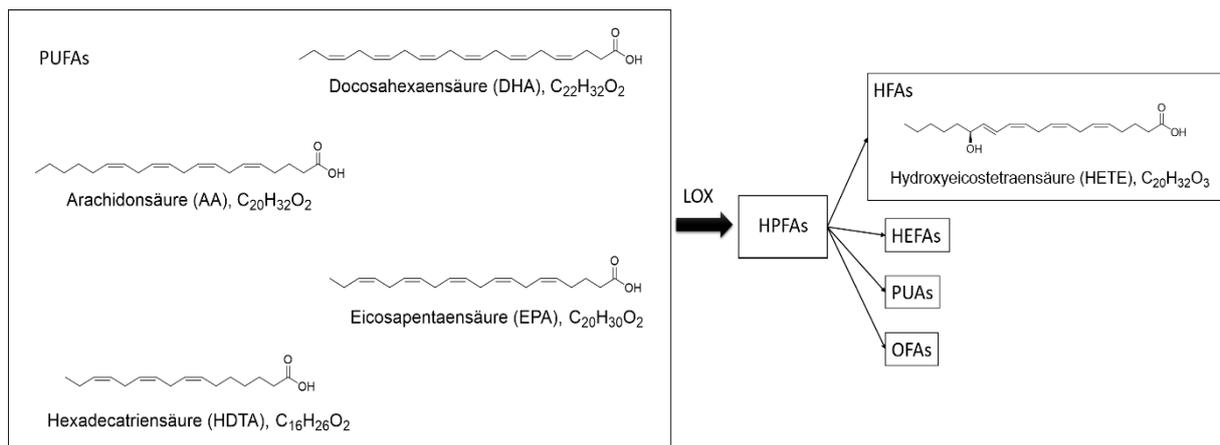


Abbildung 4: Reaktionsschema der Fettsäureoxidation; Freie polyungesättigte Fettsäuren (PUFAs) dienen als Precursor für die Lipoxygenase (LOX)-vermittelte Umsetzung zu Hydroperoxyfettsäuren (HPFAs); HPFAs werden durch verschiedenste Enzyme unter anderem zu Hydroxyfettsäuren (HFAs, z.B. HETE), Hydroxyepoxyfettsäuren (HEFAs), polyungesättigten Aldehyden (PUAs) und Oxofettsäuren (OFAs) umgesetzt.^[68-70,73,74]

1.6 Metabolomics

Der allgemeine Ablauf in einer metabolomischen Studie folgt einem charakteristischen Weg. Biologische Proben (z.B. Kulturen einer Pflanzenart) werden zunächst einem Experiment unterzogen (z.B. einer Verwundung, einer Exposition mit Bakterien oder Pathogenen). Im Rahmen dessen wird das Metabolom, also die Gesamtheit jeglicher Metabolite des Organismus^[75], je nach Forschungsfrage nach einem passendem Protokoll aus der Probe extrahiert und mit Hilfe instrumenteller Analytik (z.B. chromatographiegekoppelte Massenspektrometrie, Kernspinresonanzspektroskopie, seltener auch Infrarotspektroskopie) ermittelt.^[76] Die erhaltenen Daten werden danach prozessiert (Gruppierung und Entfaltung von Peaks, Abgleich mit Datenbanken, Normalisierungen, etc.) und schließlich mit Hilfe statistischer Methoden (t-Test, PCA, ANOVA, etc.) ausgewertet und präsentiert (Abbildung 5).^[76,77] Das Ziel der Datenauswertung ist es dabei, Unterschiede in Features bzw. Metaboliten und deren Konzentrationen in einer behandelten Probe relativ zu einer Kontrolle zu entdecken und damit Rückschlüsse auf eine metabolische Antwort auf das Experiment (die Verwundung oder Exposition, etc.) schließen zu können.

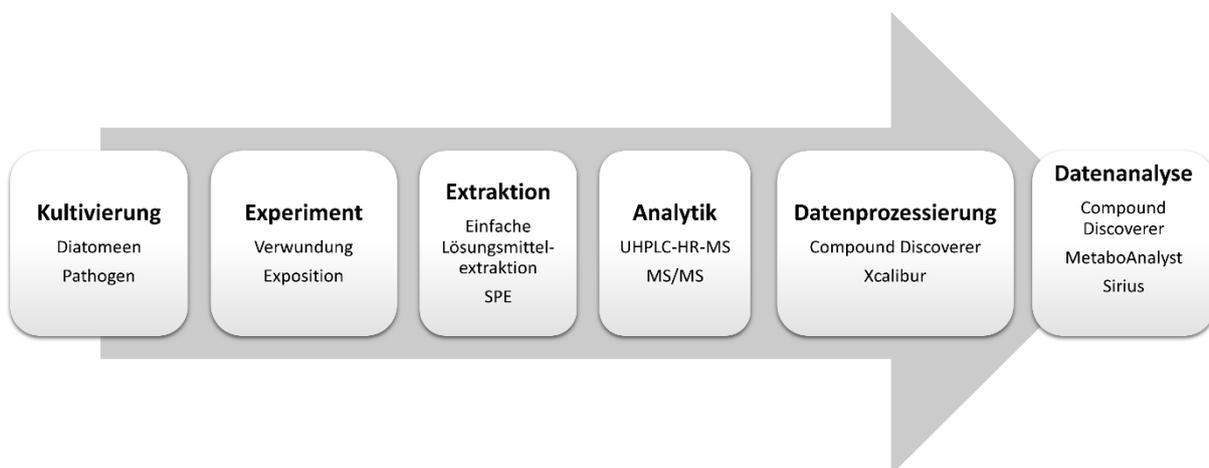


Abbildung 5: Metabolomischer Workflow mit Bezug auf diese Masterarbeit

Dabei kann entweder die Untargeted Analysis im Fokus stehen oder eine Targeted Analysis. Bei Ersterer werden die Daten auf die statistisch signifikantesten Metabolite, die für ein untersuchtes Phänomen verantwortlich sein könnten immer weiter eingegrenzt, um so die wichtigsten Verbindungen aufzuspüren. Bei der Targeted Analysis werden im Vorhinein festgelegte Verbindungen (oder Verbindungsgruppen) gezielt gesucht und ihr Einfluss auf das Metabolom untersucht.

Um einordnen zu können, ob und welche Rolle Metaboliten in einer Verteidigungsreaktion der Algen spielen, ist es wichtig, zu sehen, ob sie durch den Einfluss eines äußeren Stressors relativ zu einer Kontrollprobe hoch- oder herunterreguliert werden. Da die Anzahl an Metaboliten und damit auch die Anzahl an Variablen in biologischen Systemen aber sehr hoch sein kann, muss ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Hoch-/Runterregulation nicht um statistische oder zufällige Phänomene handelt. Um dieses Problem anzugehen, werden die Daten unter anderem einem Hypothesentest unterzogen. Die Nullhypothese sagt dabei aus, dass sich beide Gruppen (die behandelte oder Expositionsgruppe und die Kontrollgruppe) nicht unterscheiden. Um einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erhalten, muss sie folglich abgelehnt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt und damit ein falsch positives Ergebnis am Ende vorliegt, wird durch den p-Wert beschrieben. In der Literatur wird meistens ein Schwellenwert von 0.05 für den p-Wert angegeben, den er nicht überschreiten sollte. Liegt er unterhalb dieses Wertes, wird die Nullhypothese für einen Metaboliten erfolgreich abgelehnt und die Änderung zwischen den zwei Gruppen kann als signifikant angesehen werden.^[78]

Ein typischer Hypothesentest ist der t-Test. Er wird angewendet um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wie zum Beispiel eine unbehandelte Kontrollgruppe und eine behandelte Testgruppe. Unter der Annahme, dass die Varianzen in beiden Gruppen gleich groß sind, wird die Differenz der Mittelwerte aus den jeweiligen Messungen beider Gruppen gebildet und auf die Standardabweichung dieser Differenz bezogen.^[79] Sind die Varianzen in den Gruppen nicht gleich groß, kann der t-Test nach Welch angewandt werden.^[80] Um mehr als zwei untersuchte Gruppen vergleichen zu können (z.B. Testgruppe 1, Testgruppe 2 und Kontrolle), kann zudem eine Analyse der Varianzen (ANOVA) durchgeführt werden. Sie sagt unter Angabe eines p-Schwellenwertes aus, ob es innerhalb zweier dieser Gruppen eine signifikante Veränderung gibt. Um herauszufinden, welche Gruppen dies sind, muss ein Post-hoc-Test durchgeführt werden. Zudem kann mittels der Differentialanalyse ein Volcano-Plot erstellt werden. Er zeigt alle gefundenen Features in Abhängigkeit der (negativen) logarithmierten Werte von p und des fold change. Letzterer ist das Verhältnis der Mittelwerte zweier zu vergleichender Gruppen jedoch ohne Miteinbezug der Standardabweichung (siehe t-Test). Der Volcano-Plot bietet die Möglichkeit alle

Features zu überblicken, die innerhalb eines statistischen Signifikanzfensters (vorgegeben durch Schwellenwerte für den logarithmierten fold change und den p-Wert) in einer Gruppe relativ zur anderen Gruppe hoch- oder herunterreguliert werden.^[79,81]

Die Hauptkomponentenanalyse ist ein Mittel der multivariaten Statistik und bietet bei sehr großen Datenmengen mit vielen Variablen (Features) die Möglichkeit, durch Linearkombination der Variablen die Dimensionalität auf zwei oder drei wichtige, sogenannte Hauptkomponenten (Principal Components) zu kürzen.^[82] So können in zwei Dimensionen Unterschiede in den Varianzen zwischen verschiedenen Gruppen dargestellt werden.^[83,84] Es bilden sich im Idealfall Cluster mit Probenmessungen (z.B. der Testgruppe), die Ähnlichkeiten besitzen und von anderen Probenclustern (z.B. der Kontrollgruppe) unterschieden werden können.

Mit Hilfe eines metabolomischen Ansatzes konnten einige wichtige Arbeiten entwickelt werden, darunter auch die Entdeckung des ersten Pheromons der Diatomeen, das im Rahmen der sexuellen Fortpflanzung freigesetzt wird^[26] oder auch die Abhängigkeit des Metaboloms der Diatomeenart *Skeletonema marinoi* von ihrer Wachstumsphase.^[85] Darüber hinaus gab es auch wichtige Untersuchungen zur Allelopathie und den Einfluss von chemischen Signalmolekülen auf den Wettkampf zwischen Phytoplanktonarten, worin ein Grund für die Bildung schädlicher Algenblüten liegen könnte.^[86] Auch die Entdeckung von Vallet et al., dass der Wertsstoffwechsel von *C. granii* durch den Parasiten *L. coscinodisci* zur Erhöhung des eigenen Infektionserfolgs ausgenutzt wird, beruht auf einem metabolomischen Versuchsansatz.^[32]

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und welche Lipide im Zuge der Interaktion zwischen Diatomeen und biologischen Stressoren in den Algen produziert und abgegeben werden. Als biologische Stressoren sollen dabei einerseits der Parasitoid *Lagenisma coscinodisci* und andererseits Predatoren, wie beispielsweise die Copepoden, eingeführt werden, deren Fraßaktivität über mechanische Verwundung simuliert werden soll. Als Vertreter der Diatomeen wird der Genus *Coscinodiscus* dienen, innerhalb dessen die drei Spezies *Coscinodiscus granii*, *Coscinodiscus radiatus* und *Coscinodiscus wailesii* ausgewählt werden. Alle verwendeten Arten treten in der Natur in überschneidenden Gebieten gemeinsam auf.

Es werden als Grundlage dieser Arbeit mehrere Hypothesen aufgestellt, die auf drei metabolomische Experimente kondensiert werden. Weil Diatomeen, wie beispielsweise *C. granii* Lipide und Oxylipine verwundungsaktiviert gegen Bakterien und Fraßfeinde einsetzen können^[17,18,20], wird zunächst die Hypothese aufgestellt, dass sie auch bei der Exposition mit dem parasitoiden Oomyceten *L. coscinodisci* produziert werden, diese Produktion aber von der untersuchten Spezies abhängig ist. Eine weitere Hypothese ist, dass Unterschiede in der Lipidregulation zwischen der für *L. coscinodisci* anfälligen Art *C. granii* und den resistenten Spezies *C. radiatus* und *C. wailesii* zu sehen sind. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Stämme aller drei Diatomeenarten, die hier untersucht werden, verwundungsaktiviert Lipide und Oxylipine produzieren können, die genauen Veränderungen im Metabolom aber von der Spezies abhängen. Im Falle von *C. granii* wurde dies schon von Rettner et al.^[67] beobachtet, jedoch wurden die Zellen von einer Algenblüte eines anderen Jahres von der Insel Helgoland isoliert (2016). Für *C. wailesii* und *C. radiatus* sind noch keine Veröffentlichungen dazu bekannt.

Im Zuge einer Targeted Analysis wird gezielt nach vier Lipiden gesucht. Die Verbindungen Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und Hexadecatriensäure dienen dabei als repräsentative Vertreter der PUFAs, die in der Biosynthese von Oxylipinen als Precursor auftreten und Hydroxy-Arachidonsäure als Vertreter der Oxylipine selbst. Zudem wird der Ansatz der Untargeted Analysis verfolgt. Auch hier wird der Fokus stets auf Lipide gelegt.

Um den Einfluss von biologischen Stressoren im Labormaßstab zu untersuchen, werden insgesamt drei unabhängige metabolomische Experimente durchgeführt:

Experiment 1: Untersuchung der Modulation von polyungesättigten freien Fettsäuren in der Diatomeenspezies *Coscinodiscus granii* durch kurzzeitige Exposition mit dem parasitoiden Oomyceten *Lagenisma coscinodisci*. Die Exposition erfolgt über direkten Kontakt und in Abgrenzung zu anderen Arbeiten^[18,44] nur über einen Zeitraum von 30 Minuten. Üblicherweise wird die pathogeninduzierte Produktion von Oxylipinen und Verteidigungsmetaboliten erst nach etwa vier bis neun Tagen untersucht^[18,44], es soll hier aber bewusst der Frage nachgegangen werden, ob auch schon nach einem kurzen Zeitraum eine signifikante Modulation vorliegt.

Experiment 2: Untersuchung der verwundungsaktivierten Modulation von polyungesättigten freien Fettsäuren und Oxylipinen in den Diatomeenspezies *Coscinodiscus granii*, *Coscinodiscus radiatus* und *Coscinodiscus wailesii*. Es werden hierfür zwei verschiedene Extraktionsmethoden vorgestellt, um den Einfluss der Extraktion auf die am Ende gewonnenen Ergebnisse zu beleuchten. Methode A beruht dabei auf der Veröffentlichung von Jagusch et al.^[87], Methode B ist selbst entwickelt. Zudem wird über eine Untargeted Analysis nach weiteren Verbindungen gesucht, die möglicherweise zur Gruppe der Lipide oder Oxylipine gehören.

Experiment 3: Untersuchung der Modulation von polyungesättigten freien Fettsäuren in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* durch eintägige Exposition mit *L. coscinodisci*. Es soll eine mögliche Induktion von Metaboliten durch den Kontakt mit dem Pathogen und unterschiedliche Reaktionen im Metabolom der zwei resistenten Diatomeenarten *C. radiatus* und *C. wailesii* und der anfälligen Art *C. granii* untersucht werden. Auch hier wurde noch eine Untargeted Analysis durchgeführt, um andere möglicherweise vielversprechende Metaboliten zu finden.

2 Methoden und Materialien

2.1 Kultivierung

Die Isolation aller Mikroalgenspezies und des Parasitoiden erfolgte zur gleichen Zeit im November 2019 auf der deutschen Nordseeinsel Helgoland mit Hilfe von Planktonnetzen. Für die Kultivierung wurde als Nährmedium eine Mischung aus 1 l Meerwasser vor Helgoland mit einem Salzgehalt von 35 g/l, sowie einem silikatreichen F2-Nährmedium (F2++; F/2 G9903, Sigma Aldrich + 1 ml Natriummetasilikatlösung (30g/L), Silikatkonzentration = 37,7 mg/L) verwendet. Die Kulturen wurden in Plastikkulturflaschen (Sarstedt AG & Co. KG) bei 14 Stunden Belichtung pro Tag und einer Photonenflussdichte von $100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ in einer Kulturkammer gelagert. Die Temperaturen wurden tagsüber auf 16°C und nachts auf 12°C eingestellt. Der Parasitoid *Lagenisma coscinodisci* wurde in der infektionsanfälligen Spezies *C. granii* kultiviert, indem im späten Infektionsstadium jede Woche eine kleine Zahl infizierter Zellen in eine gesunde (nicht infizierte) Kultur überführt wurden.

2.2 Extraktion

2.2.1 Experiment 1: Modulation von PUFAs in *C. granii* durch dreißigminütige Exposition mit *L. coscinodisci*

Im ersten Experiment wurde eine Kultur der Mikroalge *Coscinodiscus granii* (Cos 20, RCC 7046, in f2++, Alter: 17 Tage) mit dem Pathogen *Lagenisma coscinodisci* (Lag19, angesetzt in *C. granii*, Alter: 17 Tage) für eine Dauer von dreißig Minuten direkt in Kontakt gebracht.

Eine Mischung von 100 ml Algenkultur und 100 ml Parasitoidenkultur (Expositionskultur), 200 ml der blanken Kulturen (Kontrollkultur), 200 ml Medium blank sowie 200 ml der blanken Parasitoidenkultur wurden angesetzt. Nachdem die Expositionskultur für 30 Minuten in direkten Kontakt mit dem Parasitoiden inkubiert wurde, wurden alle Kulturen jeweils in 4 große 50 ml Falcon Tubes (Starlab International GmbH) überführt und zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C). Die Exudate wurden in neue Falcon Tubes überführt und mittels SPE aufgereinigt. Dafür wurden 20 cc Kartuschen (Sep-Pak ®Vac 20cc (5g) C18, Waters, Milford, USA) verwendet.

Sie wurden zunächst mit 10 ml Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) und 10 ml H₂O (Fisher Scientific, UHPLC grade) gewaschen und im Anschluss mit der Probenlösung beladen. Es wurde erneut mit 10 ml H₂O und 10 ml Hexan (95 %, HPLC grade, ITW Reagents) gewaschen und mit 8 ml Methylformiat (98%, Acros Organics) eluiert. Die Eluate wurden in Schraubdeckelgläsern (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®) aufgefangen und über Nacht bei - 20°C gelagert. Zu den Zellrückständen wurde 1 ml eisgekühlter Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) zugegeben und anschließend in 2 ml Safe-Lock Eppendorf Tubes überführt. Es wurde im Ultraschallbad (Sonorex RK, Bandelin) für 10 Min lysiert und danach zentrifugiert (30 Min., 10 000 rpm, 4°C) und die Überstände in Schraubdeckelgläser überführt.

Alle Lösungen in den Schraubdeckelgläsern (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®) wurden über 1,5 Stunden in einem TurboVap (Biotage, Schweden) unter Einströmen von N₂ getrocknet, in 200 µl einer Lösung von MeOH/H₂O (1:1) aufgenommen, zentrifugiert (10 Min, 12 000 rpm, 25°C) und alle Überstände zur Messung in LC-vials (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®, mit Messeinsatz und Feder) gegeben.

2.2.2 Experiment 2: Verwundungsaktivierte PUFA- und Oxylipin-Modulation in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. walesii*

Im zweiten Experiment sollte die Reaktion der drei Algenarten *Coscinodiscus granii*, *Coscinodiscus radiatus* und *Coscinodiscus walesii* unter Weidebedingungen („Grazing“) untersucht werden. Es wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden angewandt.

Methode A

Methode A erfolgte auf Basis von Jagusch et al.^[87] mit leichten Änderungen. So wurden 400 ml der jeweiligen Kulturen (*C. granii* Cos 20, RCC 7046, in f2++, Alter: 8 Tage; *C. radiatus* Cos 43, RCC 7041, in f2++, Alter: 11 Tage; *C. walesii* Cos 5, RCC 7042, in f2++, Alter: 10 Tage) über ein Zellsieb (40 µm Porengröße, Corning, USA) aufkonzentriert, in ein 15 ml Falcon Tube (Corning, Mexico) überführt und anschließend zentrifugiert (10°C, 1500 rpm, 15 Min.). Der Überstand wurde bis auf ca. 2 ml entfernt, der Rückstand darin resuspendiert und auf drei 1,5 ml Safe-Lock

Eppendorf Tubes aufgeteilt, sodass eine Kontrolle, eine Verwundungsprobe und eine Probe mit dem Medium erhalten wurde. Es wurde im Verhältnis 1/2 v/v eisgekühlter Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) zu allen Proben gegeben und die Tubes der Verwundungsprobe und des Mediums bei Raumtemperatur im Ultraschalbad für 15 Min. verwundet. Nach der Lyse wurde erneut zentrifugiert (10°C, 3000 rpm, 15 Min.) und zu den Überständen PBS-HCl (50 ml PBS pH 7,4 und 0,4 ml 1N HCL) bis zu einem pH von 3 zugegeben um die Enzymreaktionen zu stoppen (Quenchen). Schließlich wurden die Überstände mittels SPE extrahiert. Dazu wurden 1cc Kartuschen (Isolute™ 1cc (100mg) C18, Biotage, Uppsala, Schweden) verwendet. Diese wurden mit 3 ml Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) und 3 ml H₂O (Fisher Scientific, UHPLC grade) gewaschen und dann mit den Proben beladen. Schließlich wurde nochmals mit 3 ml H₂O und 3 ml Hexan (95 %, HPLC grade, ITW Reagents) gewaschen und mit 4 ml Methylformiat (98%, Acros Organics) eluiert. Die Eluate wurden in Schraubdeckelgläsern (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®) aufgefangen. Abschließend wurden sie über 1,5 Stunden in einem TurboVap (Biotage, Schweden) unter einem N₂-Strom getrocknet, in 200 µl einer Lösung von MeOH/H₂O (1:1) aufgenommen, zentrifugiert (10 Min, 12 000 rpm, 25°C) und alle Überstände zur Messung in LC-vials (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®, mit Messeinsatz und Feder) gegeben.

Methode B

Die Zellen von 400 ml Kultur (*C. granii* Cos 20, RCC 7046, in f2++, Alter: 15 Tage; *C. radiatus* Cos 43, RCC 7041, in f2++, Alter: 12 Tage; *C. wailesii* Cos 5, RCC 7042, in f2++, Alter: 11 Tage) wurden über ein Zellsieb (40 µm Porengröße, Corning, USA) aufkonzentriert und jeweils in ein 15 ml Falcon Tube (Corning, Mexico) gegeben, sodass eine Kontrolle, eine Verwundungsprobe und eine Probe mit Medium erhalten wurde. Das Medium, sowie die Verwundungsproben wurden im Anschluss für 10 Minuten im Ultraschalbad verwundet. Anschließend wurde mittels 0,3 ml PBS-HCL (50 ml PBS + 0,4 ml HCL 1N) die Enzymaktivität gestoppt. Es wurde Zentrifugiert (10°C, 3000 rpm, 15 Min) und die Überstände in 15 ml Falcons dekantiert. Sie wurden anschließend via SPE extrahiert. Diese erfolgte analog zu Methode A und auch über 1cc Kartuschen (Isolute™ 1cc (100mg) C18, Biotage, Uppsala, Schweden). Die Eluate wurden in Schraubdeckelgläsern (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®) aufgefangen. Die Zellrückstände wurde in 1 ml eisgekühltem Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade)

aufgenommen, zentrifugiert (4°C, 12 000 rpm, 10 Min) und die Überstände in Schraubdeckelgläsern gegeben. Die Vorbereitung für die LCMS-Messung erfolgte analog zu Methode A.

2.2.3 Experiment 3: PUFA-Modulation in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* durch eintägige Exposition mit *L. coscinodisci*

Im dritten Experiment sollte untersucht werden ob durch eine Exposition über 24 Stunden die Produktion von PUFAs in den drei verschiedenen Diatomeenarten *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* induziert wird.

Zunächst wurden mehrere getrennt aufgezogene Kulturen für jeweils alle drei Algenarten (*C. granii* Cos 20, RCC 7046, in f2++, Alter: 3 Tage; *C. radiatus* Cos 43, RCC 7041, in f2++, Alter: 3 Tage; *C. wailesii* Cos 5, RCC 7042, in f2++, Alter: 3 Tage) und des Parasitoiden (Lag19, angesetzt in *C. granii*, Alter: 3 Tage) je in einer großen Kulturflasche vereinigt und homogenisiert, sodass für *C. granii*, *C. radiatus*, *C. wailesii* und *L. coscinodisci* jeweils eine volle Kulturflasche (Sarstedt AG & Co.KG) erhalten wurde. Aus diesen vier Flaschen mit je ca. 400 ml Kultur wurden sechs biologische Replikate angefertigt zur Erstellung von Expositionskulturen und drei Kontrollkulturen. Für die blanke Parasitoidenkultur und das Medium wurden nur drei Replikate angefertigt. Es wurden jeweils 5 ml der Algen mit 5 ml Seewasser (Kontrolle) bzw. mit 5 ml des Parasitoiden (Expositionskultur) in 6-well plates (Sarstedt AG & Co.KG) vermengt. Von den Blanks wurden je 10 ml auf die drei Replikate aufgeteilt.

Die Plates wurden über Nacht für eine Expositionsdauer von 24 h in der Kulturkammer gelagert. Am nächsten Tag wurden 2 ml aus jeder Probe aus den 6 well plates entnommen und über eine Zählkammer (SEDFWICK RAFTER CELL, S52, Pyser – SGI, Edenbridge, GB) die Zelldichte bestimmt. Dafür wurde je 1 ml in die Kammer gegeben und unter dem Mikroskop (VWR IsiScope, Italien) alle Zellen händisch gezählt. Die restlichen 8 ml der Proben wurden in 15 ml Falcon Tubes (Corning, USA) gefüllt und 4 ml eisgekühlter Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) zugegeben. Danach wurden Expositionskultur, Kontrollen und die Medien mittels Ultraschallbad (Sonorex RK, Bandelin) für 15 Min verwundet und mit 1,1 ml PBS-HCl (50 ml PBS pH 7,4 und 0,4 ml 1N HCL) die Enzymaktivität gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (4°C, 2000 rpm, 20 Min.) und die Exudate von den Zellen getrennt. Die Überstände

wurden mit einer SPE über 1cc Kartuschen (Isolute™ 1cc (100mg) C18, Biotage, Uppsala, Schweden) extrahiert. Dafür wurde zunächst mit 3 ml Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) und 3 ml H₂O (Fisher Scientific, UHPLC grade) gewaschen. Im Anschluss wurden die Kartuschen beladen, mit 3 ml H₂O und 1 ml Hexan (95 %, HPLC grade, ITW Reagents) erneut gewaschen und mit 4 ml Methoxyformiat (98%, Acros Organics) eluiert. Die Eluate wurden in Schraubdeckelgläsern aufgefangen. Die Zellen wurden in 1 ml eisgekühltem Methanol (Fisher Scientific, UHPLC grade) aufgenommen, über 15 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex RK, Bandelin) lysiert und zentrifugiert (4°C, 12 000 rpm, 20 Min.). Der Überstand wurde in Schraubdeckelgläsern (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®) aufgenommen und zum Schluss über 1,5 Stunden in einem TurboVap (Biotage, Schweden) unter N₂-Strom getrocknet. Die trockenen Rückstände wurden in 200 µl einer Lösung von MeOH/H₂O (1:1) aufgenommen, zentrifugiert (10 Min, 12 000 rpm, 25°C) und alle Überstände in LC-vials (1,5 ml, ND9, LABSOLUTE®, mit Messeinsatz und Feder) für die Messung gegeben.

2.3 Instrumentelle Analytik

Die Messungen erfolgten über ein UHPLC-HR-MS (Ultimate 3000 UHPLC Dionex), ausgestattet mit einer RP18-Säule (ACQUITY UPLC™ BEH SHIELD RP₁₈ 2,1 x 100 mm, 1.7 µm, Waters, USA) beziehungsweise einer C18-Säule (Accucore™ 2,1 x 100 mm, 2,6 µm, ThermoFischer Scientific™) und einem Q-Exactive Plus Ionenfallen-Massenspektrometer (ThermoFischer Scientific™) mit Orbitrap-Analysator. Detektiert wurde über einen Dioden Array Detector und injiziert mittel RS Autosampler.

Für die MS-Daten wurde zwei verschiedene Methoden angewandt. Die RP18-Methode orientierte sich an Jagusch et al.^[87] ist eine ddMS-Methode (data dependent method) im Bereich von 100.00 *m/z* bis 1000.00 *m/z* und wurde über eine Dauer von 16 Minuten angewandt. Die Ionisierung erfolgte über Elektronensprayionisation (ESI) bei einer Auflösung von 140 000 sowohl im positiven als auch negativen Modus. Die Flussrate betrug 0.3 ml pro Minute und das injizierte Probenvolumen 20 µl. Als Lösungsmittelsystem wurde eine wässrige Phase A (98% H₂O, 2% CH₃OH, 0,01% CH₃COOH) und eine methanolische Phase B (100 % CH₃OH, 0.01 % CH₃COOH) verwendet. Der Gradient betrug zunächst 40 – 85% von B in 12 Minuten, dann 98% B für 3 Minuten und wieder 40% B für 1 Minute.

Bei der C-18 Methode handelte es sich ebenfalls um eine ddMS-Methode, angelehnt an Vallet et al.^[32] im Bereich von 100.00 m/z bis 1500 m/z über eine Dauer von 14 Minuten. Als Ionisierung wurde ebenfalls ESI genutzt bei einer Auflösung von 280 000, sowohl im positiven als auch negativen Modus. Die Flussrate wurde in den ersten 9 Minuten langsam von 0.4 auf 0.7 ml pro Minute erhöht und danach wieder auf 0.4 ml pro Minute gesenkt. Das injizierte Probenvolumen betrug 20 μ l. Als Lösungsmittelsystem diente zu Beginn zu 100% eine wässrige Phase (98% H₂O, 2% CH₃CN, 0.1 % CH₃OOH), innerhalb der folgenden 9 Minuten wurde eine Acetonitrilphase (100% CH₃CN, 0.1 % CH₃OOH) bis zum Erreichen von 100% zugegeben. Anschließend wurde diese für 4 Minuten gehalten und wieder zur Wasserphase gewechselt, sowie für eine Minute equilibriert.

MSMS-Daten wurden über die PRM-Methode (parallel reaction monitoring) unter Vorgabe einer Inklusionsliste für die gezielte Analyse bestimmter Features erhalten. Sie wurde separat im positiven und negativen Modus durchgeführt. Es wurde eine Auflösung von 140 000 verwendet und Kollisionsenergien bei 15, 35 und 45 eV.

Für den Ausgleich matrixbedingter Signale bei der Messung wurde zudem auch stets ein Blank des Mediums simultan im Labor aufgearbeitet und vermessen, sowie zusätzlich noch ein Blank des Lösungsmittels, das für die Vorbereitung der LC-vials verwendet wurde, mitgemessen.

2.4 Datenprozessierung und -auswertung

Nach der Messung der Proben über ein UHPLC-HR-MS-System wurden die Rohdaten über die Software Compound DiscovererTM 3.2 von ThermoFisher ScientificTM prozessiert. Dafür wurden Peaks ab einem Intensitätsschwellenwert von $1 \cdot 10^6$ detektiert, entfaltet und gruppiert. Die MS-Daten wurden mit einer Abweichung von 5 ppm ausgewertet und mit entsprechenden Summenformeln annotiert. Die Toleranzgrenze für die Isotopendetektion und die relative Standardabweichung betrug jeweils 50 %. Wenn mit Qualitätskontrolle (QC) gemessen wurde, wurde eine Normalisierung anhand dieser QC, ohne Qualitätskontrolle eine Normalisierung über den Median angewandt. Die Features mit Summenformeln wurden anschließend mit den Datenbanken von BioCyc^[88], ChemSpider^[89], Natural product atlas^[90] und einer

lehrstuhlinternen Liste abgeglichen um mögliche bereits bekannte Verbindungen zu identifizieren. In BioCyc wurden dafür die Spezies *Arabidopsis col*, *Homo Sapiens*, *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1 und *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335 als Referenzen ausgewählt. Einen Überblick über den Ablauf der Prozessierung bietet der Workflow in Abbildung 6.

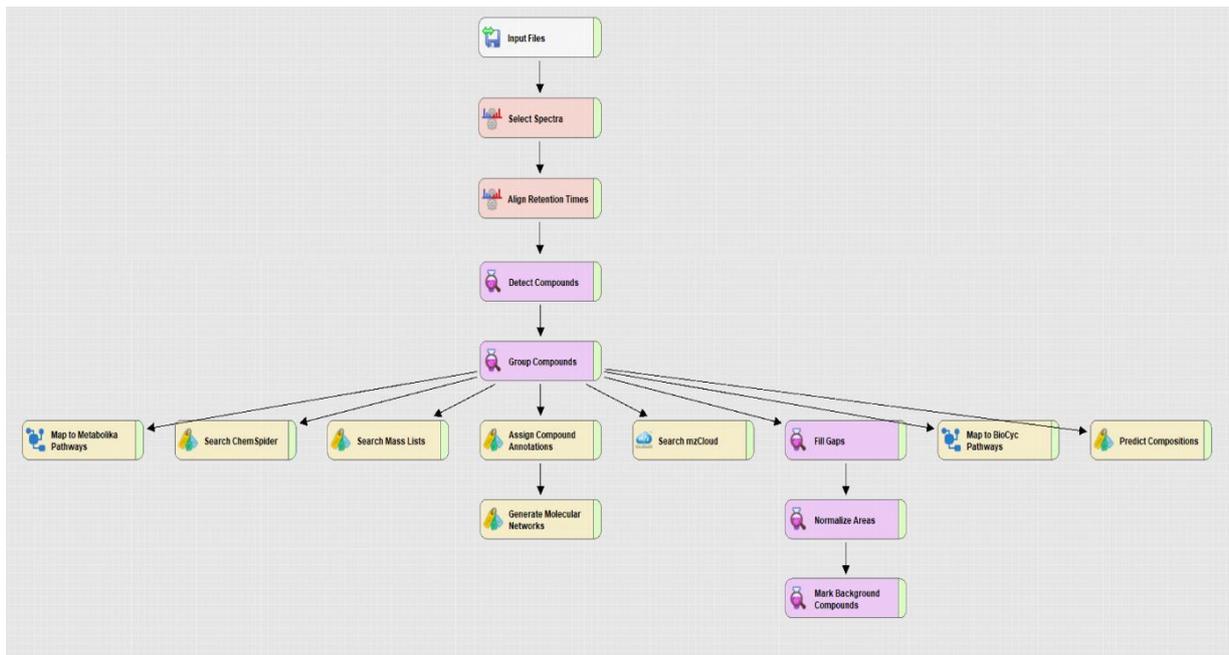


Abbildung 6: Workflow der Datenprozessierung mittels Compound Discoverer

Für das erste und dritte Experiment wurden für weitere Analysen die Datenmatrizen, die über Compound Discoverer erzeugt wurden, über die Online-Plattform MetaboAnalyst 5.0^[91,92] prozessiert. Diese ermöglichte es, die Datensätze logarithmisch zu transformieren und eine Pareto-Skalierung anzuwenden um die Daten in eine (annähernde) Normalverteilung zu überführen. Wurde die Zelldichte bestimmt (Experiment 3), konnte zudem eine Normalisierung anhand dieser über MetaboAnalyst durchgeführt werden.

Für die statistische Analyse über MetaboAnalyst wurden einfaktorielle Varianzanalysen durchgeführt (ANOVA). Als p-Schwellenwert wurde für die ANOVA stets $p = 0.05$ festgelegt, sowie als Post-hoc-Test der Fisher's LSD. Neben der ANOVA wurde über die Plattform noch der t-Test angewandt, ebenfalls mit einem p-Schwellenwert von 0.05. Darüber hinaus wurde das Tool PatternHunter von MetaboAnalyst verwendet. Es erlaubt bei Datensets mit mehreren Gruppen, Features

zu finden, die nur zwischen zwei bestimmten Gruppen hoch- oder herunterreguliert sind.

Die gezeigten MSMS-Daten wurden über den Qual Browser der Software Xcalibur™ von ThermoFisher Scientific™ ausgewertet. Mit Hilfe der Software SIRIUS 4.0.1^[93] konnte zudem ein Strukturvorschlag für die Spektren erhalten werden. Dabei werden anhand des Tools CSI:FingerID^[94,95] die größten gängigen Datenbanken (u.a. PubChem^[96], Natural product atlas^[90], Coconut^[97], etc.) in den Abgleich miteinbezogen und darauf basierend ein Prozentwert für die Übereinstimmung und ein CSI:FingerID Score erzeugt. ^[95,98] Außerdem wurde der Spektrenvergleich der MoNa-Datenbank (MassBank of North America) genutzt, um nach ähnlichen MSMS Daten mit einer Massenabweichung von 10 ppm zu suchen.

Ferner wurde Microsoft Excel 365 für kleinere Aufgaben verwendet, zum Beispiel um Featurelisten zu filtern, zwischen Compound Discoverer und Metaboanalyst zu übertragen, oder die Listen zu vereinfachen.

3 Ergebnisse

Es wurden in dieser Arbeit mehrere Hypothesen verfolgt, die in drei metabolomischen Experimenten zusammengefasst wurden. Die Ergebnisse der Versuche sollen in den folgenden Kapiteln dargestellt und diskutiert werden. Zur Analyse wurden dafür zwei Ansätze angewendet, die Targeted Analysis und die Untargeted Analysis.

Im Rahmen der Targeted Analysis wurden die erhaltenen Datenmatrizen aller Experimente in Compound Discoverer nach den in Tabelle 1 aufgelisteten Verbindungen anhand ihrer Summenformeln gesucht. Alle Verbindungen spielen in der Biosynthese von Oxylipinen eine wichtige Rolle (siehe auch 1.4). Eine genaue stereospezifische Bestimmung von Isomeren der Stoffe ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, deswegen werden entsprechende Präfixe vernachlässigt.

Verbindung	Summenformel	RT / Min	Addukt MW / u	(+/-)	CAS
DHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	14.5	327.2331	-	6217-54-5
HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	12.0	319.2279	-	71030-36-9
EPA	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	14.1	301.2174	-	10417-94-4
HDTA	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	12.7	249.1852	-	29428-96-4

Tabelle 1: Übersicht über die gezielt im Zuge der Targeted Analysis gesuchten Verbindungen mit Angaben zur Retentionszeit (RT), dem Molekulargewicht des gebildeten Addukts (Addukt MW), der angewendeten Polarisierung (+/-) und der CAS-Nummer; DHA: Docosahexaensäure, HETE: Hydroxyarachidonsäure, EPA: Eicosapentaensäure; HDTA: Hexadecatriensäure

Außerdem wurde für das zweite und dritte Experiment eine Untargeted Analysis durchgeführt. Hier sollten weitere interessante Verbindungen gesucht werden, die zur Familie der Oxylipine gehören könnten. Für das zweite Experiment wurden alle Datenmatrizen mit Hilfe von Compound Discoverer auf Treffer mit Werten für den logarithmierten fold change > 2 und gleichzeitig p < 0.05 gefiltert. Da dies teilweise immer noch sehr viele Treffer lieferte, wurde die erhaltene Matrix daraufhin via Microsoft Excel auf Verbindungen komprimiert, die nur aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff aufgebaut sind (CHO-Verbindungen). Von diesen wurden Features ausgewählt, die vielversprechende Ergebnisse in den Datenbanken BioCyc und ChemSpider lieferten (Liste 1). Zusätzlich wurde die ursprüngliche Datenmatrix online

über MetaboAnalyst logarithmiert und eine Pareto-Skalierung angewandt, sowie eine ANOVA durchgeführt ($p < 0.05$ und Fischer's LSD für die Post-hoc-Analysis, Liste 2). Liste 1 und 2 wurden über Microsoft Excel anhand der Summenformeln und Retentionszeiten nach Übereinstimmungen gefiltert. Dies ergab eine Matrix mit Verbindungen, die in den Proben auftreten und für zukünftige Experimente interessant sein könnten.

Im dritten Experiment wurde die Methodik für die Untargeted Analysis etwas angepasst, da die Zelldichte bestimmt wurde und über MetaboAnalyst ein zusätzlicher Normalisierungsschritt notwendig war. Die Komprimierung der Daten über Compound Discoverer mittels logarithmischen fold change und p-Wert ist ohne Normalisierung mit der Zelldichte (sofern diese bestimmt wurde) nicht zuverlässig genug. So wurde die Datenmatrix in MetaboAnalyst geladen, normalisiert, transformiert, skaliert und eine ANOVA durchgeführt. Nur die signifikanten Ergebnisse der ANOVA ($p < 0.05$, Fisher's LSD) wurden für die Suche nach weiteren vielversprechenden Features verwendet. Diese Ergebnisse wurden mit einer Oxylipin-Datenbank der Wertz Group, BioCyc und ChemSpider abgeglichen und nach Treffern gesucht.

Entsprechende Tabellen mit den Resultaten der Untargeted Analysis werden im letzten Teil der jeweiligen Experimente präsentiert. Für genauere Angaben zur Datenauswertung und Methodik sei hier auf Kapitel 2 verwiesen.

3.1 Experiment 1: Modulation von PUFAs in *C. granii* durch dreißigminütige Exposition mit *L. coscinodisci*

Für *Coscinodiscus granii* ist die Produktion von Oxylipinen und PUFAs durch Pathogenkontakt bereits bekannt.^[18] Möglicherweise geschieht dies auch durch eine Behandlung mit dem Parasitoiden *L. coscinodiscus*. Deshalb wurde ein metabolisches Experiment durchgeführt, um die Stoffwechselprofile zwischen einer Kontrollkultur und einer kurzzeitig mit *L. coscinodiscus* exponierten Kultur mit Fokus auf Lipiden zu vergleichen.

Experimentell wurde dafür eine angelegte Kultur der Phytoplanktonspezies für 30 Minuten in direkten Kontakt mit dem Pathogen gebracht (siehe auch Workflow in Abbildung 7). Nach dieser Zeit wurden keinen neuen infizierten Zellen gefunden. Neben der Kontroll- und Expositionskultur wurde ein Blank des Mediums und des Pathogens erstellt, deren Signale in der Analyse subtrahiert wurden. Die Extraktion erfolgte sowohl für die innerhalb der Zellen produzierten Metaboliten (Endometabolom), als auch für die in das Medium abgegebenen (Exometabolom). Als Extraktionsmittel diente dabei für Ersteres Methanol, das Exometabolom wurde über eine Festphasenextraktion mit Methylformiat als Elutionsmittel aufgearbeitet. Die Analyse der erhaltenen Probelösungen und Qualitätskontrollen, Mischungen kleiner Mengen jeder Probe, erfolgte über ein UHPLC-HRMS. Dabei wurde einerseits mit einer aus Veröffentlichungen des Lehrstuhls bekannten RP18-Säule und den zugehörigen Messparametern ^[87] und andererseits mit einer gängigen C18-Säule und dazu passenden Messparametern, basierend auf einer anderen Veröffentlichung ^[32] gearbeitet, um zu evaluieren, welche für die hier behandelte Fragestellung besser geeignet ist und ob es überhaupt signifikante Unterschiede gibt.

Für die MS-Daten wurde die dd-MS-Methode angewandt und für MSMS-Daten die PRM-Methode (siehe auch Kapitel 2.3). Die Messungen erfolgten in technischen Triplikaten, es wurden also alle Proben je dreifach injiziert. Um auszuschließen, dass es sich bei den gefundenen Metaboliten um Stoffwechselprodukte des Parasitoiden handelt, wurde bei allen Expositionsexperimenten stets ein Blank von *L. coscinodisci* komplett analog zu den anderen Proben extrahiert und vermessen.

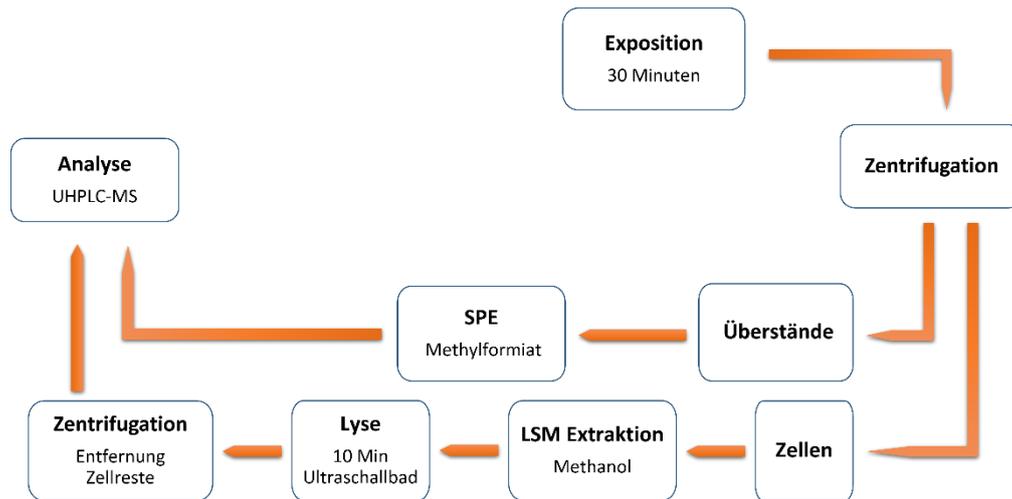


Abbildung 7: Workflow zur Extraktion im ersten Experiment

Die erhaltenen Rohdaten wurden über die Software Compound Discoverer für die beiden verwendeten Säulen separat prozessiert. Im Anschluss daran wurde die Datenmatrix über MetaboAnalyst logarithmiert, eine Pareto-Skalierung angewandt und eine ANOVA durchgeführt, um die statistische Signifikanz der Features zu überprüfen ($p < 0.05$, Fisher's LSD).

3.1.1 Vergleich der verwendeten Chromatographiemethoden

Abbildung 8 zeigt die jeweiligen TIC des Endo- und Exometaboloms der exponierten Proben von *C. granii* bei Anwendung zweier unterschiedlicher Messmethoden im negativen und positiven Modus. Dabei wurden die gleichen Proben mit unterschiedlichen Messbedingungen analysiert. Einerseits wurde mittels RP18-Säule und einer sechzehnminütigen Methode nach Jagusch et al.^[87] gearbeitet, andererseits über 14 Minuten und mittels C18-Säule nach Vallet et al.^[32], die hier verkürzt RP18- bzw. C-18-Methode genannt werden (genaue Parameter beider Varianten sind in Kapitel 2.3 aufgeführt). Bei Ersterer sind vor allem Peaks im höheren Bereich der Retentionszeiten erkennbar, unter anderem auch Signale vor Minute 14 im Endometabolom über die RP18-Methode (negativ), die sich über die C18 Methode nicht zeigen. Zudem treten noch einige polarere Substanzen in den C18-Spektren auf, sowohl bei ca. 3-6 und 9-10 Minuten als auch stark überlappend im Bereich vor Minute 1 (negativer Modus, C18). Die erreichten Peakintensitäten sind zudem bei der C18-Methode um etwa eine Zehnerpotenz niedriger. Auch das Signal-Rausch-Verhältnis ist hier schlechter als bei der RP18-Methode (vor allem sichtbar in C18 negativ Exo).

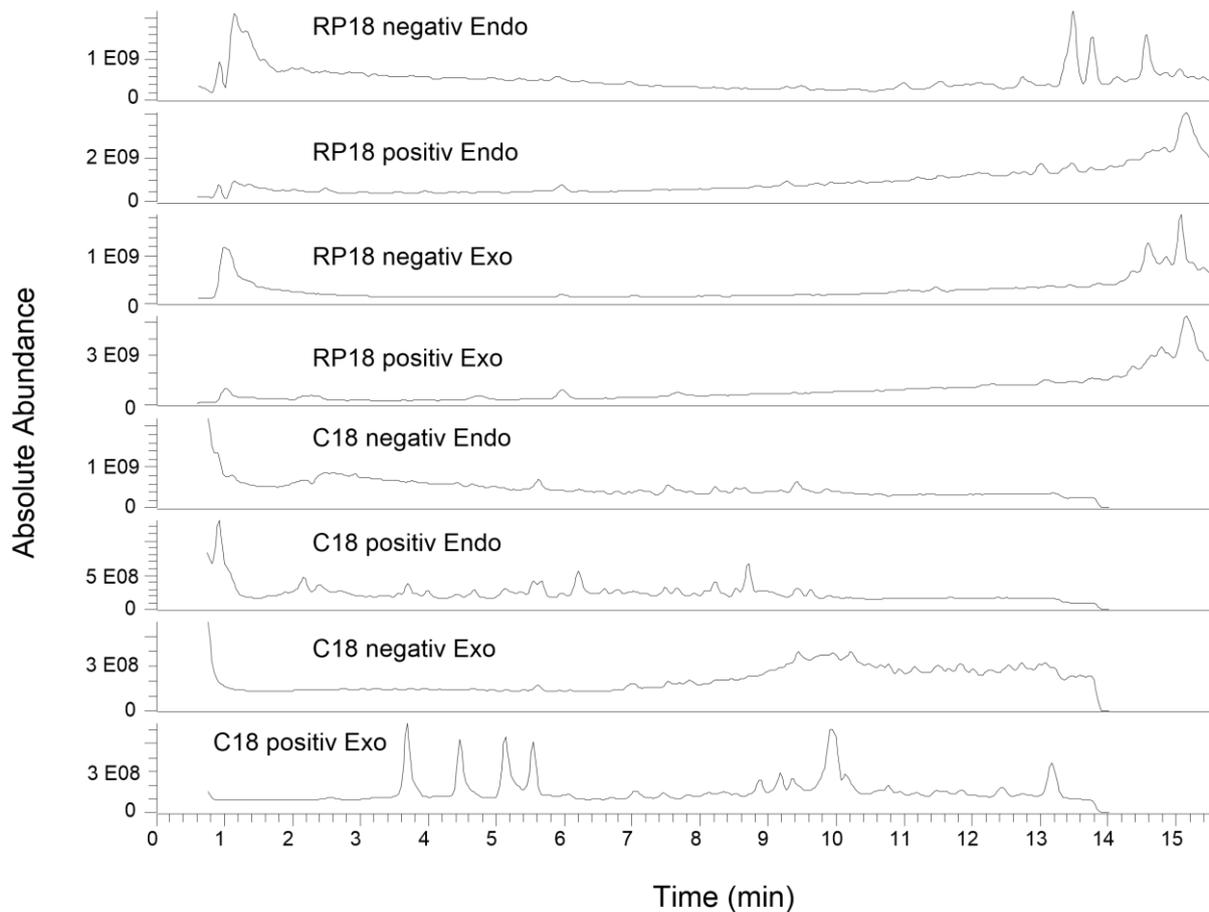


Abbildung 8: Total Ion Chromatograms (TIC) der massenspektrometrischen Messungen im ersten Experiment im negativen und positiven Modus und mit Elektronensprayionisation (ESI); Es sind die exponierten Endometabolome (Endo; Metabolom in den Zellen) und exponierten Exometabolome (Exo; in die Umgebung abgegebene Metaboliten) in *C. granii* bei Anwendung der RP18- bzw. C18-Methode dargestellt

3.1.2 Überblick über die Ergebnisse

Um Unterschiede durch den Kontakt mit dem Parasitoiden zu zeigen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, über die die Varianzunterschiede zwischen verschiedenen Messgruppen in zwei (oder drei) Dimensionen dargestellt werden können.

Betrachtet man die Score-Plots der PCA zu diesem Versuch (Abbildung 9), zeigt sich eine sehr klare Differenzierung zwischen den verschiedenen Messgruppen. Das Experiment und das damit verbundene Ziel, Veränderungen im Metabolom durch einen Kontakt mit dem Parasitoiden hervorzurufen, verlief offensichtlich erfolgreich und

hat für beide Teile des Metaboloms zu einer gut sichtbaren Separation von Kontroll- und Expositionsgruppe geführt. Die Summe der beiden Hauptkomponenten liegt bei 71.6 %. Davon entfallen 52.8% auf PC 1, die hier für Unterschiede zwischen Exometabolom und Endometabolom steht. Insgesamt wurde eine Datenmatrix mit 1582 Features erhalten, von denen 1399 eine Summenformel zugeordnet werden konnte.

3.1.3 Gezielte Suche nach spezifischen Verbindungen (Targeted Analysis)

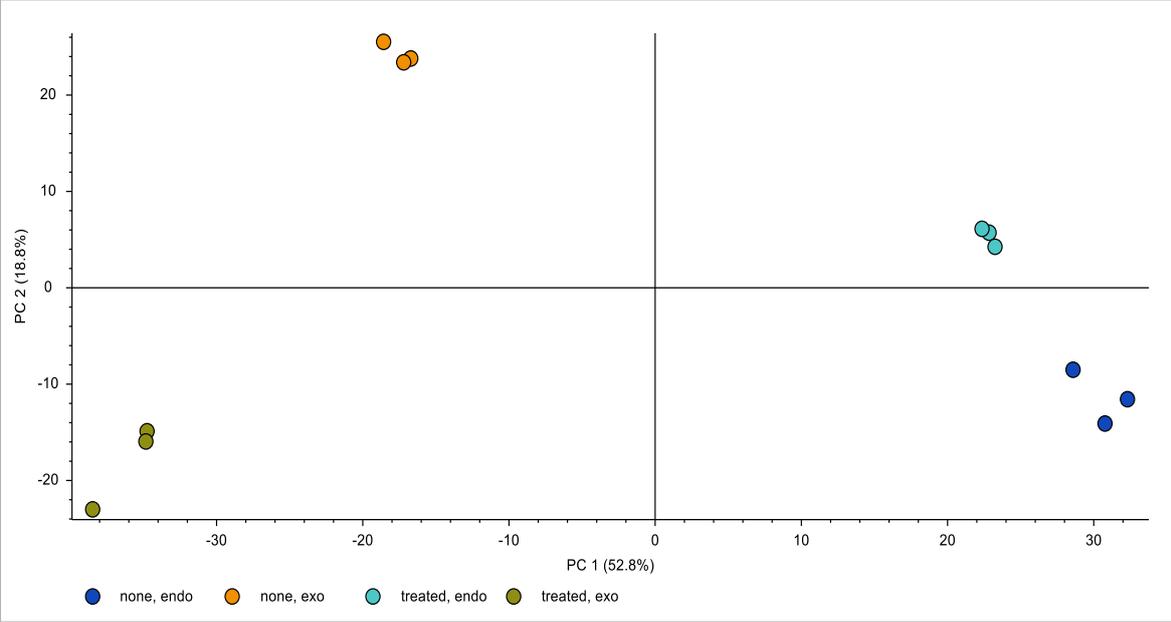
Für die Targeted Analysis sollte anhand der Summenformeln gezielt nach den Verbindungen aus Tabelle 1 in der Datenmatrix gesucht werden. Um eine Abschätzung ihrer Regulation durch die Exposition treffen zu können, werden Box-Whisker-Plots für die Metaboliten gezeigt. Der Loadings-Plot der PCA zeigt darüber hinaus die gewichtete Verteilung aller Metaboliten in Abhängigkeit der beiden Hauptkomponenten. Korreliert man Score- und Loadings-Plot der PCA lässt sich anhand der Positionen einschätzen zu welchem Cluster die markierten Metaboliten beitragen.

Bei der Suche nach den Stoffen der Targeted Analysis konnte ein Feature mit der Summenformel $C_{22}H_{32}O_2$ in der Datenmatrix aus Compound Discoverer gefunden werden, bei dem es sich möglicherweise um DHA handeln könnte. Es wurde mittels der internen Datenbank als Docosahexaensäure annotiert. Im zugehörigen Loadingsplot der PCA (Abbildung 9) sieht man anhand der Position des blau markierten Features eine Korrelation mit der Expositionsgruppe des Exometaboloms im Score-Plot. Bei einer weiteren Analyse der Datenmatrix über MetaboAnalyst konnte nach logarithmischer Transformation und Pareto-Skalierung das Feature mittels ANOVA als signifikant eingestuft werden ($p < 0.05$, Fisher's LSD). Über die Funktion Pattern Hunter wurde für die Verbindung ein p-Wert von 0.0068, sowie ein t-stat.-Wert von 3.3983 für die exponierte Gruppe des Exometaboloms ermittelt. Ein Box-Plot für das Feature ist in Abbildung 9 gezeigt. Man sieht eine leichte Hochregulation der Verbindung im Exometabolom durch die Infektion mit dem Parasitoiden und gleichzeitig eine Herunterregulation im Endometabolom, was für eine Abgabe der Verbindung in das umliegende Medium spricht. Das Feature konnte durch die gleichzeitige Vermessung eines Standards als DHA gemäß Stufe 1 der

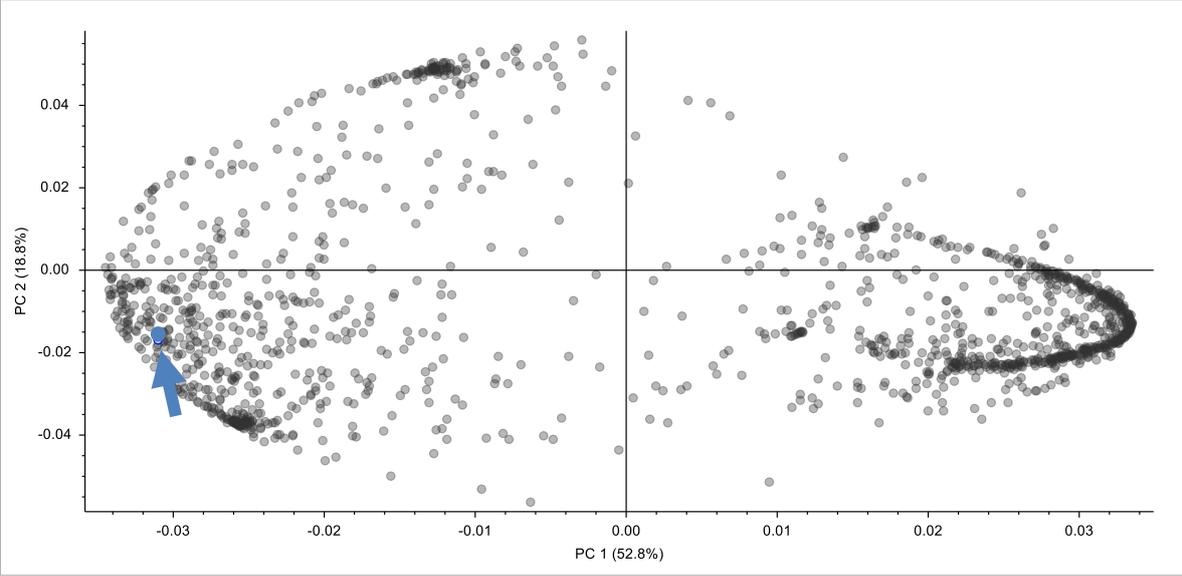
Identifikationslevels nach Schymanski et al.^[99] identifiziert werden (Abbildung 29, Anhang). Das Fragmentierungsmuster stimmt gut mit dem Standard überein und die Retentionszeitabweichung liegt bei 0.1 Minuten. Darüber hinaus wurden die erhaltenen MSMS-Daten über die Software Sirius prozessiert und lieferten DHA an erster Stelle der Treffer mit einem CSI:FingerID Score von -44,229 und einem Übereinstimmungswert von 57.80 %. Dabei gab es 19 Treffer in gängigen Datenbanken (darunter z.B. PubChem, Natural Products, Biocyc, Kegg, etc.). Eine Suche in der Datenbank MoNa (MassBank of North America) ergab zudem einen Treffer für DHA mit einem dimensionslosen Wert für die Übereinstimmung von 986 aus maximal 1000. Hier erfolgte die Messung ebenfalls im negativen Modus und über ESI, jedoch mit einem QTOF-Analysator.

Es konnten darüber hinaus noch Features mit den Summenformeln $C_{20}H_{30}O_2$ und $C_{16}H_{26}O_2$ entdeckt werden. Sie können vermutlich EPA und HDTA zugeordnet werden, liegen jedoch außerhalb der Signifikanzschwellenwerte in der Differenzialanalyse in Compound Discoverer ($p = 0.05$, $\log fc = 1$). Auch über die Analyse der Varianzen in Metaboanalyst ließen sich keine relevanten Modulationen dieser beiden Features erkennen.

a)



b)



c)

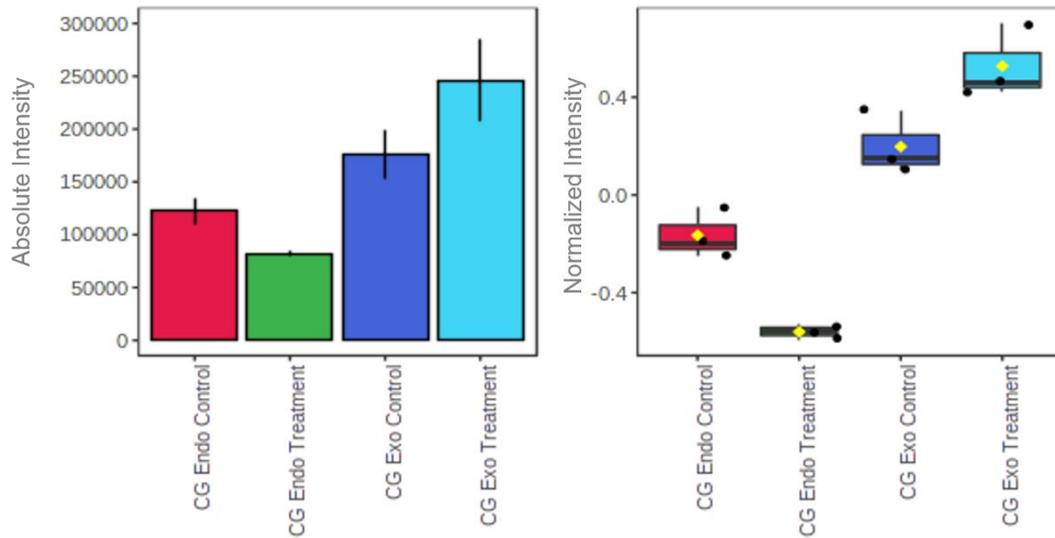


Abbildung 9: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA zur Oxylinmodulation von *C. granii* durch dreißigminütige Exposition mit dem Parasitoiden *L. coscinodisci* mit Darstellung der Kontrollgruppe (none) und der Expositionsgruppe (treated) in beiden Teilen des Metaboloms. Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen; Säulendiagramm mit Standardabweichung (c, links) vor und Box-Whisker-Plot (c, rechts) nach der logarithmischen Transformation und Pareto-Skalierung über MetaboAnalyst zum Feature $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA); ANOVA: $F = 51.908$, $p = 6.8 \cdot 10^{-3}$

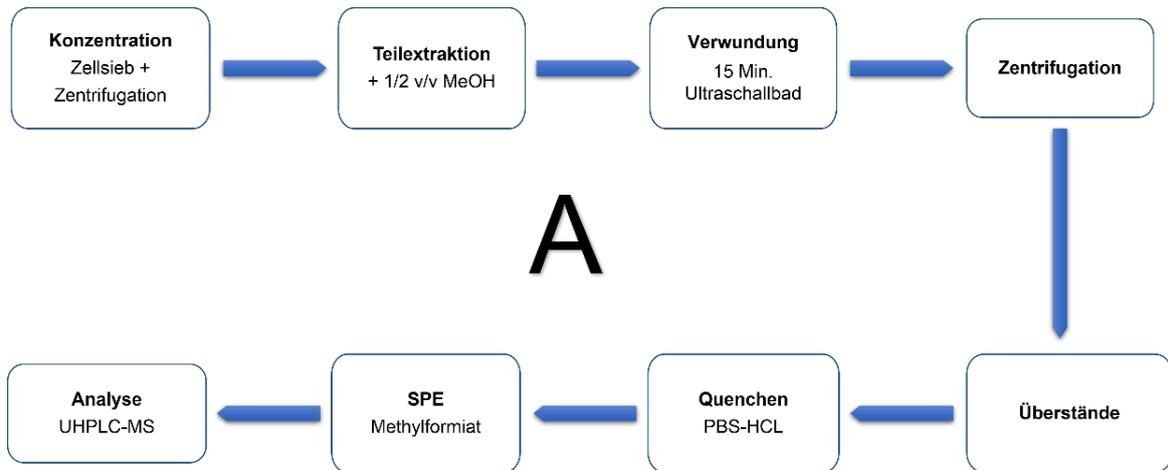
3.2 Experiment 2: Verwundungsaktivierte PUFA- und Oxylipin-Modulation in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii*

Für das zweite Experiment wurde die Hypothese aufgestellt, dass die drei hier untersuchten Stämme der Diatomeenarten *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii*, verwundungsaktiviert PUFAs und Oxylipine produzieren. In der Folge wurde ein metabolomisches Experiment durchgeführt mit dem die Stoffwechselreaktion auf mechanische Verwundung der drei Diatomeenarten untersucht werden sollte.

Die Verletzung der Zellen wurde dabei mittels eines Ultraschallbads bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Extraktion der Metabolite angewandt. Kurz zusammengefasst wurden die Kulturen in beiden Fällen konzentriert, verwundet, zentrifugiert und extrahiert. Methode A orientierte sich an der Veröffentlichung von Jagusch et al. ^[87] und bezog sich auf die Untersuchung des Endometaboloms der Zellen. Es wurde vor der Verwundung bereits eisgekühlter Methanol zugegeben und nach der Zentrifugation und Abtrennung der Zellrückstände mittels Methylformiat extrahiert. Bei Methode B wurde zur Untersuchung des Endometaboloms erst nach der Zentrifugation und Abtrennung des Exometaboloms vollständig extrahiert. Dies erfolgte hier jedoch ohne SPE und nur mit Methanol. Das Exometabolom wurde ebenso extrahiert, mittels SPE und Methylformiat. In der Folge wird in den Ergebnissen über Methode A nur das Endometabolom betrachtet, während bei Methode B sowohl Exo-, als auch Endometabolom miteinbezogen werden. Die Messungen erfolgten in technischen Replikaten.

Einen Überblick über beide Methoden bieten die Workflows in Abbildung 10. Die Daten wurden anschließend mit Compound Discoverer prozessiert und analysiert. Es erfolgte keine zusätzliche Analyse über MetaboAnalyst.

a)



b)

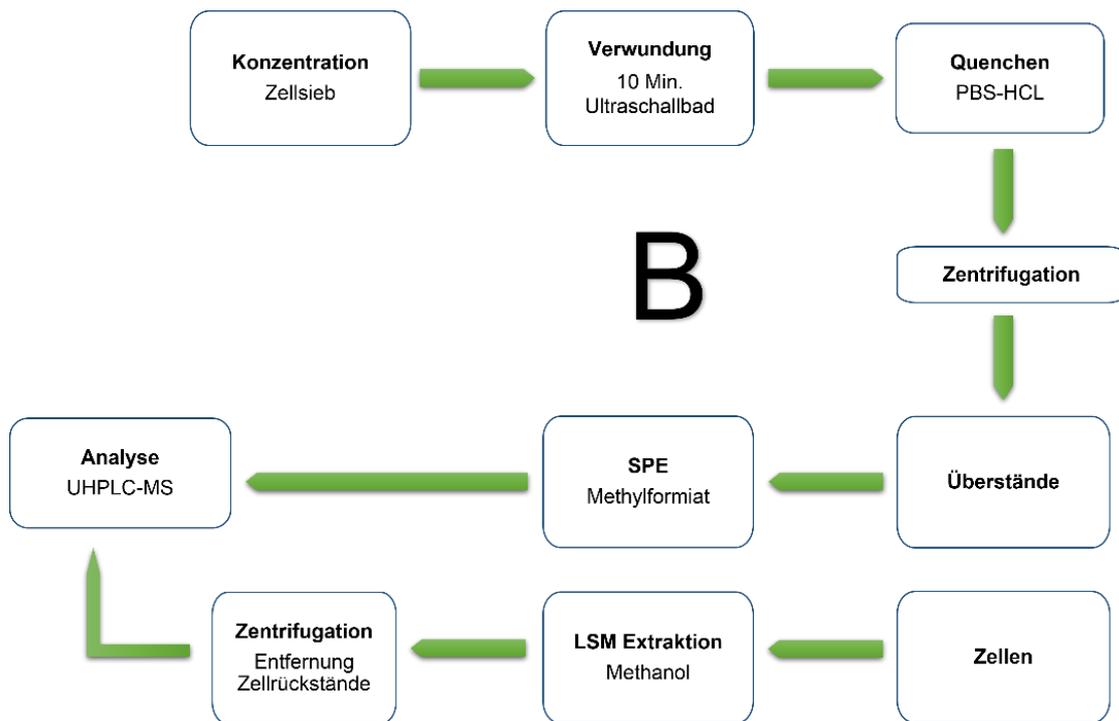


Abbildung 10: a) Workflow zur Extraktionsmethode A nach Jagusch ^[87] ; b) Workflow der selbstentwickelten Extraktionsmethode B

3.2.1 Überblick über die Ergebnisse und Targeted Analysis

Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu zeigen, wurde auch hier eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode getrennt präsentiert. Für Methode A wurden die Versuchsdaten gemeinsam prozessiert, für Methode B erfolgte dies für jede Spezies getrennt.

Extraktionsmethode A

Die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 11) zeigt eine klare Differenzierung zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen und –arten. Es kann also von einer erfolgreichen Verwundung ausgegangen werden, in dessen Folge eine Veränderung des Metaboloms in der behandelten Gruppe relativ zur Kontrolle induziert wurde. Interessant ist zudem eine Agglomeration der Spezies *C. walesii* und *C. radiatus* zueinander, während *C. granii* Abweichungen von diesem Verhalten zeigt. Die Verwundung hat also speziesspezifische Folgen für das Metabolom verursacht. Insgesamt umfasst die Datenmatrix hier 609 Features, von denen 564 mit einer Summenformel annotiert wurden.

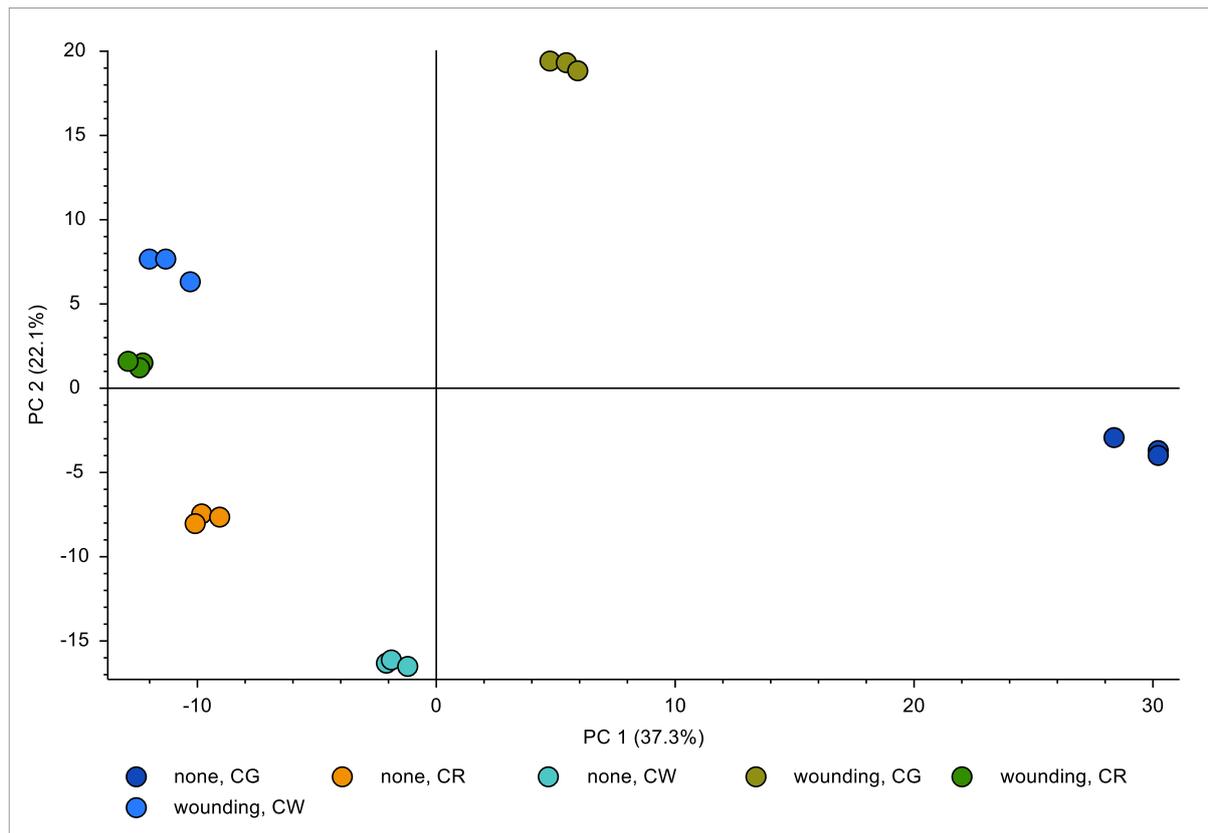


Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse zum zweiten Experiment mit der Extraktionsmethode A nach Jagusch et al.^[87]; Es sind Kontrollgruppe (none) und behandelte Gruppe (wounding) gezeigt; Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen; *C. granii* (CG), *C. wailesii* (CW) und *C. radiatus* (CR)

Extraktionsmethode B

Die PCA für *C. granii* (Abbildung 12) zeigt eine gute Separation zwischen Exo- und Endometabolom, aber auch zwischen Kontroll- und Verwundungsgruppe. Das Experiment hat demzufolge gut funktioniert und die angewandte mechanische Verletzung der Zellen eine Metabolommodulation verursacht. Entlang der ersten Hauptkomponente kann vor allem ein Unterschied zwischen Exo- und Endometabolom entdeckt werden. Es wurden insgesamt 1235 Features entdeckt, von welchen 1074 mit einer Summenformel annotiert wurden.

Bei der PCA zu *C. radiatus* und *C. wailesii* (Abbildung 13 und 14) zeigt sich ein anderes Bild. Während das Endometabolom jeweils eine sichtbare Trennung von Kontrolle und behandelter Gruppe aufweist und damit für ein ertragreiches Experiment spricht, sieht man im Exometabolom jeweils keine klare Trennung. Nicht nur die äußere Varianz ist hier hoch, auch die innere Varianz zeigt starke Schwankungen.

Ergebnisse

Die Datenmatrix ergab bei *C. radiatus* 4688 Features, davon 3877 annotiert. Bei *C. wailesii* umfasste sie 12210 Features, von welchen 10352 eine Summenformel zugeordnet wurde.

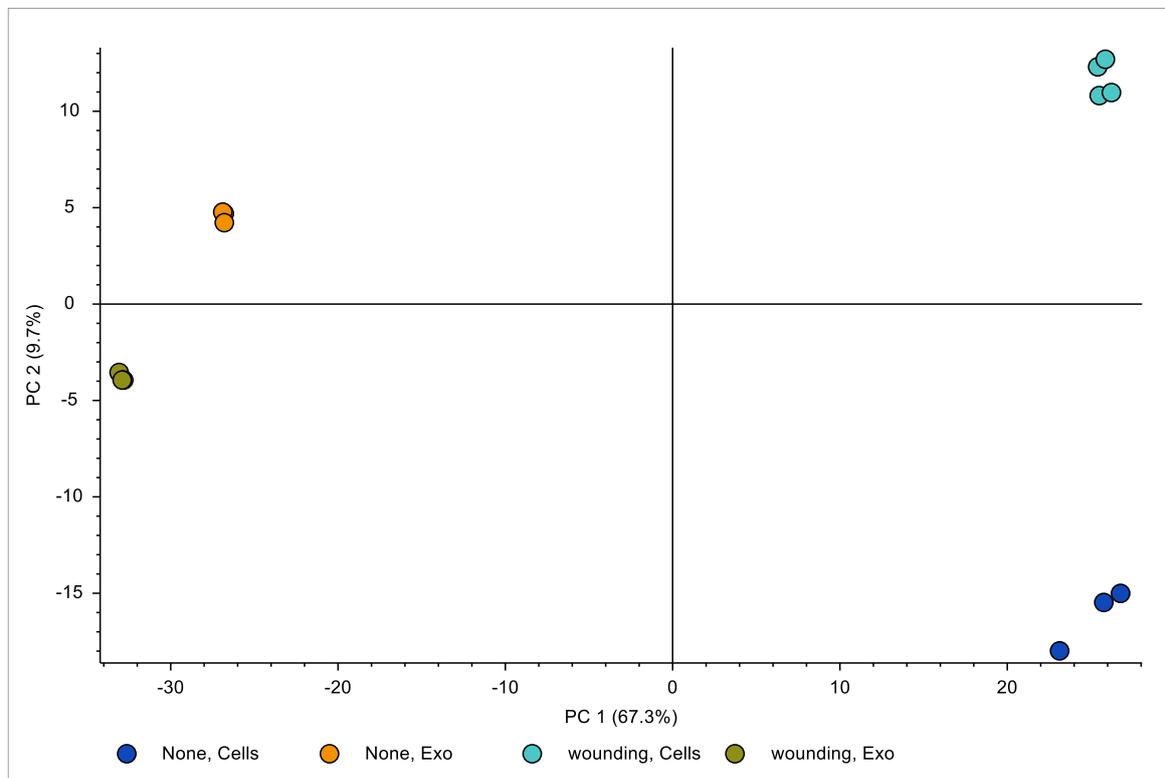


Abbildung 12: PCA-Score-Plot zum zweiten Experiment nach Extraktionsmethode B; Exo- und Endometabolom von *C. granii* (CG) Dargestellt sind Kontrollgruppe (none) und die Testgruppe, die verwundet wurde (wounding); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen

Ergebnisse

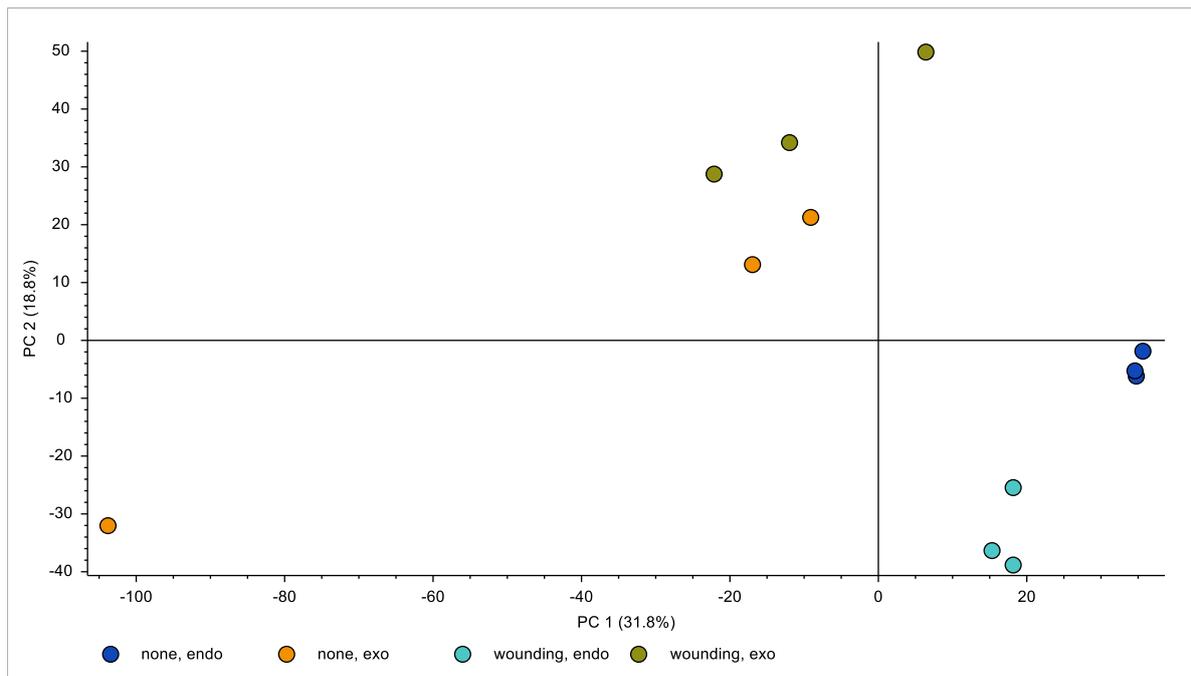


Abbildung 13: PCA-Score-Plot zum zweiten Experiment; Exo- und Endometabolom von *C. radiatus* (CR) Dargestellt sind Kontrollgruppe (none) und die Testgruppe, die verwundet wurde (wounding); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen

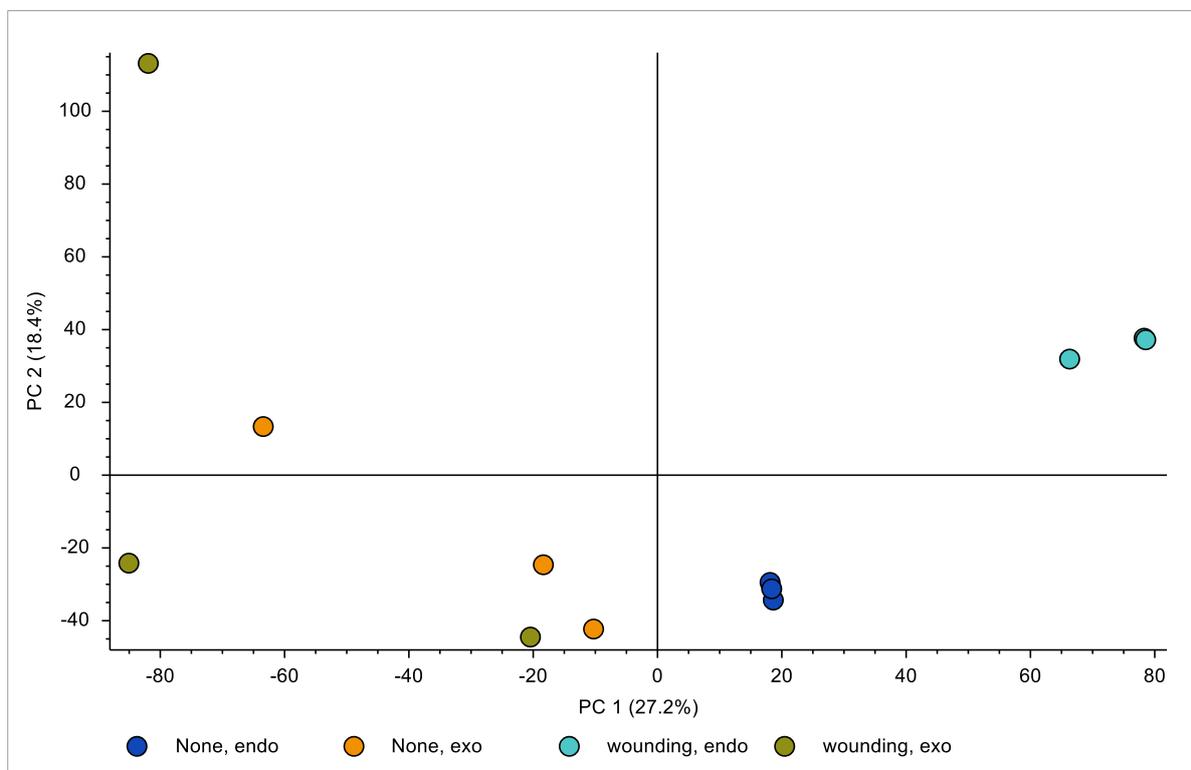


Abbildung 14: PCA-Score-Plots zum zweiten Experiment; Exo- und Endometabolom von *C. walesii* (CW) Dargestellt sind Kontrollgruppe (none) und die Testgruppe, die verwundet wurde (wounding); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen

3.2.2 Gezielte Suche nach spezifischen Verbindungen (Targeted Analysis)

Für die Targeted Analysis sollte anhand der Summenformeln gezielt nach den Verbindungen aus Tabelle 1 in der Datenmatrix gesucht werden. Zur Abschätzung ihrer Regulation werden Box-Whisker-Plots gezeigt. Auch hier werden die Loadings- und Score-Plots der PCA zur Veranschaulichung einer Korrelation des Features mit einem Cluster der Versuchsgruppen verwendet. Zudem werden Volcano-Plots der Differentialanalysen gezeigt. Durch sie kann man Features präsentieren, die innerhalb eines festgelegten Signifikanzfensters (p - (bzw. $\log p$) und $\log fc$ - Schwellenwert, farblich markierte Bereiche) in der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert (grün) oder hochreguliert (rot) werden.

Im Sinne der Übersichtlichkeit sind alle gesuchten Features, die im Rahmen der Targeted Analysis des zweiten Experiments gefunden wurden, in Tabelle 2 zusammen mit ihrer vermuteten Regulation aufgelistet. Zudem sind in Tabelle 3 nur die statistisch signifikanten Verbindungen mit den zugehörigen p - und $\log fc$ -Werten gelistet. Für massenspektrometrische Daten sei hier erneut auf Tabelle 1 verwiesen. Die detaillierten Ergebnisse werden auf den darauffolgenden Seiten, in Abhängigkeit der Extraktionsmethode, präsentiert.

In Tabelle 2 zeigt sich für die Verbindungen eine starke Abhängigkeit der Featuremodulation von der angewendeten Extraktionsmethode. Vergleicht man die Endometabolome von Methode A und B sieht man beispielsweise für *C. granii* einerseits eine Hochregulation des als DHA eingeordneten Metabolits (Methode A), andererseits eine Herunterregulation (Methode B). Auch bei den anderen Features zeigen sich methodenabhängige Unterschiede. Der als HETE eingeordnete Metabolit wurde beispielsweise über Methode A überhaupt nicht festgestellt, während es bei B in allen Spezies aufgetreten ist, wenn auch nicht immer als statistisch signifikant. Weiterhin sieht man eine speziesspezifische Produktion der Verbindungen. So wurde bei Methode A das Feature zu HDTA in *C. granii* hochreguliert, während es bei *C. walesii* herunterreguliert wird. Darüber hinaus wurde EPA bei *C. granii* und *C. radiatus* mit signifikanten Änderungen entdeckt, während es in *C. walesii* überhaupt nicht detektiert wurde. Bei *C. granii* fällt zudem auf, dass, bis auf das als HETE eingeordnete

Ergebnisse

Feature über Methode A, für alle gesuchten Stoffe entsprechende Features in beiden Methoden entdeckt wurden.

		DHA			HETE			EPA			HDTA		
		CG	CR	CW	CG	CR	CW	CG	CR	CW	CG	CR	CW
A	Endo	+	ns	ns	/	/	/	+	ns	ns	+	ns	-
B	Endo	-	/	/	ns	ns	+	ns	-	/	ns	/	ns
	Exo	+	/	/	+	ns	ns	+	ns	/	+	/	ns

Tabelle 2: Übersicht über die Ergebnisse der Targeted Analysis für Experiment 2; Dargestellt sind die gesuchten Verbindungen (DHA, HETE, EPA, HDTA) in Abhängigkeit der jeweiligen Spezies (CG: C. granii, CR: C. radiatus, CW: C. wailesii), der Extraktionsmethode (A und B), der Modulation des Features ((+) für eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe, (-) für eine Herunterregulation, Differentialanalyse, $p < 0.05$, $\log fc > 1$) und der Art der Matrix (Endometabolom und Exometabolom);

Verbindung	Spezies	Methode	Matrix	(+/-)	p-Wert	log fc
DHA	CG	A	Endo	+	3.8E-7	1.61
	CG	B	Endo	-	2.1E-3	1.03
	CG	B	Exo	+	5.5E-5	1.60
HETE	CG	B	Exo	+	7.8E-5	1.27
	CW	B	Endo	+	9.0E-5	8.03
EPA	CG	A	Endo	+	4.9E-13	3.69
	CG	B	Exo	+	5.7E-7	2.08
	CR	B	Endo	-	3.5E-2	3.93
HDTA	CG	A	Endo	+	4.4E-14	5.06
	CG	B	Exo	+	1.8E-8	2.89
	CW	A	Endo	-	1.2E-9	1.88

Tabelle 3: Übersicht über alle signifikanten Features des zweiten Experiments mit den entsprechenden p- und log fc-Werten sowie der Modulation ((+) für eine Hochregulation und (-) für eine Herunterregulation in der behandelten Gruppe)

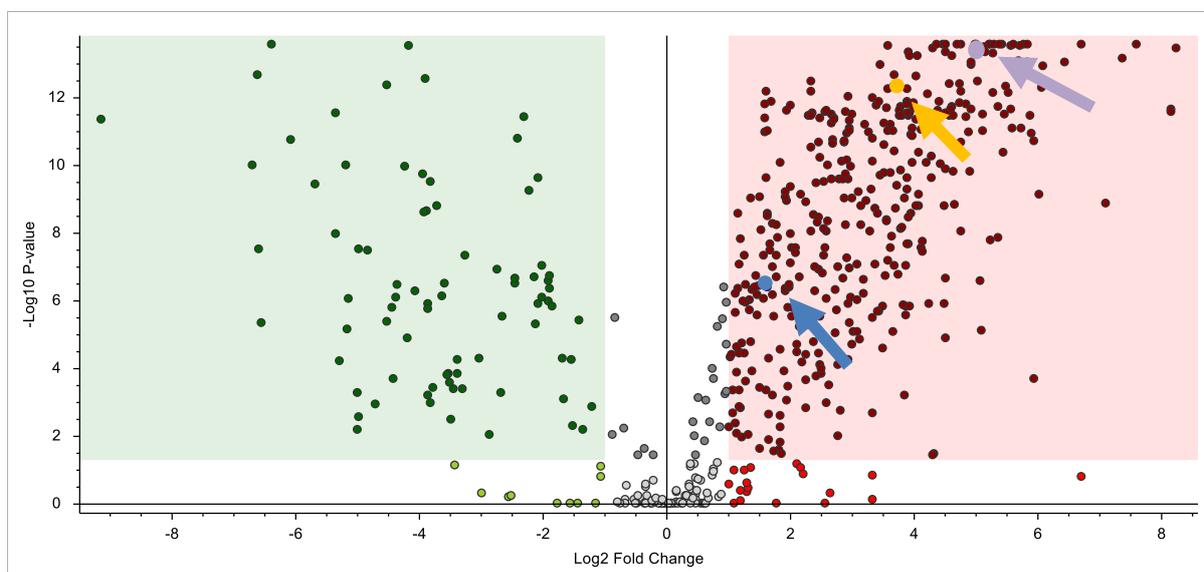
Extraktionsmethode A

Über die Datenmatrix konnten drei Features mit den Summenformeln $C_{22}H_{32}O_2$, $C_{20}H_{30}O_2$ und $C_{16}H_{26}O_2$ gefunden werden. Sie entsprechen damit wahrscheinlich den Verbindungen Docosahexaensäure (DHA), Eicosapentensäure (EPA) und Hexadecatriensäure (HDTA).

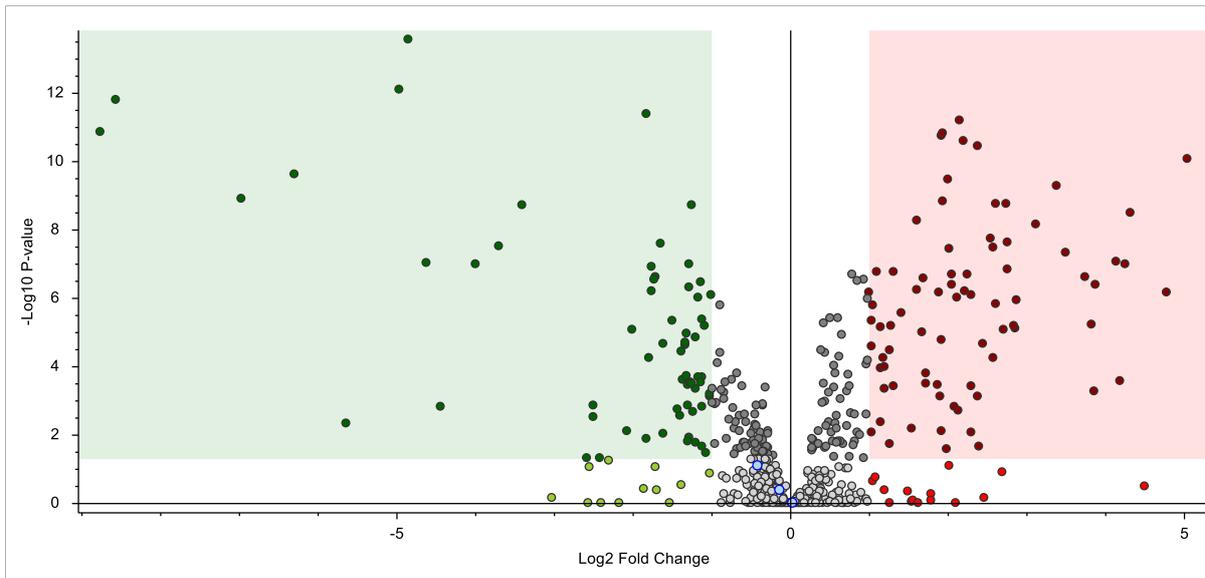
Die Differentialanalysen bei einem log fc-Schwellenwert von 1 und einem p-Schwellenwert von 0.05 zeigen eine signifikante Hochregulation (zweiter Quadrant, rot) aller drei Metabolite in *C. granii* (Abbildung 15), dabei am prägnantesten im Falle von $C_{16}H_{26}O_2$ ($p < 0.001$, $\log fc > 2$). Bei *C. wailiesii* ist nur eine Verbindung signifikant moduliert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um $C_{16}H_{26}O_2$, jedoch vermutlich herunterreguliert ($\log fc > 1$ und $p < 0.001$). Im Box-Whisker-Plot ist sehr deutlich die unterschiedliche Regulation von $C_{16}H_{26}O_2$ in *C. granii* und *C. wailiesii* zu sehen (Abbildung 16). Bei CR liegen alle drei Verbindungen außerhalb der signifikanten Bereiche der Differentialanalyse.

Für die Features $C_{22}H_{32}O_2$ und $C_{20}H_{30}O_2$ gibt es ferner auch eine Übereinstimmung mit Docosahexaensäure bzw. Eicosapentaensäure aus der Datenbank BioCyc. Box-Plots zu diesen Features können dem Anhang entnommen werden (Abbildungen 30 und 31)

a)



b)



c)

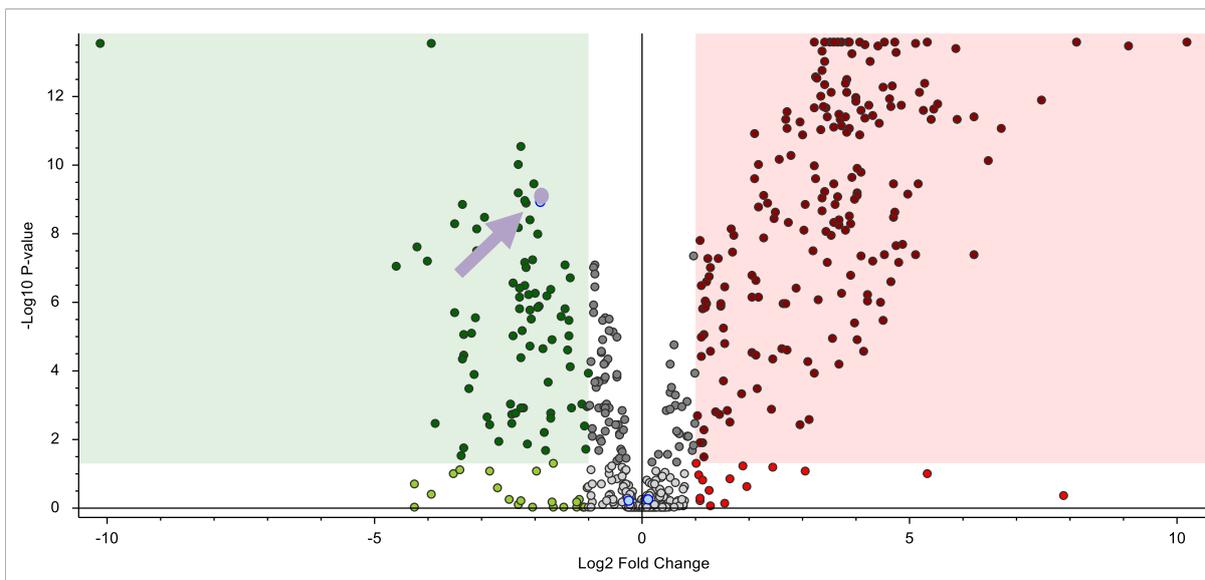


Abbildung 15: Volcano-Plots der Differentialanalysen zu *C. granii* (a), *C. radiatus* (b) und *C. walesii* (c) im zweiten Experiment mit den Signifikanzgrenzen $p = 0.05$ und $\log \log fc = 2$; Die betrachteten Features $C_{22}H_{32}O_2$ (blau), $C_{20}H_{30}O_2$ (orange) und $C_{16}H_{26}O_2$ (lila) sind farbig markiert, wenn sie in den Signifikanzfenstern liegen.

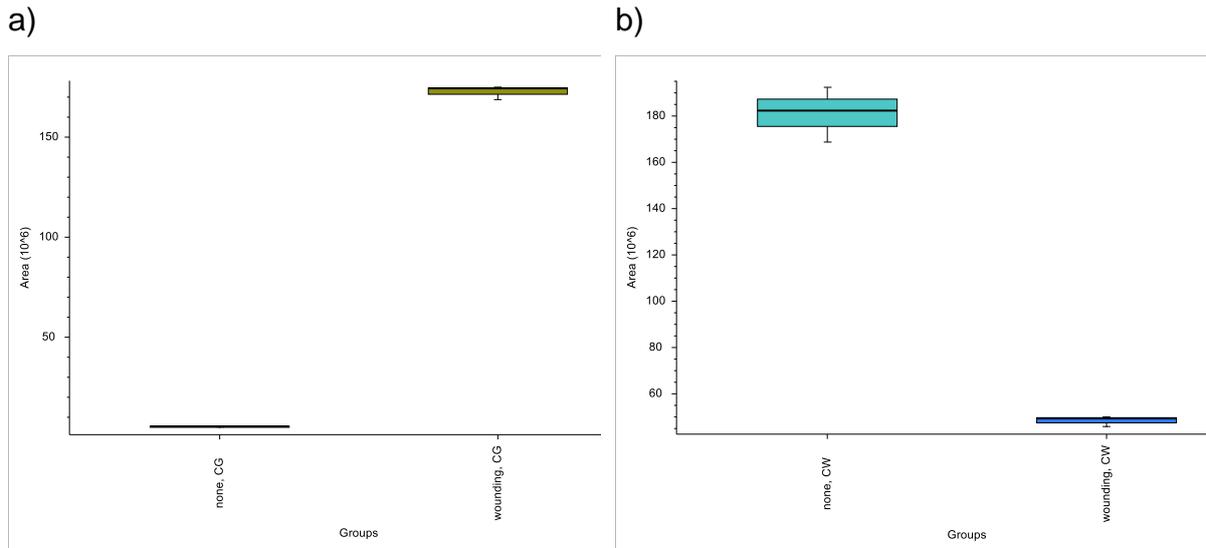


Abbildung 16: Box-Whisker-Plots in *C. granii* (a) und *C. wailiesii* (b) mit der Kontrollgruppe (none) und verwundeten Gruppe (wounding) zu dem Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA); t-Test: $p = 4.4E^{-14}$ (für CG) und $p = 1.2E^{-9}$ (für CW)

Extraktionsmethode B

Die Messdaten wurden hier getrennt nach Spezies prozessiert und werden demnach auch separat voneinander vorgestellt. Zudem wurde für jede Spezies sowohl das Endo- als auch das Exometabolom vermessen.

C. granii

Es wurden insgesamt 4 der gesuchten Features im Rahmen der Targeted Analysis gefunden. Dazu gehören $C_{22}H_{32}O_2$, $C_{20}H_{32}O_3$, $C_{20}H_{30}O_2$, und $C_{16}H_{26}O_2$, bei denen es sich anhand der Summenformeln um DHA, HETE, EPA und HDTA handeln könnte. Die Differentialanalyse bei einem p-Schwellenwert von 0.05 und log fc-Wert-Schwellenwert von 1 zeigt im Exometabolom eine signifikante Hochregulation aller vier Features, während im Endometabolom mit $C_{22}H_{32}O_2$ nur eine statistisch signifikante Verbindung zu sehen ist (Abbildung 17).

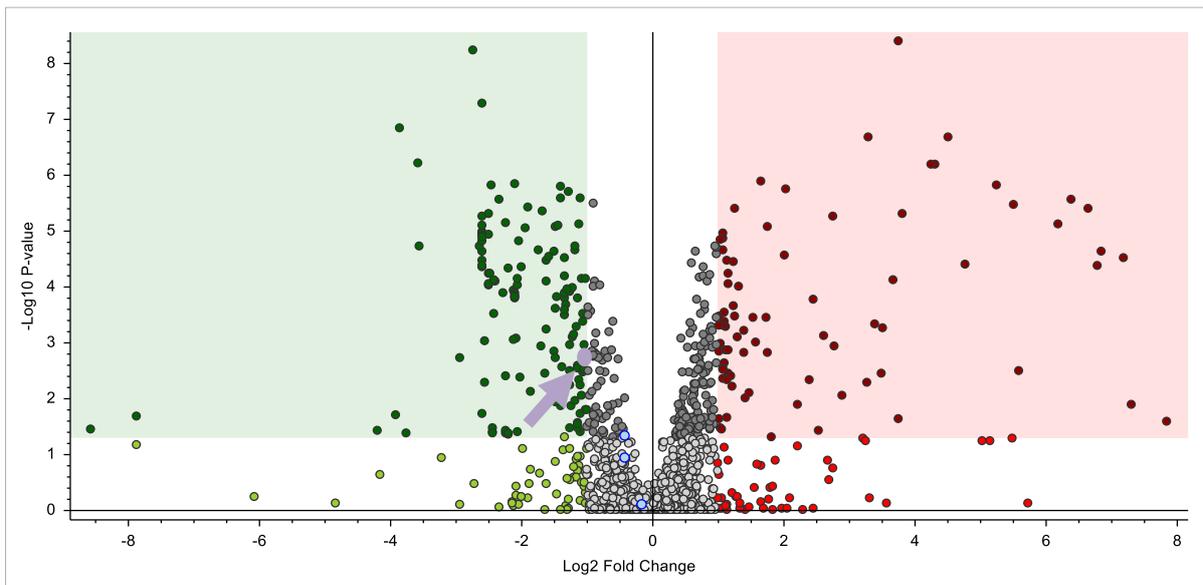
In Abbildung 18 ist der Box-Plot von $C_{22}H_{32}O_2$ dargestellt. Während es im Endometabolom wahrscheinlich zu einer Herunterregulation des Features kommt ($p < 0.01$, $\log fc > 1$) findet im Exometabolom vermutlich eine Hochregulation statt

Ergebnisse

($p < 0.001$, $\log_2 fc > 1$). Dies spricht für eine Produktion der Verbindung in den Zellen und eine anschließend verstärkte Abgabe ins Medium.

Außerdem ergab sich für die Features mit den Formeln $C_{22}H_{32}O_2$, $C_{20}H_{32}O_3$ und $C_{20}H_{30}O_2$ Datenbanktreffer für die entsprechenden Verbindungen in BioCyc. Zugehörige Box-Plots können dem Anhang entnommen werden (Abbildungen 32-34).

a)



b)

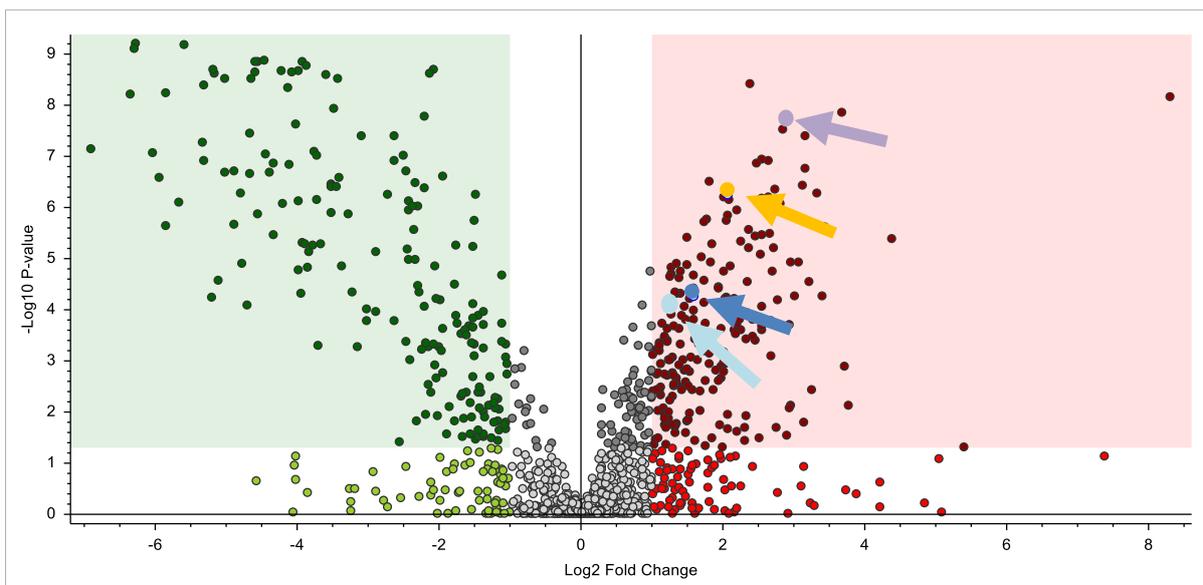


Abbildung 17: Volcano Plots der Differentialanalyse zum Endometabolom von *C. granii* (a) und Exometabolom (b) in Experiment 2 und über Extraktionsmethode B für die Feature mit den Summenformeln $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA, lila), $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE, gelb), $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA, blau) und $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA, türkis);

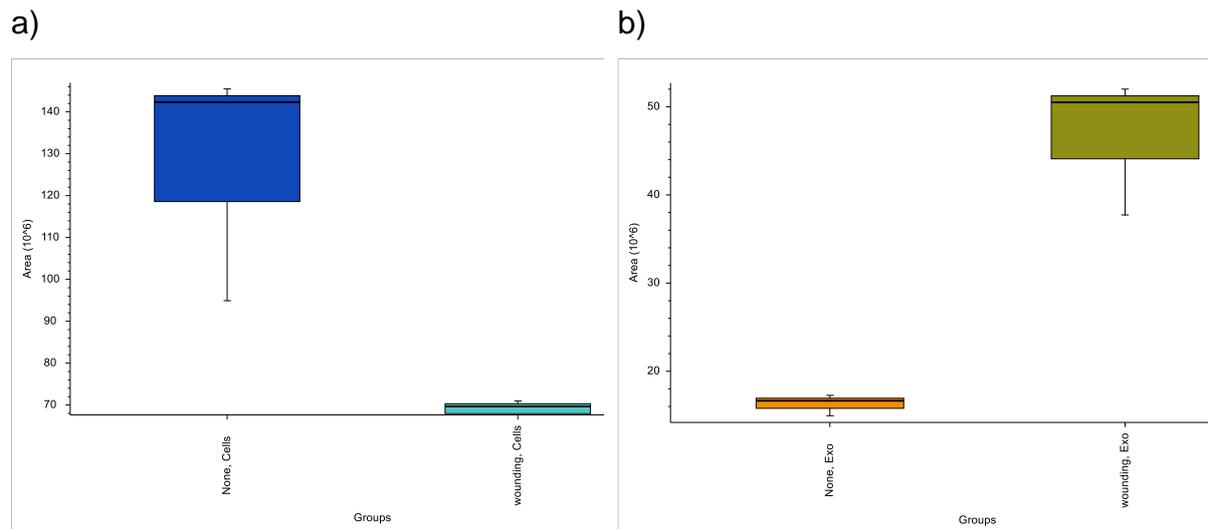


Abbildung 18: Box-Whisker-Plots zum Feature $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA) mit Kontroll- (none) und Verwundungsgruppe (wounding); a) Endometabolom, b) Exometabolom; $p = 2.1E^{-3}$ (Endometabolom), $p = 5.5E^{-5}$ (Exometabolom)

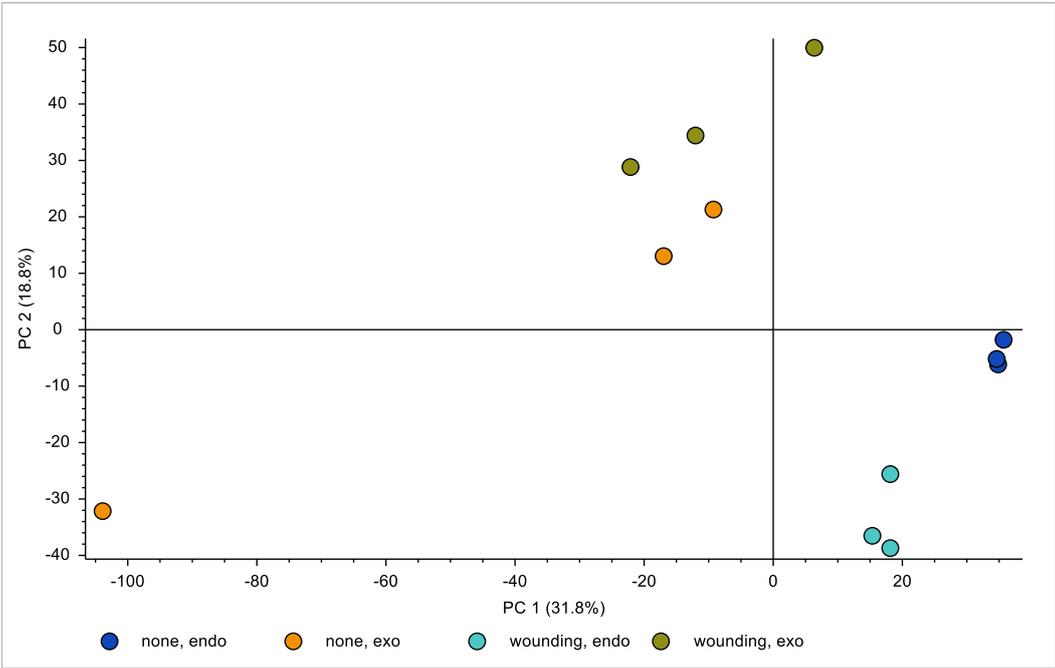
C. radiatus

In der erhaltenen Datenmatrix zu *C. radiatus* wurden die Summenformeln $C_{20}H_{32}O_3$ sowie $C_{20}H_{30}O_2$ gefunden, die auf HETE und EPA hindeuten könnten.

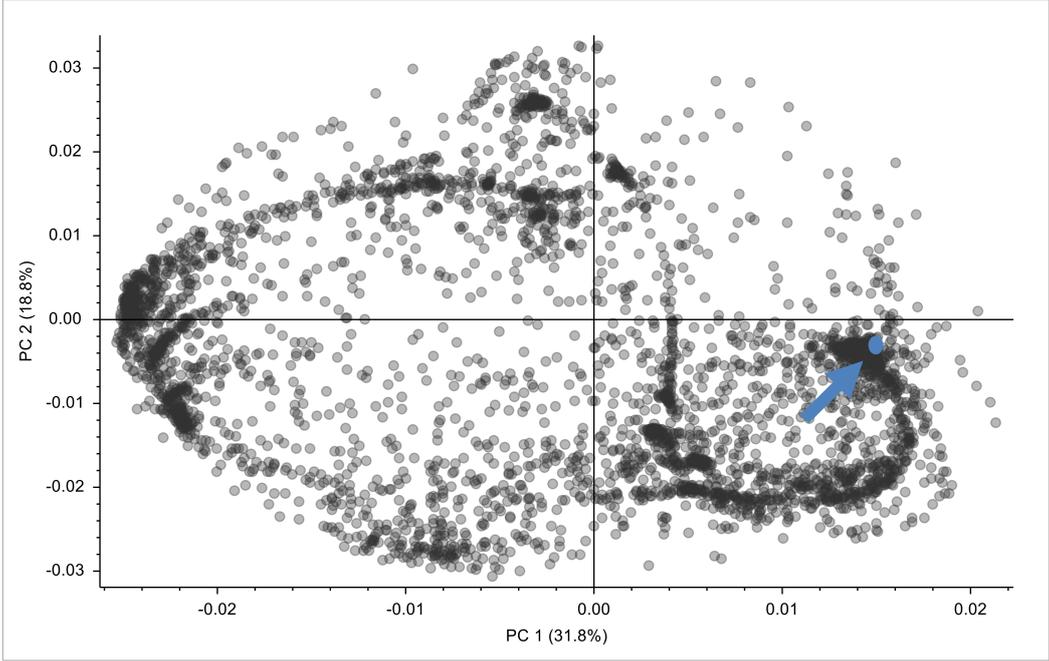
Es findet durch die Verwundung vermutlich eine statistisch signifikante Herunterregulation ($p < 0.05$, $\log fc > 2$) im Endometabolom statt bei $C_{20}H_{30}O_2$ (Abbildungen 19). Anhand des Loadings-Plots der Hauptkomponentenanalyse und dem entsprechendem Score-Plot ist für dieses Feature eine Korrelation zwischen der unbehandelten Messgruppe des Endometaboloms von *C. radiatus* und der Verbindung zu erkennen (Abbildung 19).

Das Feature $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE) liegt außerhalb des Signifikanzfensters im Rahmen der Differentialanalyse in Compound Discoverer.

a)



b)



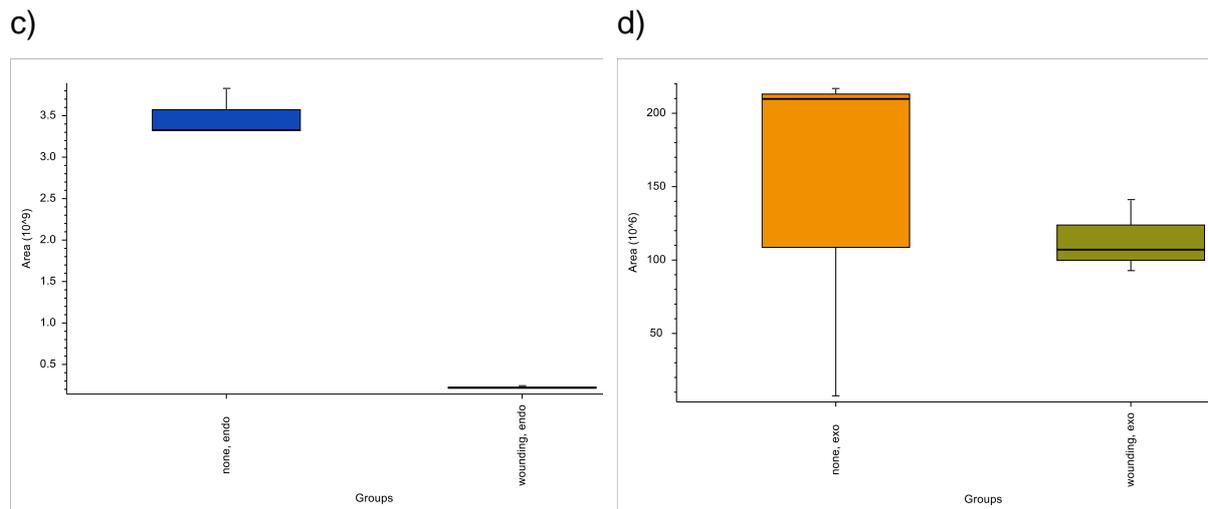


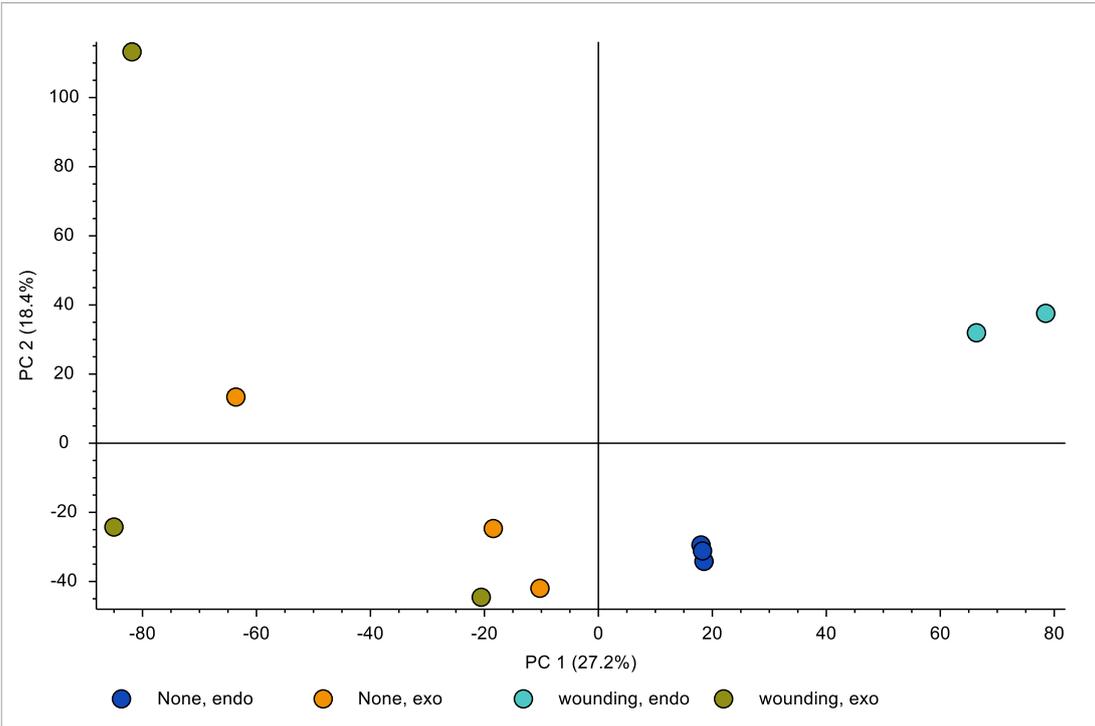
Abbildung 19: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA sowie Box-Whisker-Plots des Features $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA) im Endometabolom (c) und Exometabolom (d) von *C. radiatus* im zweiten Experiment; $p = 3.5 \cdot 10^{-2}$ (Endometabolom); $p > 0.05$ (Exometabolom); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen

C. walesii

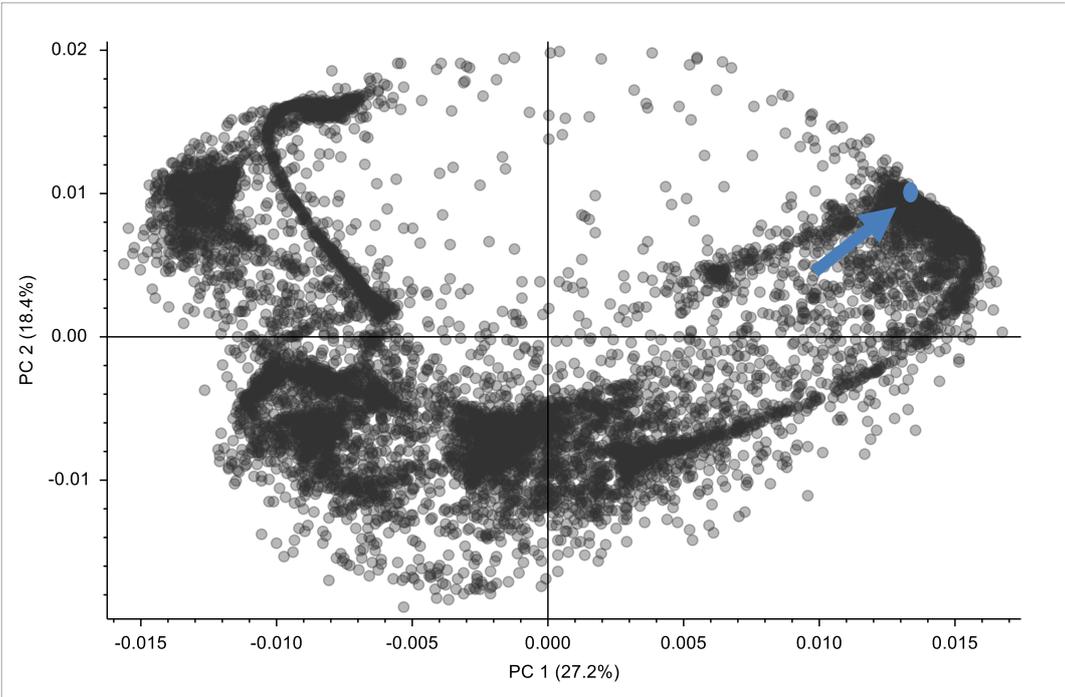
Die Suche in der Datenmatrix ergab zwei Features mit den Summenformeln $C_{20}H_{32}O_3$ und $C_{16}H_{26}O_2$, die wahrscheinlich HETE und HDTA zugeordnet werden könnten.

Statistisch signifikant ist dabei nur die Verbindung $C_{20}H_{32}O_3$ im Endometabolom von *C. walesii*. Im Loadings-Plot der PCA sieht man eine Zugehörigkeit zur Verwundungsgruppe des Endometaboloms von *C. walesii* (Abbildung 20). Zudem zeigt sich im Box-Plot eine signifikante Hochregulation des Features in den Zellen durch die Verwundung ($p < 0.001$, $\log fc > 2$).

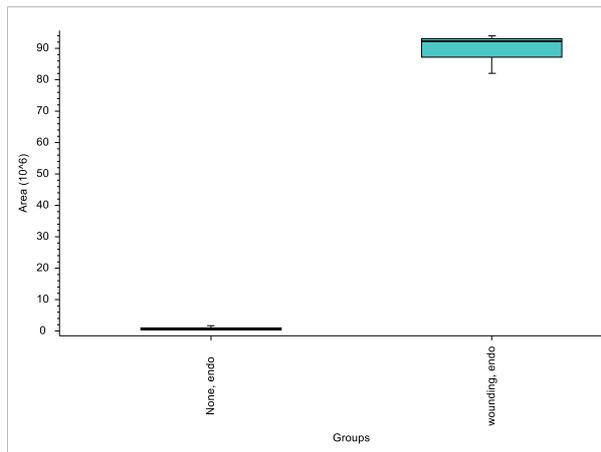
a)



b)



c)



d)

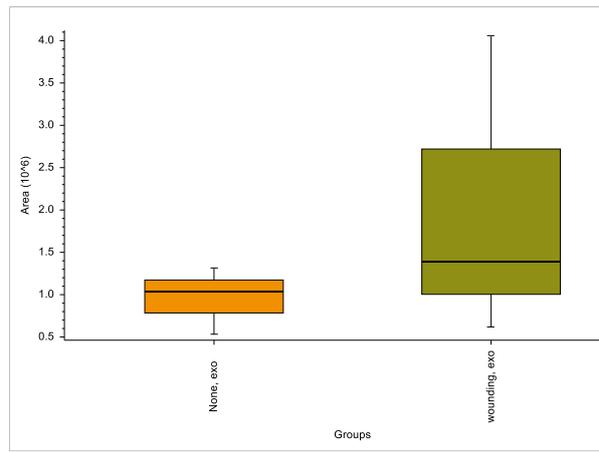


Abbildung 20: Score- (a) und Loadings-Plot (b) der PCA sowie Box-Whisker-Plots des Features $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE) im Endometabolom (c) und Exometabolom (d) mit der Kontrolle (none) und verwundeten Gruppe (wounding) von *C. wailiesii* im zweiten Experiment; $p = 9.05E^{-5}$ (Endometabolom); $p > 0.05$ (Exometabolom); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen

3.2.3 Weitere interessante Features (Untargeted Analysis)

Es wurde neben der Targeted Analysis noch eine Untargeted Analysis durchgeführt, um zu untersuchen, ob noch weitere interessante Features gefunden werden, bei denen es sich möglicherweise um Oxylipine oder PUFAs handeln könnte. Die Ergebnisse der Untargeted Analysis sind getrennt nach den beiden Extraktionsmethoden in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt. Alle gelisteten Metabolite sind sowohl signifikant anhand der Tests in Compound Discoverer ($p < 0.05$, $\log_{fc} > 2$) als auch anhand der Resultate der ANOVA über MetaboAnalyst ($p < 0.05$, Fisher's LSD). Alle zeigen vielsprechende Treffer in den Datenbanken BioCyc und/oder ChemSpider (Spalte D in den Tabellen).

Man sieht, dass vor allem C₂₀-Oxidationsprodukte von EPA gefunden wurden. Außerdem mit den Prostaglandinen auch Abbauprodukte der Arachidonsäure (C₂₀H₃₂O₂). Über Methode B wurde zudem noch ein mögliches C₂₂-Oxidationsprodukt von DHA in *C. radiatus* entdeckt, das eine Hydroxylfunktion und Epoxyfunktion enthält (EpHDHE). Der Großteil der Verbindungen wurde dabei bei positiver Polarität entdeckt.

Extraktionsmethode A

Feature	MW / u	RT / Min	+/-	log _{fc}	p-Wert	Spezies	Vermutl. Verbindung
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.2184	11.9	-	3.98	2.2E ⁻¹⁰	CG	HEPE
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316.2035	8.4	+	3.31	1.1E ⁻⁵	CW	Prostaglandin
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.1983	8.14	+	> 2	< 0.001	CG, CW	EpHEPE

Tabelle 4: Übersicht über weitere gefundene Features im zweiten Experiment (Extraktionsmethode A), die möglicherweise zur Gruppe der Oxylipine gehören, gefunden in den Spezies *C. granii* (CG) und *C. walesii* (CW)

Extraktionsmethode B

Feature	MW / u	RT / Min	+/-	logfc	p-Wert	Spezies	Vermutl. Verbindung
C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334.2135	11.3	-	2.47	3.7E ⁻⁶	CG Exo	EpHETE
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316.2034	11.3	+	2.66	9.5E ⁻⁵	CG Exo	Prostaglandin
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.2193	11.3	+	2.42	2.2E ⁻³	CG Exo	HEPE
C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	8.4	+	3.27	2.7E ⁻³	CR Endo	EpHDHE

Tabelle 5: Übersicht über weitere gefundene Features im zweiten Experiment (Extraktionsmethode B), die möglicherweise zur Gruppe der Oxylipine gehören, gefunden in den Spezies C. granii (CG), C. radiatus (CR) und C. wailesii (CW) im Exometabolom (Exo) oder Endometabolom (Endo)

3.3 Experiment 3: PUFA-Modulation in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* durch eintägige Exposition mit *L. coscinodisci*

Als Grundlage für diesen Teil wurde die Hypothese aufgestellt, dass die drei verschiedenen Diatomeenspezies *Coscinodiscus granii*, *Coscinodiscus radiatus* und *Coscinodiscus wailesii* unterschiedliche Lipidproduktionen durch einen kurzzeitigen Kontakt mit dem Pathogen *L. coscinodiscus* aufweisen. Deshalb wurde ein metabolisches Experiment durchgeführt, um die Stoffwechselprofile zwischen einer Kontrollkultur und einer kurzzeitig mit *L. coscinodiscus* exponierten Kultur der drei Arten mit Fokus auf die Lipide zu vergleichen.

Dafür wurden biologische Replikate der Kulturen erstellt und über einen direkten Kontakt mit dem Oomyceten *Lagenisma Coscinodisci* über 24 Std. exponiert. Im Anschluss wurde eine kleine Menge Methanol zugegeben, für 15 Minuten lysiert und danach zentrifugiert. Das Exometabolom wurde anschließend abgetrennt und über eine SPE mit Methylformiat extrahiert. Das Endometabolom wurde separat mit Methanol extrahiert (siehe auch Workflow in Abbildung 21), lysiert und nach Zentrifugation der Überstand entnommen und vermessen. Darüber hinaus wurde die Zelldichte nach der eintägigen Exposition bestimmt.

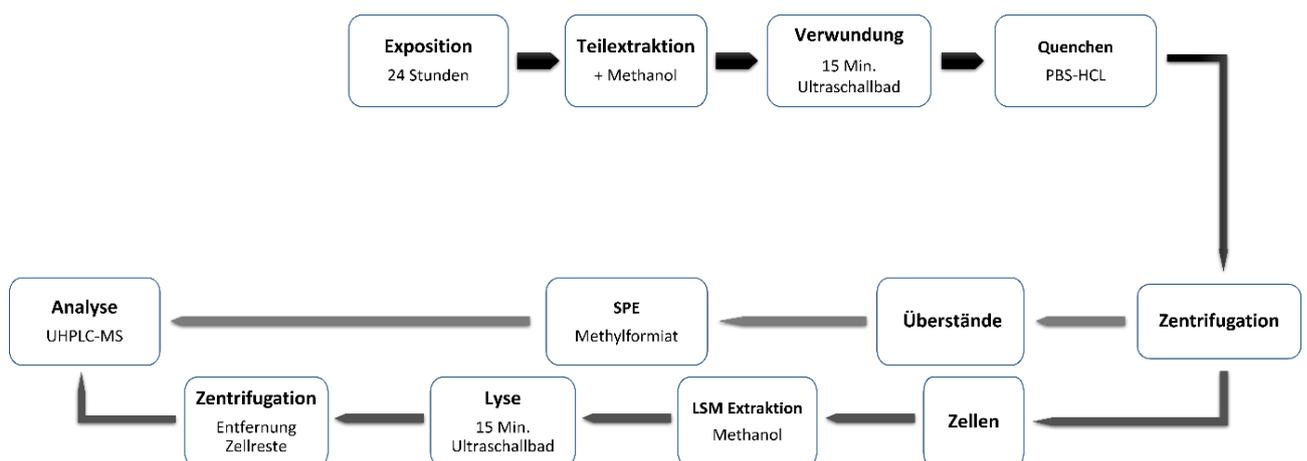


Abbildung 21: Workflow Extraktion und Messung Experiment 3

Die Analytik erfolgte mittels UHPLC-MS sowohl im ddMS, als auch im PRM-Modus für eine Dauer von 16 Minuten. Um auszuschließen, dass es sich bei den gefundenen Metaboliten um Stoffwechselprodukte des Parasitoiden handelt, wurde bei allen

Expositionsexperimenten stets ein Blank von *L. coscinodisci* komplett analog zu den anderen Proben extrahiert und vermessen.

Im Anschluss wurden die Daten über Compound Discoverer prozessiert und die erhaltene Featurliste mit Hilfe von MetaboAnalyst für statistische Tests online analysiert. Dafür wurden die Ergebnisse der Zelldichtebestimmung nach der Exposition als Normalisierungsfaktor miteinbezogen (Abbildung 22) und eine logarithmische Transformation und Pareto-Skalierung durchgeführt.

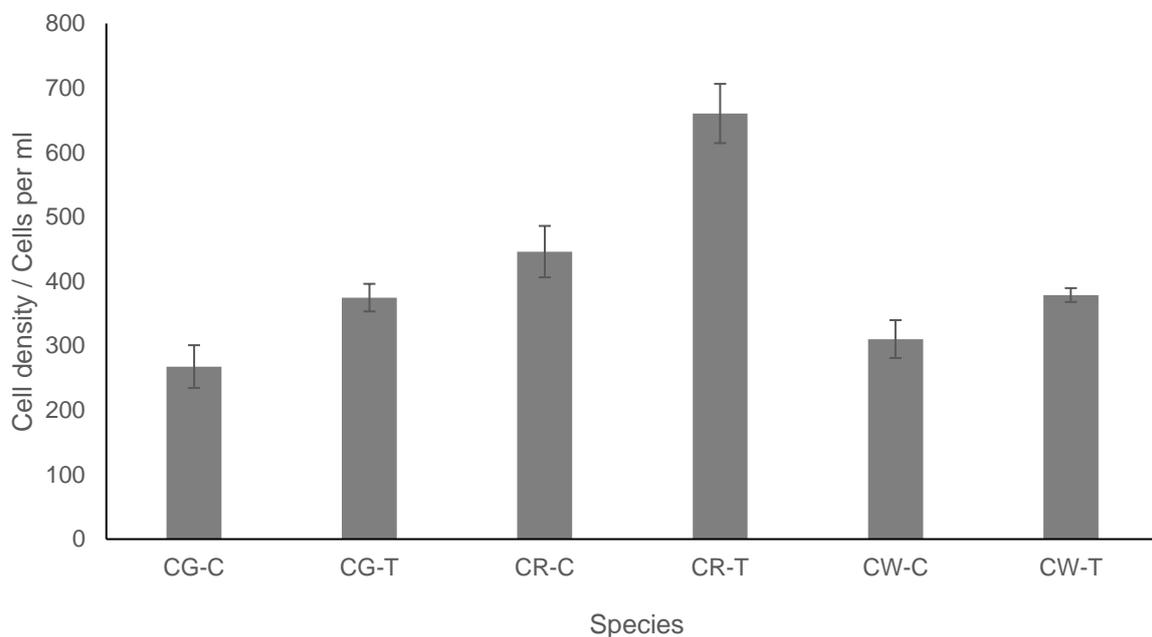


Abbildung 22: Säulendiagramm mit den bestimmten Zelldichten für die Kontrollen (C) und Expositionsgruppen (T) der Spezies *C. granii* (CG), *C. radiatus* (CR) und *C. waillesii* (CW) mit Standardabweichung

3.3.1 Überblick über die Ergebnisse

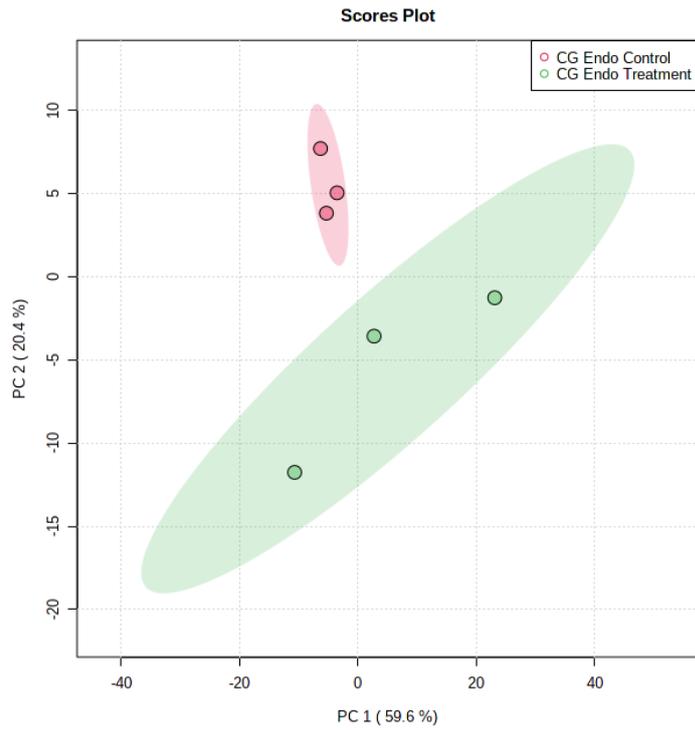
Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen über die Varianzdifferenzen darstellen zu können. Die Daten wurden getrennt nach Spezies prozessiert und werden folglich auch separat dargestellt.

Aus Compound Discoverer wurde für das Endometabolom von *C. granii* eine Datenmatrix mit 679 Features (2286 im Exometabolom) gewonnen, von denen 649 (1975 im Exometabolom) eine Summenformel zugeordnet werden konnte. Die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 23) zeigt eine Separation vor allem im Endometabolom. Der Hauptunterschied zwischen den Gruppen liegt entlang der signifikanteren PC1, was dafürspricht, dass das Experiment für den zellulären Teil erfolgreich war. Im Exometabolom sieht man jedoch kaum Separation. Die Gruppen überschneiden sich hier deutlich.

Für *C. radiatus* wurden im Endometabolom 413 (880 Exometabolom) Features gefunden, davon 403 (830) mit Summenformel annotiert. Im Endometabolom sieht man eine deutliche Trennung zwischen den beiden Clustern für die Kontrolle und die Expositionsgruppe (Abbildung 24). Diese Trennung folgt entlang der ersten Hauptkomponente, die hier eine Signifikanz von 70.5 % einnimmt. Im Exometabolom überschneiden sich beide Gruppen wieder deutlich, es ist keine Separation zu erkennen.

Bei *C. waillesii* liegt am wenigsten Differenz in den Varianzen vor (Abbildung 25). Im Endo- und Exometabolom sind die Cluster nicht separiert, der Versuch scheint in diesem Fall nicht erfolgreich gewesen zu sein. Die Datenmatrix enthält 184 Features im Endometabolom (651 Features im Exometabolom), von denen 174 (610) eine Summenformel zugeordnet wurde.

a)



b)

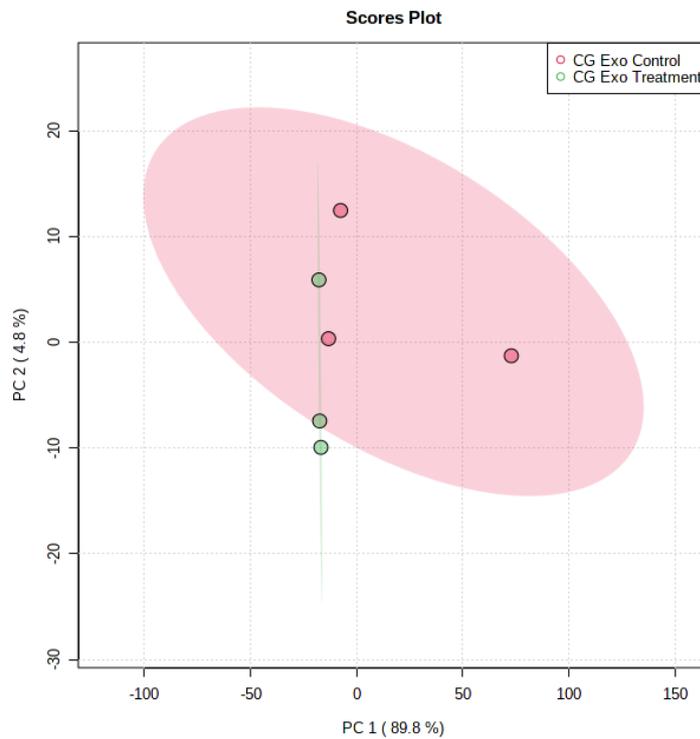
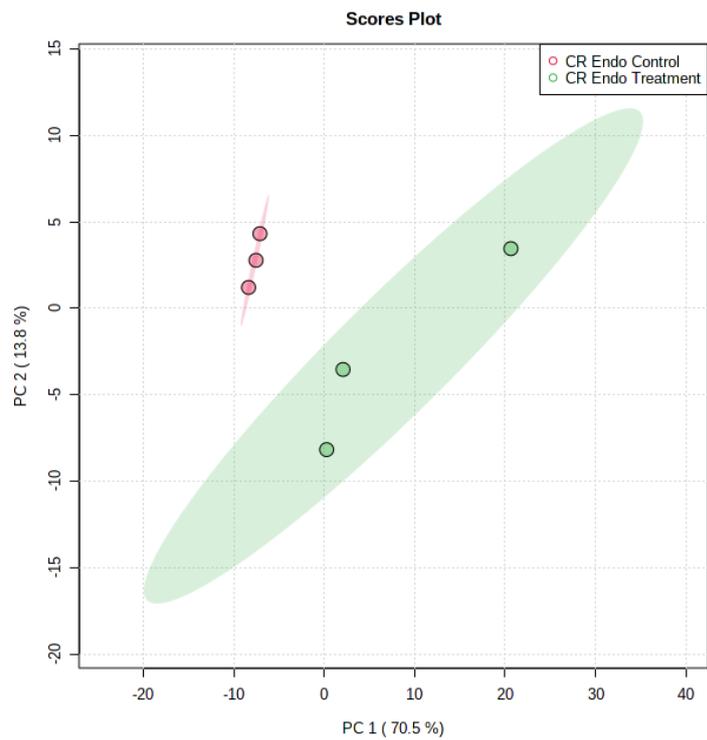


Abbildung 23: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von *C. granii* (CG) mit den unbehandelten Kontrollgruppen (Control) und denen nach 24 Stunden Exposition mit *L. coscinodisci* (Treatment); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen; Zusätzlich sind die 95%-Confidence-Bereiche eingezeichnet

a)



b)

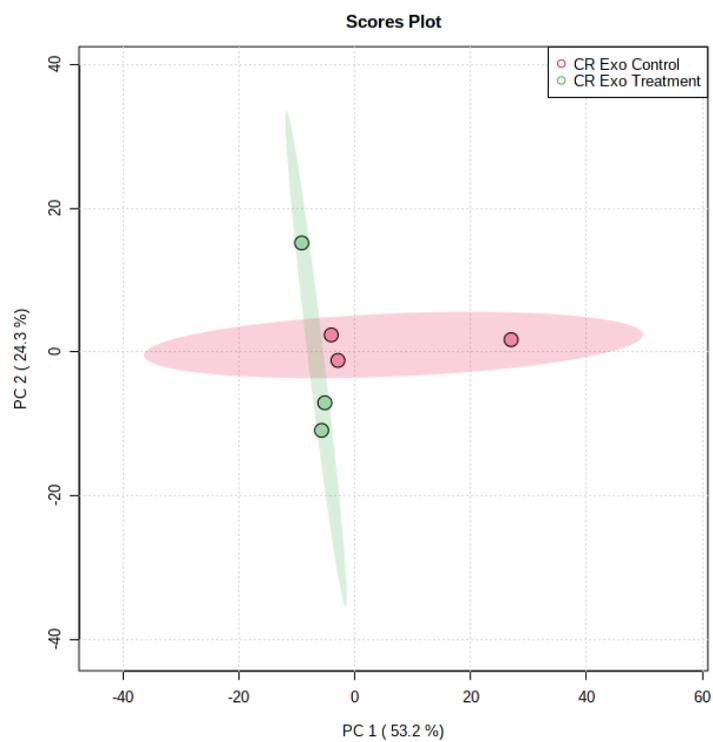
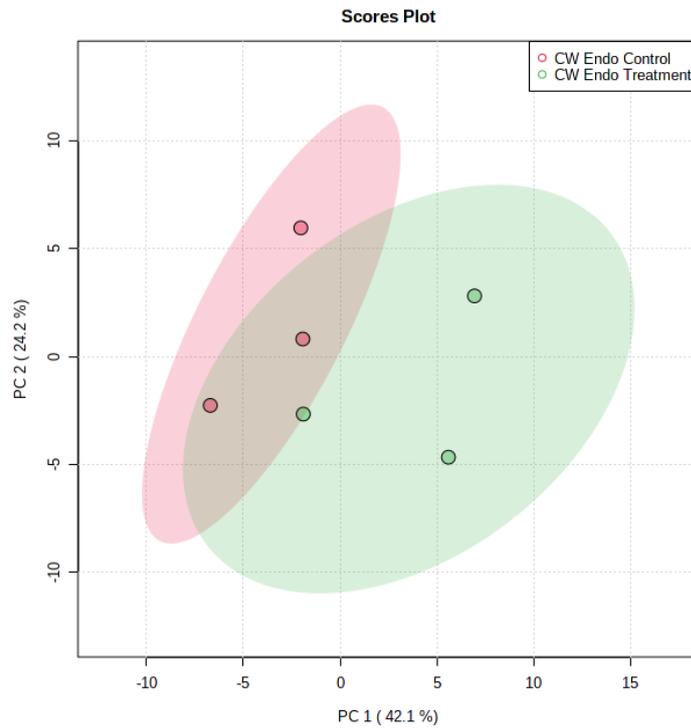


Abbildung 24: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von *C. radiatus* (CR) mit den unbehandelten Kontrollgruppen (Control) und denen nach 24 Stunden Exposition mit *L. coscinodisci* (Treatment); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen; Zusätzlich sind die 95%-Confidence-Bereiche eingezeichnet

a)



b)

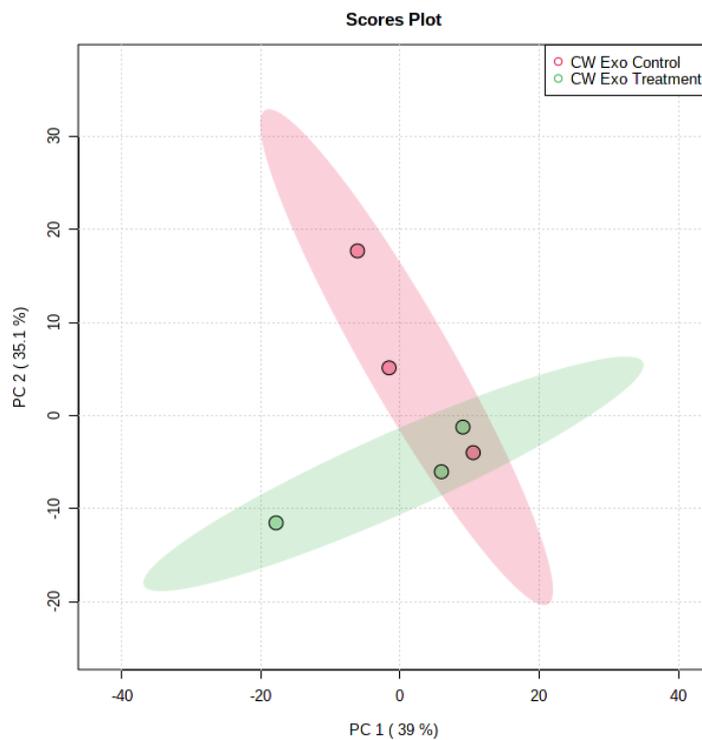


Abbildung 25: PCA Score Plots für das dritte Experiment; Endo- (a) und Exometabolom (b) von *C. wailesii* (CW) mit den unbehandelten Kontrollgruppen (Control) und denen nach 24 Stunden Exposition mit *L. coscinodisci* (Treatment); Das Exometabolom (exo) steht dabei für die in das Medium abgegebenen, das Endometabolom (endo) für die in den Zellen produzierten Verbindungen; Zusätzlich sind die 95%-Confidence-Bereiche eingezeichnet

3.3.2 Gezielte Suche nach spezifischen Verbindungen (Targeted Analysis)

Für die Targeted Analysis sollte anhand der Summenformeln gezielt nach den Verbindungen aus Tabelle 1 in der Datenmatrix gesucht werden. Es werden Box-Whisker-Plots gezeigt, um die Modulation der Metaboliten durch die Exposition abschätzen zu können. Diese wurden hier durch eine weitere Analyse der Datenmatrix aus Compound Discoverer über Metaboanalyst erhalten. Nach der Normalisierung über die Zelldichte, eine logarithmische Transformation und Pareto-Skalierung wurde ein t-Test angewandt, um statistisch signifikante Features aufzuspüren und Differenzen in den Mittelwerten der behandelten und Kontrollgruppe festzustellen ($p < 0.05$). Die Ergebnisse der Targeted Analyse werden hier ebenfalls getrennt nach den Spezies vorgestellt.

C. granii

Aus den 649 annotierten Einträgen in der Datenmatrix des Endometaboloms konnte bei *C. granii* eine der gesuchten Summenformeln gefunden werden. Es ist die Verbindung mit der Zusammensetzung $C_{16}H_{26}O_2$, bei der es sich vermutlich um HDTA handelt. Der t-Test ($p < 0.05$) über MetaboAnalyst, der mit der Matrix angewandt wurde, lieferte insgesamt 92 signifikante Features, darunter auch die Verbindung mit der Summenformel $C_{16}H_{26}O_2$. Sie zeigt durch den Kontakt mit dem Parasitoiden eine Hochregulation (Abbildung 26).

In der Datenmatrix zum Exometabolom konnten Features mit den Formeln $C_{20}H_{30}O_2$ und $C_{16}H_{26}O_2$ gefunden werden. Diese entsprechen wahrscheinlich den Verbindungen Eicosapentaensäure und Hexadecatriensäure. Der t-test lieferte für die gesamte Matrix 53 signifikante Features. Die entdeckten Features gehören nicht dazu. EPA konnte durch MSMS-Daten und einen Standard gemäß Stufe 1 nach Schymanski et al.^[99] identifiziert werden (Abbildung 35, Anhang). Die Fragmentierungsmuster stimmen überein, die Abweichung in der Retentionszeit beträgt 0.1 Minuten.

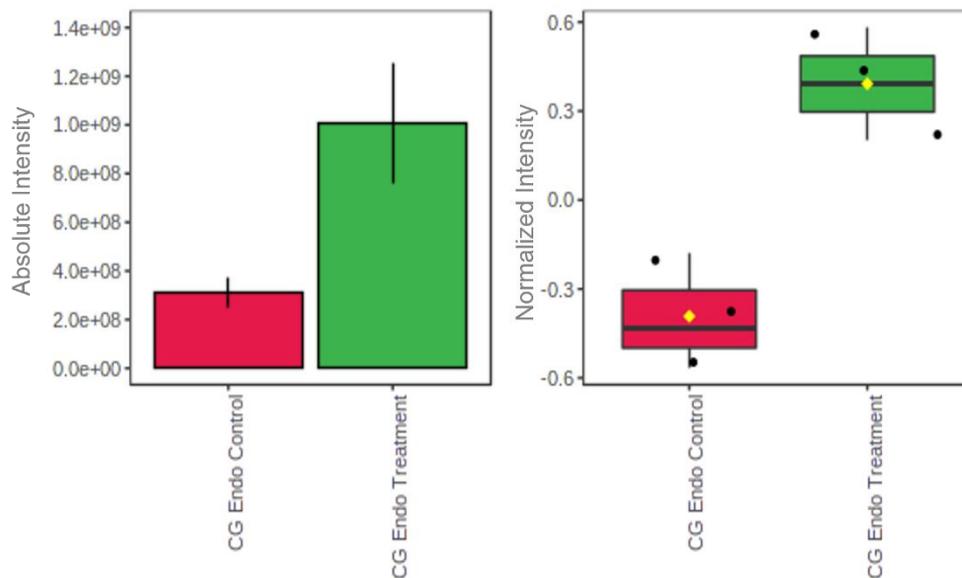


Abbildung 26: Säulendiagramm (links) mit Standardabweichung vor und Box-Whisker-Plot (rechts) nach der Normalisierung über die Zelldichte und log Transformation, sowie Pareto-Skalierung über MetaboAnalyst zu dem Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA) in *C. granii* (CG); $p = 7.63E^{-7}$

C. radiatus

Im Endometabolom von *C. radiatus* konnten keine der gesuchten Features für die Targeted Analysis gefunden werden. Der entsprechende t-Test (p-Schwellenwert: 0.05) lieferte 93 signifikante Ergebnisse.

In der Datenmatrix zum Exometabolom konnten Metabolite mit den Summenformeln $C_{22}H_{32}O_2$, $C_{20}H_{30}O_2$ und $C_{16}H_{26}O_2$ gefunden werden, die vermutlich den PUFAs DHA, EPA und HDTA entsprechen. Der zugehörige t-Test ($p < 0.05$) zeigte 38 signifikante Features (darunter keine der entdeckten Verbindungen).

C. wailesii

In der Datenmatrix zum Endometabolom von *C. wailesii* wurden unter den 174 mit Summenformel annotierten Features keine der gesuchten Formeln aus der Targeted Analysis entdeckt. Ferner lieferte der t-Test über MetaboAnalyst 19 signifikante Features ($p < 0.05$). In den Daten des Exometaboloms wurden unter den 610 annotierten Features die Summenformeln $C_{22}H_{32}O_2$ und $C_{20}H_{30}O_2$ entdeckt, die wahrscheinlich DHA und EPA entsprechen. Der t-Test ($p < 0.05$) lieferte 10 statistisch

signifikanten Features innerhalb dieser Datenmatrix (darunter keine der gefundenen Verbindungen)

3.3.3 Weitere interessante Features (Untargeted Analysis)

Da die Hauptkomponentenanalysen für das Endometabolom von *C. granii* und *C. radiatus* (Abbildungen 23 und 24) implizieren, dass für den zellulären Teil die Experimente erfolgreich verliefen und durch die Exposition eine Veränderung im Metabolom auftritt, wurde im Hinblick auf die Untargeted Analysis untersucht, welche Metaboliten dafür verantwortlich sein können. Deshalb wurden die Ergebnisse der t-Tests zum Endometabolom von *C. granii* und *C. radiatus* weiter optimiert, indem eine Benjamini-Hochberg-Korrektur der p-Werte durchgeführt wurde (Abbildung 27). Dadurch verbleiben die Features mit hoher statistischer Robustheit. Innerhalb dieser wurde dann nach vielversprechenden Verbindungen gesucht.

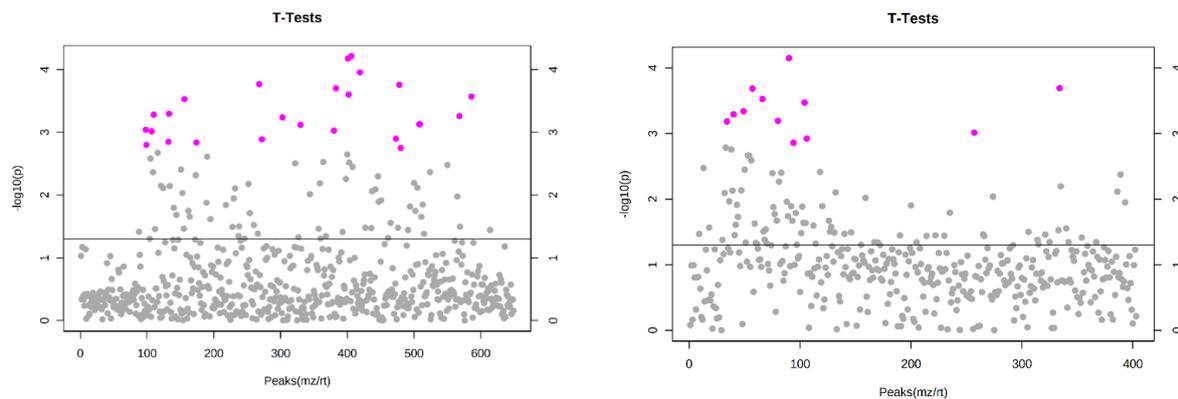


Abbildung 27: Ergebnisse des t-Tests für das Endometabolom von *C. granii* (links) und *C. radiatus* (rechts) nach 24h Exposition mit *L. coscinodisci*; Es sind 25 (*C. granii*, pink markiert) bzw. 12 (*C. radiatus*, pink markiert) signifikante Features zu erkennen; Es wurden gleiche Varianzen in Kontrolle und Testgruppe angenommen, sowie eine Benjamini-Hochberg-Korrektur vorgenommen; Die horizontale Linie zeigt den Schwellenwert für die unkorrigierten p-Werte bei $p = 0.05$

Mit Fokus auf potenzielle PUFAs und Oxylipine konnte in beiden Datensätzen eine Verbindung entdeckt werden. Es handelt sich dabei um ein Feature im Endometabolom von *C. granii* mit der Summenformel $C_{20}H_{32}O_2$, das zu den signifikanten Metaboliten gehört ($p < 0.001$) und durch die Exposition in *C. granii* hochreguliert wird (Abbildung 29).

Die Summenformel deckt sich mit der von Arachidonsäure, die als PUFA Ausgangsprodukt für verschiedene Oxylipine ist.

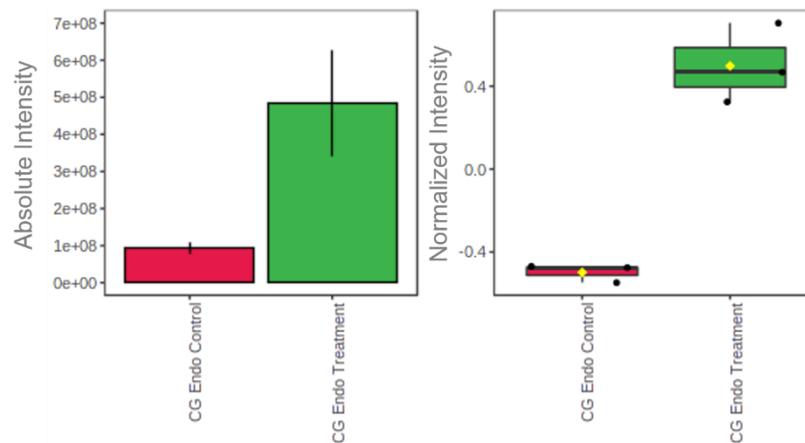


Abbildung 28: Säulendiagramm (links) mit Standardabweichung vor und Box-Whisker-Plot (rechts) nach der Normalisierung über die Zelldichte und log Transformation, sowie Pareto-Skalierung über MetaboAnalyst zu dem Feature $C_{20}H_{32}O_2$ (vermutlich Arachidonsäure) in *C. granii* (CG); $p = 9.39E^{-4}$

Weiterhin wurden die Datenmatrizen jeder Spezies (Exo- und Endometabolom zusammen) nach anderen interessanten Features durchsucht, die zur Familie der Oxylipine und PUFAs gehören könnten. Dafür wurden sie über MetaboAnalyst und die Zelldichte normalisiert, in logarithmische Werte transformiert und eine Pareto-Skalierung angewandt. Anschließend wurde eine ANOVA (p-Schwellenwert: 0.05, Post-hoc-Analysis: Fisher's LSD) durchgeführt. Alle über ANOVA erhaltenen signifikanten Features wurden daraufhin anhand der Summenformeln mit der Datenbank der Wertz Group, sowie BioCyc und ChemSpider abgeglichen. Die Ergebnisse dieser Suchen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Es ist zu sehen, dass die (vermutlich) gefundenen Prostaglandine, analog zu den Ergebnissen in Experiment 2, im positiven Modus detektiert wurden, während die PUFAs DPA und SA (und HEPE) im höheren Retentionszeitfenster vor allem bei negativer Polarität gefunden wurden.

Ergebnisse

Feature	MW / u	RT / Min	+/-	Spez.	F-Wert	p-Wert	Vermutl. Verbindung
C ₂₂ H ₃₄ O ₂	330.2544	14.9	-	CG	60.62	7.63E-6	DPA
C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276.2080	13.6	-	CG	52.441	1.32E-5	SA
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.2182	12.1	-	CR	249.75	3.05E-8	HEPE
	318.2182	12.2	-	CW	32.652	7.75E-5	
C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374.2080	10.9	-	CR	27.959	1.36E-4	Resolvin
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.1981	8.1	+	CG	147.39	2.4E-7	PGB3
	332.1982	8.3	+	CR	59.237	8.33E-6	
	332.1982	8.2	+	CW	85.414	2.04E-6	
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316.2035	8.1	+	CR	13.764	1.59E-3	PGJ2
	316.2033	8.2	+	CW	19.34	5.04E-4	

Tabelle 6: Übersicht über alle weiteren gefundenen Features im dritten Experiment, die zur Gruppe der Oxylipine und PUFAs gezählt werden könnten; CG: *C. granii*, CR: *C. radiatus*, CW: *C. wailiesii*

4 Diskussion der Ergebnisse und biologische Einordnung

4.1 Experiment 1: Modulation von PUFAs in *C. granii* durch dreißigminütige Exposition mit *L. coscinodisci*

Im ersten Experiment sollte untersucht werden, ob durch den dreißigminütigen Kontakt mit dem Parasitoid *L. coscinodisci* die Produktion von Oxylipinen und deren Precursoren, den PUFAs, in *Coscinodiscus granii* induziert wird. Es lieferte in der Targeted Analysis drei Features, bei denen es sich möglicherweise um die Verbindungen Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und Hexadecatriensäure handelt. Erstere konnte dabei auf dem höchsten Identifikationslevel nach Schymanski et al.^[99] über die MSMS Daten, die Retentionszeiten und Datenbanksuchen identifiziert werden.

Für eine robuste Beurteilung sind die erhaltenen Daten leider noch nicht aussagekräftig genug. So sollten die Messungen optimiert werden, um solidere Aussagen treffen zu können. Zum einen sollten statt technischen Replikaten biologische Replikate verwendet werden, also voneinander separat aufgezogene Kulturen, die dann in gleicher Art und Weise im Labor aufgearbeitet und am selben Tag vermessen werden. Auch die Anzahl der Replikate sollte im Idealfall auf fünf oder sieben erhöht werden. Biologische Replikate verringern die Wahrscheinlichkeit, Veränderungen im Metabolom zu entdecken, die vielleicht nur auf zufälligen Gegebenheiten basieren (siehe auch 4.1.3).^[100]

Weiterhin ist die Bestimmung der Zelldichte ratsam, um den Einfluss verschiedener Zellkonzentrationen auf die vermeintliche Konzentration der Metaboliten bzw. deren Intensität in der Messung kompensieren zu können. Es ist jedoch fraglich ob bei der Verwendung nur eines biologischen Replikats und der Überführung gleicher Volumina aus diesem Replikat in die zwei Probengefäße (für die Kontrolle und die behandelte Kultur) ein signifikanter Unterschied in den Zelldichten auftritt. Auch die sehr kurze Expositionszeit sollte, obwohl es sich bei *C. granii* um eine für den Pathogen anfällige Spezies handelt, keinen signifikanten Einfluss auf die Zelldichte haben, da für die effektive Tötung der Phytoplanktonzellen etwa zwei Tage benötigt werden.^[32]

Im ersten Teil des Experiments wurden zwei unterschiedliche Methoden zur instrumentellen Analytik untersucht. Dabei wurden jeweils leicht verschiedene Säulen, Messzeiten und Lösungsmittel (RP18 Säule mit 14 Minuten Messzeit und Wasser/Methanol/Essigsäure-Phase, C18 Säule mit 16 Minuten Messzeit und Wasser/Acetonitril/Ameisensäure-Phase) verwendet. Sowohl Messzeit als auch Mobile Phase und Säule können einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der zugehörigen Messung haben.^[101] In der RP18-Methode zeigen sich ab Minute 14 mehr Peaks, vor allem aufgrund der längeren Messdauer, aber auch schon davor zwischen Minute 13 und 14, die über die C18-Methode nicht sichtbar sind. Gerade dieser Bereich ist bei einer Reversed-Phase-Chromatographie mit unpolaren Säulen jedoch wichtig, wenn man Lipide nachweisen will. Bei der C18-Methode sind zudem im Exometabolom (positiver Modus) auch andere Peaks bei kleineren Retentionszeiten sichtbar, bei denen es sich aber vermutlich um polarere Substanzen und nicht um Lipide handelt. Die C18-Methode wurde davor bevorzugt für die Detektion von anderen Stoffklassen angewandt^[32], während die RP18-Methode im Lehrstuhl auch schon für vorherige Untersuchungen von Oxylipinen und PUFAs genutzt wurde.^[87] Deshalb wurde Letztere für die weiteren Experimente angewendet.

Im zweiten Teil konnten Features entdeckt werden, die wahrscheinlich den Fettsäuren DHA, EPA und HDTA entsprechen. DHA konnte dabei auch anhand eines Standards und der MSMS-Daten robust identifiziert werden. Eine zuverlässige quantitative Bestimmung zum Beispiel mittels einer Kalibrierlösung von einem Standard, wäre jedoch eine wichtige Erweiterung der Resultate, um auch absolute Konzentrationen bestimmen zu können. Anhand der hier erhaltenen Daten und der Auswertung über MetaboAnalyst kann jedoch für DHA zumindest eine Tendenz abgeschätzt werden. So wird die Säure im Exometabolom der behandelten Gruppe der Alge vermutlich hochreguliert und in den Zellen entsprechend herunterreguliert, was für eine Abgabe der Substanz in das umliegende Medium spricht.

Die Features zu EPA und HDTA zeigen währenddessen keine signifikanten Veränderungen durch die Exposition. In der Literatur gibt es Quellen für die Induktion von EPA und ihrer Abbauprodukte (HEPE, etc.), sowie deren Freisetzung aus Diatomeen durch die Interaktion mit Bakterien.^[18] Für HDTA konnte von Desbois et al. eine antibakterielle Wirkung für Extrakte aus der Diatomeenart *Phaeodactylum*

tricornutum gefunden werden. Darunter auch einen wachstumshemmenden Einfluss auf den marinen Pathogen *Listonella anguillarum*.^[102]

Interessanterweise handelt es sich bei *C. granii* jedoch um eine dem Pathogen *Lagenisma coscinodisci* gegenüber anfällige Spezies, die relativ einfach infiziert wird.^[32] DHA scheint hier also nicht als Verteidigungsmetabolit im Sinne einer erfolgreichen chemischen Verteidigung produziert zu werden. Zwar gibt es in der Literatur Angaben zur Produktion von DHA als Oxylipinprecursor im Rahmen der chemischen Abwehr gegen Bakterien oder Fraßfeinde ^[18,72,103], jedoch nicht gegenüber dem Oomyceten *L. coscinodisci*.

Möglicherweise wirkt es attraktiv dem Pathogen gegenüber und führt so zu einer verstärkten Infektion von *C. granii*. So kann im Rahmen der Chemotaxis die Freisetzung gewisser Metaboliten dazu führen, dass Pathogene von potenziellen Wirten angezogen werden, was letzteren einen höheren Infektionsvorteil und damit einen entscheidenden evolutionären Vorteil verleihen kann. Chemotaxis wurde bereits bei der Infektion anderer Phytoplanktonarten festgestellt.^[53,104] Um diese Hypothese zu überprüfen, wären neben einer Reproduktion des Experiments mit biologischen Replikaten weiterführende Versuche notwendig. So könnten zum Beispiel auch andere Stämme von *C. granii* untersucht werden, um zu überprüfen, ob eine artspezifische Konservierung vorliegt oder nicht. Am besten würde sich jedoch ein Versuch eignen, bei dem Extrakte der Alge mit dem Pathogen in Kontakt gebracht werden, um zu beobachten, ob ein repellierender (abstoßender) Effekt oder Chemotaxis (attraktiver Effekt) vorliegt. Auch ein Bioassay ist eine gute Variante, das Verhalten des Pathogens zu erforschen. Dafür werden die Reinverbindung (in diesem Fall DHA) synthetisiert oder käuflich erworben und mit *L. coscinodisci* in Kontakt gebracht. Anschließend kann man den Einfluss auf den Verlauf des Lebenszyklus und Reproduktionsraten des Oomyceten untersuchen. Erweist sich die direkte Identifikation von Oxylipinen als schwierig, oder auch zur Unterstützung der Ergebnisse kann weiterhin auch ein Enzymassay angewendet werden. Hierbei kann gezielt die Enzymaktivität der Lipoxygenase untersucht werden, um die Produktion von Oxylipinen nachzuweisen.

4.2 Experiment 2: Verwundungsaktivierte Modulation von PUFAs und Oxylipinen in den Diatomeen *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii*

Das zweite Experiment diente der Untersuchung von PUFA- und Oxylipinmodulationen durch Verwundung der Zellen der drei Diatomeenarten *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii*. Da die Algen in der Natur durch diverse Predatoren, wie den Ruderfußkrebsen als Nahrungsquelle genutzt werden, werden bei beginnendem Fraß in einer Algenpopulation einzelne Zellen zerstört, wodurch verwundungsaktiviert Chemikalien produziert und freigesetzt werden können. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass auch PUFAs und Oxylipine zu diesen Chemikalien gehören und zur Verteidigung der Algengemeinschaft gegen die Predatoren genutzt werden können.^[16,17,67] Um diesen Umstand zu untersuchen, kann im Labormaßstab eine mechanische Verwundung des Phytoplankton durchgeführt werden (z.B. durch ein Ultraschallbad). Dieses Vorgehen ist eine einfache Möglichkeit, die natürliche Verwundung möglichst realitätsnah zu simulieren.^[105]

Um die PUFA- und Oxylipinfraktion zu erhalten, wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden angewandt. Bei Methode A wurde aufbauend auf Jagusch et al.^[87] nur das Endometabolom untersucht und mittels Methylformiat als Elutionsmittel in der SPE extrahiert. Bei Methode B wurden Exo- und Endometabolom getrennt. Das Exometabolom wurde über ein SPE und Methylformiat extrahiert, beim Endometabolom erfolgte dies mit Methanol. Anhand Tabelle 2 ist zu sehen, dass die Regulationen der Verbindungen im Endometabolom sehr stark von der Methode abhängen und selbst für den gleichen untersuchten Metaboliten unterschiedliche Modulationen zeigen (z.B. bei DHA in *C. granii*). Deswegen ist hier auch keine erste quantitative Einschätzung möglich. Beide Methoden scheinen sich im Bezug auf den Umfang des Informationsgewinns insgesamt für *C. granii* besser zu eignen als für die beiden anderen Arten. Ein Feature, bei dem es sich vermutlich um HETE handelt, konnte sogar nur über Methode B detektiert werden. Zudem wurden über B insgesamt auch deutlich mehr Features entdeckt (ca. 17 000) als über A (ca. 600).

Die methodenabhängigen Unterschiede liegen zum größten Teil an der Art der Extraktion und den Messumständen. So wurde das Endometabolom bei Methode A über eine SPE und Methylformiat aufgearbeitet, während bei B lediglich Methanol

verwendet wurde. Methanol ist ein etwas generalisierteres Lösungsmittel und hat deswegen ein etwas größeres Löslichkeitsfenster als Methylformiat. Dies könnte auch der Grund sein, warum zum Beispiel HETE nur bei Methode B gefunden wurde.

Weiterhin wurde zwar in beiden Fällen für die Messung mit der RP18-Methode gearbeitet, jedoch fand sie an unterschiedlichen Tagen und damit auch mit einer leicht abweichenden Kalibrierung der LC-MS statt. Darüber hinaus wurde keine Qualitätskontrolle (QC) vermessen, was sich unter anderem auch in der enorm hohen Zahl an Features für die Datenmatrix von *C. walesii* über Methode B zeigt (> 12 000). Bei der QC handelt es sich um eine zusätzliche Probe, die eine gepoolte Mischung aller anderen Proben enthält. Sie wäre bei jedem Messdurchgang für die Normalisierung und Reproduzierbarkeit wichtig und hätte dementsprechend auch Auswirkung auf die erhaltenen Tendenzen für eine Hoch- oder Herunterregulation. Zudem würde sich die Anzahl an weniger aussagekräftigen Features, wie im Falle von *C. walesii* verringern. Für Methode B und die Spezies *C. walesii* und *C. radiatus* zeigen sich anhand der PCA Score-Plots auch hohe Varianzen innerhalb einer Gruppe. Da es sich hier aber um technische Replikate handelt, ist dies sehr ungewöhnlich. Weil hierfür exakt die gleiche Probe mehrmals injiziert wurde, lässt sich vermuten, dass Probleme am Instrument vorlagen. Ferner kann es auch sein, dass die vorbereitete Probe sehr inhomogen war, oder eventuell Lufteinschlüsse zu einer fehlerhaften Injektion geführt haben.

Neben der QC ist für zukünftige Experimente, analog zu Experiment 1, die Anfertigung von biologischen Replikaten ratsam.^[100] Auch die Zelldichte zu bestimmen, würde das Ergebnis robuster machen. Da hier für jede Spezies die komplette Extraktion an einem Tag stattfand, und für die Kontroll- und Verwundungskultur das gleiche Volumen aus der gleichen Kulturflasche entnommen wurde, wird die Normalisierung mit der Zelldichte vermutlich jedoch keine übermäßig großen Auswirkungen auf das Ergebnis haben. Auch die Verwendung eines Ultraschallfingers ist eine generelle Alternativmöglichkeit für beide Extraktionsmethoden. Vielleicht handelt es sich hierbei um eine realitätsnähere Simulation von Fraß und es können in der Folge mehr Informationen gewonnen werden. Der Ultraschallfinger wurde bereits in anderen Arbeiten zur Verwundung angewandt.^[73,87] Um eine robustere qualitative Identifizierung zu gewährleisten, wäre zudem die gleichzeitige Vermessung von

Standards und ein Vergleich der MSMS-Daten von Probe und Referenz, sowie eine Datenbankabgleich der Spektren hilfreich, um die Identifikation der Features robuster zu machen.

Neben der methodenabhängigen Modulation der Features ist auch zu sehen, dass sie speziesspezifisch verschieden reguliert werden (Tabelle 2). Es konnten insgesamt zu allen Verbindungen, die in der Targeted Analysis gesucht wurden, passende Features entdeckt werden. Die entsprechenden Verbindungen werden auch typischerweise durch Verwundung von Diatomeenzellen produziert. Eicosapentaensäure wird beispielsweise als Precursor für diverse Oxylipine aus Diatomeen als Folge von Verwundungsreaktionen in der Literatur angeführt.^[67,70] Die Vermutung liegt nahe, dass bei einer Detektion auch entsprechende oxylipinische Produkte auftreten können. Darüber hinaus wurde eine Toxizität von EPA selbst gegenüber Fraßfeinden von Diatomeen festgestellt ^[106], sowie eine teratogene Wirkung auf andere Meeresbewohner, wie zum Beispiel Seeigel.^[72] Für die PUFA HDTA konnten D'Ippolito et al. den Lyxygenase-vermittelten Abbau zu polungesättigten Aldehyden in *Skeletonema costatum* und *Thalassiosira rotula* zeigen.^[107–109] Diese Aldehyde können reproduktionstoxische Eigenschaften gegenüber Fraßfeinden, wie Copepoden, besitzen.^[16,17] Docosahexaensäure, deren oxylipidische Produkte und Hydroxyarachidonsäure (HETE) konnten ebenfalls im Kontext der chemischen Verteidigung als Folge von Zellverwundung festgestellt werden.^[67,72,103]

Vor allem die Art *C. granii* zeigt sich insgesamt als vermutlich sehr potente Produzentin von Oxylipinen bzw. PUFAs durch Verwundung. Nicht nur die Ergebnisse der Targeted Analysis, sondern auch der Untargeted Analysis lassen dies vermuten. Diese Einschätzung deckt sich auch mit den Erkenntnissen von Rettner et al.^[67] In der Untargeted Analysis konnten neben anderen hydroxylierten und epoxyhydroxylierten Abbauprodukten von DHA, AA und EPA auch Features gefunden werden, die vermutlich Prostaglandinen entsprechen. Bei diesen handelt es sich eigentlich um Hormone, die überwiegend in Säugetieren im Zuge von Entzündungen ausgeschüttet werden. Sie wurden aber auch schon in marinen Algen gefunden. Ihre Funktion in Mikroalgen ist jedoch noch nicht ganz geklärt.^[73] Interessant ist, dass die Prostaglandine über den positiven Polarisierungsmodus im MS detektiert wurden. Dies ist eher unüblich, da die Oxylipinanalytik meist über den negativen Modus erfolgt.^[73,110]

Vielleicht ist es somit auch für zukünftige Versuche sinnvoll, beide Polarisierungsmodi zu untersuchen, um Informationsverlust zu vermeiden.

Ein Vorteil der verstärkten PUFA- und Oxylipinproduktion in *C. granii* könnte sich in der Reproduktion während Diatomeenblüten ergeben, da sie sich (chemisch) möglicherweise besser gegen Fraßfeinde verteidigen können und somit einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Phytoplankton- oder Diatomeenspezies haben. Man könnte daher beispielsweise in einem weiterführenden Experiment die Veränderung der Zelldichte bei einer simulierten Verwundung bestimmen und mit denen bei den anderen beiden Spezies vergleichen. Bleibt die Anzahl der Zellen über die Verwundung hinaus stabil, und werden keine morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet (wie sie durch Fraß in Diatomeenpopulationen ausgelöst werden können^[111]) liegt dies vielleicht an einer effektiveren chemischen Verteidigung der untersuchten Art.

Die Tatsache, dass *C. granii* sich bei Verwundung offensichtlich anders verhält als *C. radiatus* und *C. wailesii*, kann aber auch darauf beruhen, dass die Extraktionsmethode für diese Art vielleicht besser geeignet ist und muss in die Beurteilung miteinbezogen werden.

4.3 Experiment 3: Modulation von PUFAs in *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* durch eintägige Exposition mit *L. coscinodisci*

Im dritten Experiment wurde untersucht, ob bei einer Exposition mit dem Parasitoid *L. coscinodisci* über 24 Stunden eine Induktion der Produktion von PUFAs in den Diatomeenspezies *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* stattfindet. Es konnten die beiden Verbindungen Hexadecatriensäure und gefunden werden.

Methodisch wurde hier im Unterschied zu den vorangegangenen Versuchen mit biologischen Replikaten gearbeitet, es wurden also separat aufgezogene Kulturen der Algen verwendet. Diese Art der Replizierung verringert im Vergleich zu technischen Replikaten die Wahrscheinlichkeit, dass gefundene Änderungen nur zufällig auftreten. Durch die Erhöhung der Anzahl zugrundeliegender biologischer Proben wird die Robustheit der Ergebnisse gestärkt. Die Anwendung biologischer Replikate spiegelt sich auch in den Hauptkomponentenanalysen wider. Es zeigen sich große Varianzen innerhalb der Versuchsgruppen, da hier andere Umweltfaktoren miteinfließen und jedes Replikat während der Kultivierung in unterschiedlichen Gefäßen und während der Aufarbeitung in verschiedenen Gefäßen im Labor stets kleinen Abweichungen unterliegt, die im Vergleich zu technischen Replikaten deutlich mehr ins Gewicht fallen. Zudem wurde im Rahmen dieses Experiments die Zelldichte bestimmt und miteinbezogen, da vermeintlich verstärkte oder verringerte Produktionen bestimmter Verbindungen auch lediglich Folge einer unterschiedlichen Zelldichte sein können. Jedoch ist auch die Bestimmung der Zelldichte über eine Zählkammer Fehlern unterworfen, da das Auszählen über das Mikroskop händisch erfolgt und damit sehr abhängig von der zählenden Person ist. Im Idealfall sollte die Zählung von mehreren Personen durchgeführt und im Anschluss gemittelt werden. Da dies zeitintensiv ist, wäre alternativ auch eine kostenintensivere Bestimmung über qPCR oder Fluoreszenzmikroskopie möglich.

Eine genaue quantitative Bestimmung wäre über die Messung von Kalibrierlösungen von Standards möglich und würde somit nicht nur Tendenzen für eine Hoch- oder Herunterregulation liefern, sondern auch absolute Konzentrationen in den Proben.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch den direkten Kontakt mit dem Parasitoiden durchaus Änderungen im Metabolom aufgetreten sind, dabei vor allem im Endometabolom von *C. granii* und *C. radiatus*. Interessant ist, dass nur bei der für den Parasitoiden anfälligen Art *Coscinodiscus granii* eine signifikante Hochregulation von PUFAs vorliegt. Die Induktion der Produktion von HDTA in den Zellen von *C. granii* durch den Kontakt mit dem Oomyceten *L. coscinodisci* könnte demnach auch mit der mangelnden Resistenz von *C. granii* zusammenhängen. Es wirft die Frage auf, ob die Fettsäuren und möglicherweise bei längerer Exposition auftretende Oxidationsprodukte eine attraktive Wirkung auf die Zoosporen des Parasitoids haben könnte. Eine ähnliche Vermutung wurde auch schon in Bezug auf DHA im ersten Experiment aufgestellt (siehe 4.1). Auch im Rahmen der Untargeted Analysis konnte nur für *C. granii* mit dem als Arachidonsäure identifizierten Feature, ein Vertreter der Oxylinprecursor gefunden werden. Diese wird basierend auf dem t-Test ebenfalls durch die Exposition in den Zellen hochreguliert. Vielleicht wirkt sie, wie bei HDTA postuliert, attraktiv für *L. coscinodisci*. Da beide Verbindungen aber nur in den Zellen signifikant hochreguliert wurden, ist eine direkte Anziehung der Zoosporen durch Chemotaxis zunächst eher unwahrscheinlich, da sie dafür in das umgegebene Medium und somit im Exometabolom auftreten müssten. Es kann aber sein, dass durch eine verlängerte Expositionsdauer erst eine Freisetzung der beiden PUFAs (und eventuell auftretender oxylinischer Folgeprodukte) stattfindet. So lag beispielsweise eine statistisch signifikante Konzentration an PUFAs und Oxylinen im Exometabolom bei der Exposition der Diatomeenspezies *Chaetoceros didymus* mit dem Bakterium *Kordia algicida* erst nach vier Tagen vor. ^[18]

Bei *C. radiatus* sieht man ebenfalls eine Veränderung im Endometabolom durch die Exposition mit *L. coscinodisci*. Es konnten jedoch keine relevanten Produktionen von PUFAs oder Oxylinen entdeckt werden, die diese Veränderungen verursachen könnten. Da für das Endometabolom, im Gegensatz zum Exometabolom jedoch Methanol als Extraktionsmittel verwendet wurde, können auch andere Stoffklassen für die Unterschiede verantwortlich sein. Methanol zeigt nicht nur für Oxyline, sondern auch andere Verbindungen Lösungsfähigkeit und Anwendbarkeit in der Extraktion. Im t-Test wurden insgesamt 12 sehr relevante Verbindungen entdeckt, die zwar nicht zur Familie der PUFAs oder Oxyline gezählt werden können, aber eine entscheidende Rolle im Kontext der Induktion von chemischer Verteidigung spielen könnten. Bei *C.*

radiatus ist also durchaus möglich, dass die Resistenz gegenüber *L. coscinodisci* chemischer Natur ist, da das Metabolom auf den Kontakt reagiert. Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass, zumindest bei der kurzen Expositionsdauer von 24 Stunden, die Produktion von Oxylipinen dabei eine Rolle spielt. Eine chemische Verteidigung in der Mikroalge *C. radiatus* wurde auch im Rahmen der Arbeit von Hannah Busch diskutiert.^[44]

Obwohl in der resistenten Spezies *C. wailesii* auch zwei PUFAs gefunden werden konnten, kam es zu keiner signifikanten Konzentrationsveränderung. Beide Teile des Metaboloms haben sich bei Anwendung der entsprechenden Extraktionsmethode durch die Exposition nur wenig verändert. Dies lässt vermuten, dass bei dieser Art die Produktion der freien Fettsäuren und Oxylipine nicht durch den Kontakt mit dem Parasitoiden induziert werden. Das wäre bei Vorliegen einer oxylipinvermittelten chemischen Verteidigung in *C. wailesii* jedoch zu erwarten. Die Stoffgruppe scheint anhand der hier erhaltenen Daten aber nicht für die Resistenz verantwortlich zu sein. Eine metabolische Ursache wurde bereits auch schon von Hanna Busch als eher unwahrscheinlich eingeordnet.^[44] In ihrer Arbeit wurden alternative Ursachen für die Resistenz von *C. wailesii* diskutiert. So werden morphologische Änderungen, die im Laufe der Evolution und dem Zusammenleben von Alge und dem Parasitoiden entwickelt wurden, genannt. Die Zellen von *C. wailesii* könnten so aufgrund der Beschaffenheit ihrer Zellwand nicht für eine Penetration durch die Zoosporen geeignet sein.^[44,104] Auch das Gen-für-Gen-Konzept wurde hier als möglicher Grund diskutiert.^[44,112]

Um für dieses Experiment eine bessere Einschätzung zu bekommen, ob die Induktion von Oxylipinen durch die Wechselwirkung der Diatomeenarten mit dem Parasitoiden eine Rolle in der chemischen Verteidigung spielt, ist ein Kontaktversuch zwischen *L. coscinodisci* und Extrakten der Alge unverzichtbar. Damit könnte sowohl festgestellt werden, ob die produzierten Verbindungen eine repellierende oder eher attraktive Wirkung auf den Parasitoiden im Rahmen der Chemotaxis haben (siehe auch 4.1). Analog zum ersten Experiment kann auch ein Bioassay durchgeführt werden, um die Wirkung der Reinsubstanzen auf den Parasitoiden abschätzen zu können. Auch ein Enzymassay könnte die Aktivität der LOX nachweisen und damit die Produktion von Oxylipinen untermauern. Ferner können Expositionsexperimente entlang

verschiedener Zeitpunkte (mit Expositionsdauern zwischen 30 Minuten und 96 Stunden) nach Beginn des Pathogenkontakts Aufschluss bringen, ob der Modulation in den Zellen der Algen auch eine Freisetzung in das Medium folgt und ob noch Oxidationsprodukte der PUFAs gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Phytoplankton ist für einen großen Teil der weltweiten Photosynthese und Primärproduktion verantwortlich und stellt die Basis des marinen Nahrungsnetzes dar. Populationen von Phytoplankton und der Verlauf von Algenblüten haben damit über die Trophiestufen auch Einfluss auf das Leben der Menschen. Da biotische Stressoren die Dynamik der Blüten stark beeinflussen, ist es wichtig Interaktionen und mögliche Abwehrreaktionen zwischen diesen und den Mikroalgen auf metabolischer Ebene zu verstehen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit Lipidmodulationen bei der Verteidigung der Diatomeenspezies *Coscinodiscus granii*, *Coscinodiscus radiatus* und *Coscinodiscus wailesii* gegen Predatoren und bei der kurzzeitigen Exposition mit dem parasitoiden Oomyceten *L. coscinodisci* auf Basis eines metabolomischen Ansatzes untersucht werden. Es wurde dabei sowohl dem Ansatz einer Targeted Analysis gefolgt, aber auch Untersuchungen basierend auf einer Untargeted Analysis durchgeführt.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Diatomeenart. *C. granii* durch einen kurzzeitigen Kontakt mit dem parasitoiden Oomyceten *L. coscinodisci* Modulationen in der Lipidproduktion in der behandelten Kultur relativ zu einer Kontrollgruppe aufweist. Deshalb wurde ein Experiment durchgeführt bei dem Zellen von *C. granii* dreißig Minuten in direkten Kontakt mit dem Pathogen gebracht wurden. Im Zuge der Targeted Analysis konnten polyungesättigte freie Fettsäuren (PUFAs) im Metabolom von *C. granii* entdeckt werden. Vor allem die Hochregulierung von Docosahexaensäure und ihre Ausschüttung in das umgebende Medium fiel dabei auf. Ihr wurde eine im Zuge der Chemotaxis möglicherweise attraktiv wirkende Funktion auf die Zoosporen von *L. coscinodisci* zugesprochen.

Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Modulation von Lipiden bei kurzzeitigem Kontakt mit *L. coscinodisci* unterschiedlich für verschiedene Diatomeenspezies ist und in der Folge ein metabolomisches Experiment durchgeführt, bei dem *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* für 24 Stunden direkt mit dem Pathogen exponiert wurden. Dabei zeigte sich, dass sich das Metabolom in Bezug auf Lipide nur in der für den Parasitoid anfälligen Spezies *C. granii* verändert, während in den resistenten Arten keine signifikanten Veränderungen in der Lipidmodulation auftreten.

In *C. granii* wurden die beiden polyungesättigten Fettsäuren Hexadecatriensäure und Arachidonsäure in den Zellen der Mikroalge hochreguliert und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Attraktion von *L. coscinodisci* und damit auch bei der Anfälligkeit von *C. granii* gegenüber dem Pathogen. Die metabolische Antwort mit Fokus auf die Lipide hat sich ferner also auch bei einer längeren Exposition mit *L. coscinodisci* über 24 Stunden im Vergleich zu einem dreißigminütigen Kontakt verändert.

Verwundungsexperimente mit den Spezies *C. granii*, *C. radiatus* und *C. wailesii* legten zudem nahe, dass vor allem die Art *C. granii* ein hohes Potential zur Produktion von PUFAs und Oxylipinen hat. Es zeigte sich durch die Durchführung zweier verschiedener Extraktionsmethoden, einerseits einfach mit Methanol und andererseits über eine SPE mit Methylformiat als Elutionsmittel, eine starke Abhängigkeit der Resultate von der angewendeten Methode und untersuchten Spezies. Die Extraktionsmethode kann also die erhaltenen Ergebnisse zu einer metabolischen Antwort signifikant beeinflussen. Außerdem zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene untersuchte Spezies. Ferner konnten die Resultate von Rettner et al. über die verwundungsaktivierte Produktion von PUFAs und Oxylipinen in *C. granii* untermauert werden.

Um obige Hypothesen überprüfen zu können, sind weitere Experimente mit qualitätssichernden Maßnahmen notwendig. Es könnten zunächst Enzymassays durchgeführt werden, um die Aktivität der Lipoxygenase zu untersuchen und damit neben den gefundenen PUFAs auch die Produktion von Oxylipinen festzustellen. Zudem wäre die Durchführung von entsprechenden Kontaktexperimenten zwischen den Algenextrakten und *L. coscinodisci* eine wichtige Möglichkeit ihre Funktion als Repellentien oder eine anziehende Wirkung im Rahmen der Chemotaxis beurteilen zu können. Bioassays könnten schließlich den direkten Einfluss der Reinsubstanzen von Docosahexaensäure, Hexadecatriensäure und Arachidonsäure auf den Lebenszyklus und die Reproduktion des Pathogens offenlegen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] T. Erb, "Synthetische Kohlenstoffdioxid-Fixierung", can be found under https://www.mpg.de/10899435/mpi_terr_mikro_jb_2016.
- [2] W. Hubau, S. L. Lewis, O. L. Phillips, K. Affum-Baffoe, H. Beeckman, A. Cuní-Sanchez, A. K. Daniels, C. E. N. Ewango, S. Fauset, J. M. Mukinzi et al., *Nature* **2020**, 579, 80.
- [3] E. V. Armbrust, *Nature* **2009**, 459, 185.
- [4] M. J. R. Fasham, *Ocean Biogeochemistry. The Role of the Ocean Carbon Cycle in Global Change*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2003**.
- [5] P. G. Falkowski, *Photosynthesis research* **1994**, 39, 235.
- [6] D. A. KUCHLER, D. L. B. JUPP, *International Journal of Remote Sensing* **1988**, 9, 1299.
- [7] D.-Z. Wang, S.-F. Zhang, Y. Zhang, L. Lin, *Journal of proteomics* **2016**, 135, 132.
- [8] E. Selander, P. Thor, G. Toth, H. Pavia, *Proceedings. Biological sciences* **2006**, 273, 1673.
- [9] G. M. Hallegraeff, *Phycologia* **1993**, 32, 79.
- [10] S. Chakraborty, U. Feudel, *Theoretical Ecology* **2014**, 7, 221.
- [11] R. Akçaalan, M. Albay, C. Gürevin, F. Çevik, *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **2007**, 43, 21.
- [12] M. E. Hay, *Annual review of marine science* **2009**, 1, 193.
- [13] A. Vardi, F. Formiggini, R. Casotti, A. de Martino, F. Ribalet, A. Miralto, C. Bowler, *PLoS biology* **2006**, 4, e60.
- [14] R. Casotti, S. Mazza, C. Brunet, V. Vantrepotte, A. Ianora, A. Miralto, *Journal of Phycology* **2005**, 41, 7.
- [15] S. B. Pollara, J. W. Becker, B. L. Nunn, R. Boiteau, D. Repeta, M. C. Mudge, G. Downing, D. Chase, E. L. Harvey, K. E. Whalen, *mSphere* **2021**, 6.
- [16] A. Miralto, G. Barone, G. Romano, S. A. Poulet, A. Ianora, G. L. Russo, I. Buttino, G. Mazzearella, M. Laabir, M. Cabrini et al., *Nature* **1999**, 402, 173.
- [17] G. Pohnert, *Angewandte Chemie* **2000**, 39, 4352.
- [18] N. Meyer, J. Rettner, M. Werner, O. Werz, G. Pohnert, *Marine drugs* **2018**, 16.
- [19] A. K. Minhas, P. Hodgson, C. J. Barrow, A. Adholeya, *Frontiers in microbiology* **2016**, 7, 546.
- [20] A. Miralto, G. Barone, G. Romano, S. A. Poulet, A. Ianora, G. L. Russo, I. Buttino, G. Mazzearella, M. Laabir, M. Cabrini et al., *Nature* **1999**, 402, 173.
- [21] University of California Santa Cruz - Kudela Lab Biological Oceanography.
- [22] R. E. Lee, *Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge [England], New York, **2008**.
- [23] Andrew Yool, Toby Tyrrell, *Global Biogeochemical Cycles* **2003**, 17.

- [24] J. P. Smol, H. J. B. Birks, W. M. Last, R. S. Bradley, K. Alverson, *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2002**.
- [25] V. A. Chepurinov, D. G. Mann, W. Vyverman, K. Sabbe, D. B. Danielidis, *Journal of Phycology* **2002**, 38, 1004.
- [26] J. Gillard, J. Frenkel, V. Devos, K. Sabbe, C. Paul, M. Rempt, D. Inzé, G. Pohnert, M. Vuylsteke, W. Vyverman, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, 52, 854.
- [27] B. Vanellander, C. Paul, J. Grueneberg, E. K. Prince, J. Gillard, K. Sabbe, G. Pohnert, W. Vyverman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 2412.
- [28] C. Paul, A. Barofsky, C. Vidoudez, G. Pohnert, *Marine Ecology Progress Series* **2009**, 389, 61.
- [29] S. A. Amin, M. S. Parker, E. V. Armbrust, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2012**, 76, 667.
- [30] G. Pohnert, *Topics in current chemistry* **2004**, 239, 179.
- [31] A. Ianora, M. G. Bentley, G. S. Caldwell, R. Casotti, A. D. Cembella, J. Engström-Öst, C. Halsband, E. Sonnenschein, C. Legrand, C. A. Llewellyn et al., *Marine drugs* **2011**, 9, 1625.
- [32] M. Vallet, T. U. H. Baumeister, F. Kaftan, V. Grabe, A. Buaya, M. Thines, A. Svatoš, G. Pohnert, *Nature communications* **2019**, 10, 4938.
- [33] A. Kraberg, M. Baumann, C.-D. Dürselen, *Coastal phytoplankton. Photo guide for Northern European seas*, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, **2010**.
- [34] J. P. Baudin, *Vie et milieu* **1980**, 30, 303.
- [35] C. Sjöqvist, A. Kremp, E. Lindehoff, U. Båmstedt, J. Egardt, S. Gross, M. Jönsson, H. Larsson, G. Pohnert, H. Richter et al., *Microbial ecology* **2014**, 67, 83.
- [36] Y. Tomaru, N. Fujii, S. Oda, K. Toyoda, K. Nagasaki, *Aquatic Microbial Ecology* **2011**, 63, 223.
- [37] C. G. Peterson, T. L. Dudley, K. D. Hoagland, L. M. Johnson, *Journal of Phycology* **1993**, 29, 442.
- [38] I. Klawonn, S. van den Wyngaert, A. E. Parada, N. Arandia-Gorostidi, M. J. Whitehouse, H.-P. Grossart, A. E. Dekas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, 118.
- [39] M. Thines, B. Nam, L. Nigrelli, G. Beakes, A. Kraberg, *Mycological Progress* **2015**, 14.
- [40] N. F. Johnson in *Encyclopedia of biodiversity* (Ed.: S. A. Levin), Academic Press, Amsterdam, **2013**, pp. 177–184.

- [41] J. Webster, R. Weber in *Introduction to fungi* (Eds.: J. Webster, R. Weber), Cambridge University Press, Cambridge, UK, New York, **2007**, pp. 75–126.
- [42] M. Thines, *Biologie in unserer Zeit* **2014**, *44*, 116.
- [43] M. Thines, *European Journal of Plant Pathology* **2014**, *138*, 431.
- [44] H. Busch **2020**.
- [45] J. T. Turner, *Harmful Algae* **2014**, *32*, 81.
- [46] H. K. Schminke, *Journal of Plankton Research* **2007**, *29*, i149-i162.
- [47] A. Ianora, A. Miralto, *Ecotoxicology (London, England)* **2010**, *19*, 493.
- [48] G. A. Paffenhöfer, A. Ianora, A. Miralto, J. T. Turner, G. S. Kleppel, d' Alcalà, R. Casotti, G. S. Caldwell, G. Pohnert, A. Fontana et al., *Marine Ecology Progress Series* **2005**, *286*, 293.
- [49] E. Russo, A. Ianora, Y. Carotenuto, *Marine Biology* **2019**, 166.
- [50] S. Wohlrab, M. H. Iversen, U. John, *PloS one* **2010**, *5*, e15039.
- [51] M. E. J. Woolhouse, J. P. Webster, E. Domingo, B. Charlesworth, B. R. Levin, *Nature genetics* **2002**, *32*, 569.
- [52] F. Blanquart, M. Valero, C. Alves-de-Souza, A. Dia, F. Lepelletier, E. Bigeard, C. Jeanthon, C. Destombe, L. Guillou, *Proceedings. Biological sciences* **2016**, 283.
- [53] E. Garcés, E. Alacid, A. Reñé, K. Petrou, R. Simó, *The ISME journal* **2013**, *7*, 1065.
- [54] B. Scholz, F. C. Küpper, W. Vyverman, H. G. Ólafsson, U. Karsten, *Marine drugs* **2017**, 15.
- [55] J. D. Long, G. W. Smalley, T. Barsby, J. T. Anderson, M. E. Hay, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 10512.
- [56] M. Long, D. Marie, J. Szymczak, J. Toullec, E. Bigeard, M. Sourisseau, M. Le Gac, L. Guillou, C. Jauzein, *ISME Communications* **2021**, 1.
- [57] G. Pohnert, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2005**, *6*, 946.
- [58] E. van Donk, A. Ianora, M. Vos, *Hydrobiologia* **2011**, *668*, 3.
- [59] M. Pančić, T. Kjørboe, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **2018**, *93*, 1269.
- [60] Y. Lu, S. Wohlrab, M. Groth, G. Glöckner, L. Guillou, U. John, *Molecular ecology* **2016**, *25*, 1294.
- [61] W. Luo, S. Pflugmacher, T. Pröschold, N. Walz, L. Krienitz, *Protist* **2006**, *157*, 315.
- [62] P. Pondaven, M. Gallinari, S. Chollet, E. Bucciarelli, G. Sarthou, S. Schultes, F. Jean, *Protist* **2007**, *158*, 21.
- [63] E. Selander, E. C. Berglund, P. Engström, F. Berggren, J. Eklund, S. Harðardóttir, N. Lundholm, W. Grebner, M. X. Andersson, *Science Advances* **2019**, *5*, eaat5096.
- [64] C. Vidoudez, G. Pohnert, *Journal of Plankton Research* **2008**, *30*, 1305.
- [65] C. Vidoudez, R. Casotti, M. Bastianini, G. Pohnert, *Marine drugs* **2011**, *9*, 500.

- [66] E. Russo, G. D'Ippolito, A. Fontana, D. Sarno, D. D'Alelio, G. Bussen, A. Ianora, E. von Elert, Y. Carotenuto, *The ISME journal* **2020**, *14*, 164.
- [67] J. Rettner, M. Werner, N. Meyer, O. Werz, G. Pohnert, *Tetrahedron Letters* **2018**, *59*, 828.
- [68] N. Lamari, M. V. Ruggiero, G. D'Ippolito, W. H. C. F. Kooistra, A. Fontana, M. Montresor, *PLoS one* **2013**, *8*, e73281.
- [69] I. Feussner, C. Wasternack, *Annual review of plant biology* **2002**, *53*, 275.
- [70] G. D'Ippolito, N. Lamari, M. Montresor, G. Romano, A. Cutignano, A. Gerech, G. Cimino, A. Fontana, *The New phytologist* **2009**, *183*, 1064.
- [71] G. S. Caldwell, *Marine drugs* **2009**, *7*, 367.
- [72] R. Esposito, N. Ruocco, L. Albarano, A. Ianora, L. Manfra, G. Libralato, M. Costantini, *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.
- [73] H. Jagusch, T. U. H. Baumeister, G. Pohnert, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2020**, *21*, 2419.
- [74] C. Wasternack, I. Feussner, *Annual review of plant biology* **2018**, *69*, 363.
- [75] O. Fiehn in *Functional Genomics* (Ed.: C. Town), Springer Netherlands, Dordrecht, **2002**, pp. 155–171.
- [76] *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 285.
- [77] J. R. Idle, F. J. Gonzalez, *Cell metabolism* **2007**, *6*, 348.
- [78] M. Vinaixa, S. Samino, I. Saez, J. Duran, J. J. Guinovart, O. Yanes, *Metabolites* **2012**, *2*, 775.
- [79] W. Li, *Journal of bioinformatics and computational biology* **2012**, *10*, 1231003.
- [80] B. L. WELCH, *Biometrika* **1947**, *34*, 28.
- [81] N. Kumar, M. A. Hoque, M. Sugimoto, *BMC bioinformatics* **2018**, *19*, 128.
- [82] D. G. Robertson, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2005**, *85*, 809.
- [83] S. Albers, *Methodik der empirischen Forschung*, Springer Fachmedien, Wiesbaden, **2007**.
- [84] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes, *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **1999**, *29*, 1181.
- [85] C. Vidoudez, G. Pohnert, *Metabolomics* **2012**, *8*, 654.
- [86] K. L. Poulson-Ellestad, C. M. Jones, J. Roy, M. R. Viant, F. M. Fernández, J. Kubanek, B. L. Nunn, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 9009.
- [87] H. Jagusch, M. Werner, O. Werz, G. Pohnert, *Angewandte Chemie* **2019**, *58*, 17641.
- [88] P. Karp, R. Billington, T. Holland, A. Kothari, M. Krummenacker, D. Weaver, M. Latendresse, S. Paley, *Metabolites* **2015**, *5*, 291.
- [89] J. L. Little, A. J. Williams, A. Pshenichnov, V. Tkachenko, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23*, 179.

- [90] J. A. van Santen, G. Jacob, A. L. Singh, V. Aniebok, M. J. Balunas, D. Bunsko, F. C. Neto, L. Castaño-Espriu, C. Chang, T. N. Clark et al., *ACS Central Science* **2019**, *5*, 1824.
- [91] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D. S. Wishart, *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, W652-W660.
- [92] Z. Pang, J. Chong, G. Zhou, D. A. de Lima Morais, Le Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.-É. Jacques, S. Li, J. Xia, *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, W388-W396.
- [93] K. Dührkop, M. Fleischauer, M. Ludwig, A. A. Aksenov, A. V. Melnik, M. Meusel, P. C. Dorrestein, J. Rousu, S. Böcker, *Nature methods* **2019**, *16*, 299.
- [94] M. A. Hoffmann, L.-F. Nothias, M. Ludwig, M. Fleischauer, E. C. Gentry, M. Witting, P. C. Dorrestein, K. Dührkop, S. Böcker, *Assigning confidence to structural annotations from mass spectra with COSMIC*, **2021**.
- [95] K. Dührkop, H. Shen, M. Meusel, J. Rousu, S. Böcker, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 12580.
- [96] S. Kim, P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B. A. Shoemaker et al., *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, D1202-D1213.
- [97] M. Sorokina, P. Merseburger, K. Rajan, M. A. Yirik, C. Steinbeck, *Journal of Cheminformatics* **2021**, *13*.
- [98] M. Ludwig, M. Fleischauer, K. Dührkop, M. A. Hoffmann, S. Böcker, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2020**, *2104*, 185.
- [99] E. L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. P. Singer, J. Hollender, *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 2097.
- [100] L. W. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. H. Beale, R. Beger, C. A. Daykin, T. W.-M. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. L. Griffin et al., *Metabolomics* **2007**, *3*, 211.
- [101] R. Singh, A. Yadav, A. Chopra, J. Christopher, G. S. Kapur, *SN Applied Sciences* **2019**, *1*.
- [102] A. P. Desbois, T. Lebl, L. Yan, V. J. Smith, *Applied microbiology and biotechnology* **2008**, *81*, 755.
- [103] D. Nanjappa, G. D'Ippolito, C. Gallo, A. Zingone, A. Fontana, *Marine drugs* **2014**, *12*, 368.
- [104] B. Scholz, L. Guillou, A. V. Marano, S. Neuhauser, B. K. Sullivan, U. Karsten, F. C. Küpper, F. H. Gleason, *Fungal ecology* **2016**, *19*, 59.
- [105] G. M. Nylund, F. Weinberger, M. Rempt, G. Pohnert, *PloS one* **2011**, *6*, e29359.
- [106] Friedrich Jüttner, *Journal of Phycology* **2001**, *37*, 744.
- [107] G. D'Ippolito, G. Romano, T. Caruso, A. Spinella, G. Cimino, A. Fontana, *Organic letters* **2003**, *5*, 885.
- [108] G. D'Ippolito, S. Tucci, A. Cutignano, G. Romano, G. Cimino, A. Miralto, A. Fontana, *Biochimica et biophysica acta* **2004**, *1686*, 100.

- [109]G. D'Ippolito, A. Cutignano, S. Tucci, G. Romano, G. Cimino, A. Fontana, *Phytochemistry* **2006**, 67, 314.
- [110]C. Hinz, S. Liggi, G. Mocciaro, S. Jung, I. Induruwa, M. Pereira, C. E. Bryant, S. W. Meckelmann, V. B. O'Donnell, R. W. Farndale et al., *Analytical Chemistry* **2019**, 91, 8025.
- [111]U. SOMMER, A. LEWANDOWSKA, *Global Change Biology* **2011**, 17, 154.
- [112]A. Buaya, A. Kraberg, M. Thines, *Helgoland Marine Research* **2019**, 73.

7 Anhang

7.1 Experiment 1

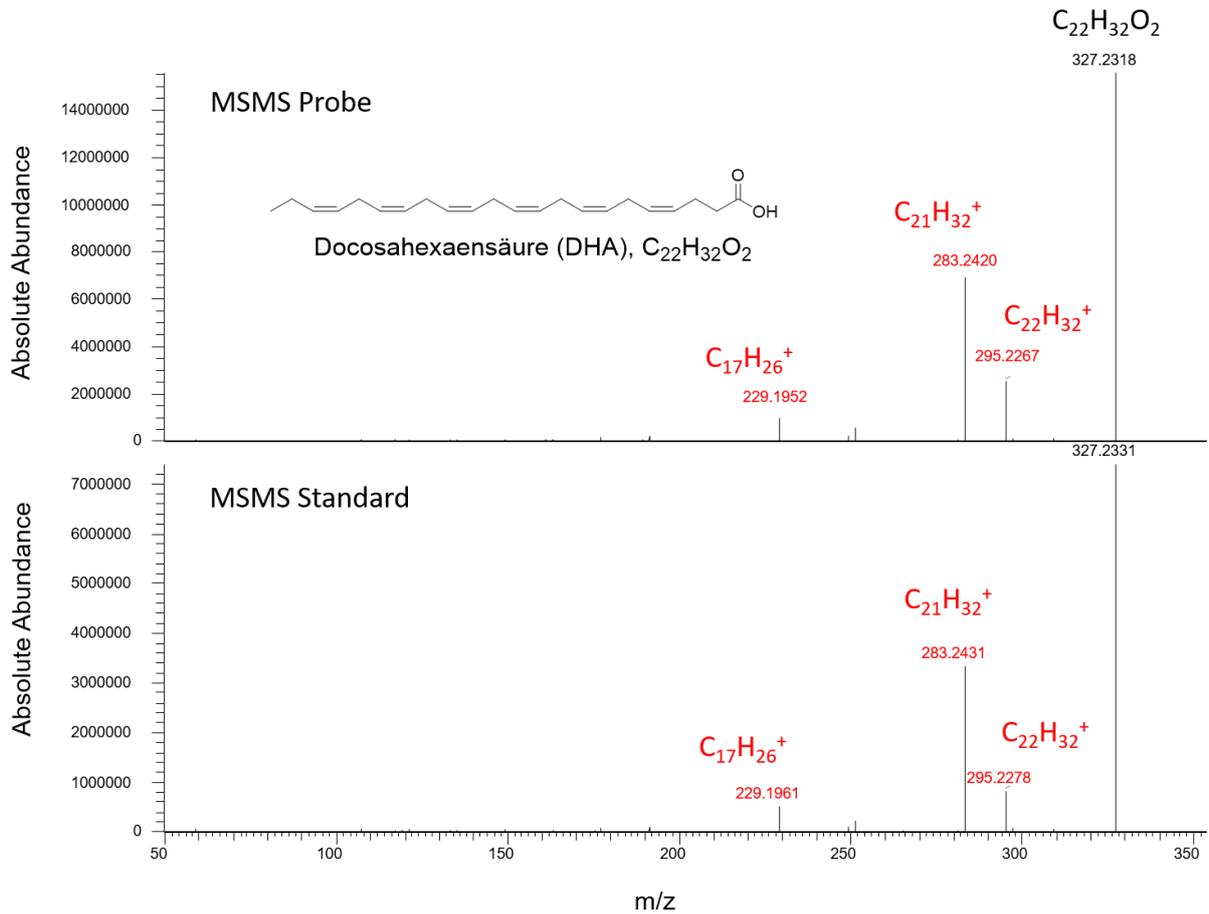
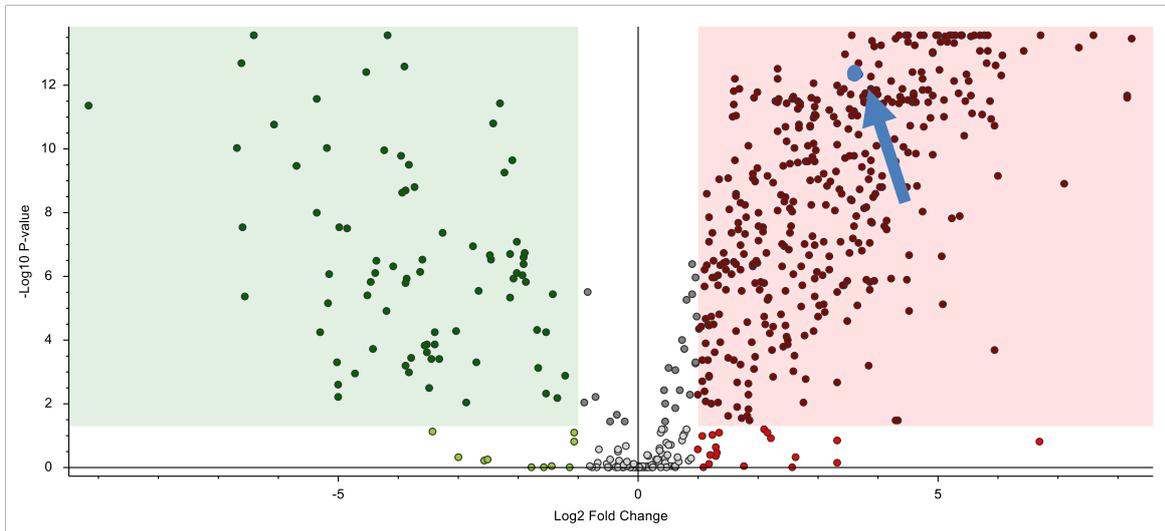


Abbildung 29: MSMS des Features $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA) von behandelter Probe *C. granii* (oben, RT: 14.42-14.54 Min) und einem Standard (unten, RT: 14.54 Min); Die Kollisionsenergien betragen jeweils 15 eV mit Elektronensprayionisation (ESI) im negativen Polarisationsmodus; Die Abweichungsgrenzen für die Massen betragen ± 5 ppm; Die Precursor-Ionen sind schwarz, Fragmente rot gekennzeichnet

7.2 Experiment 2

Extraktionsmethode A

a)



b)

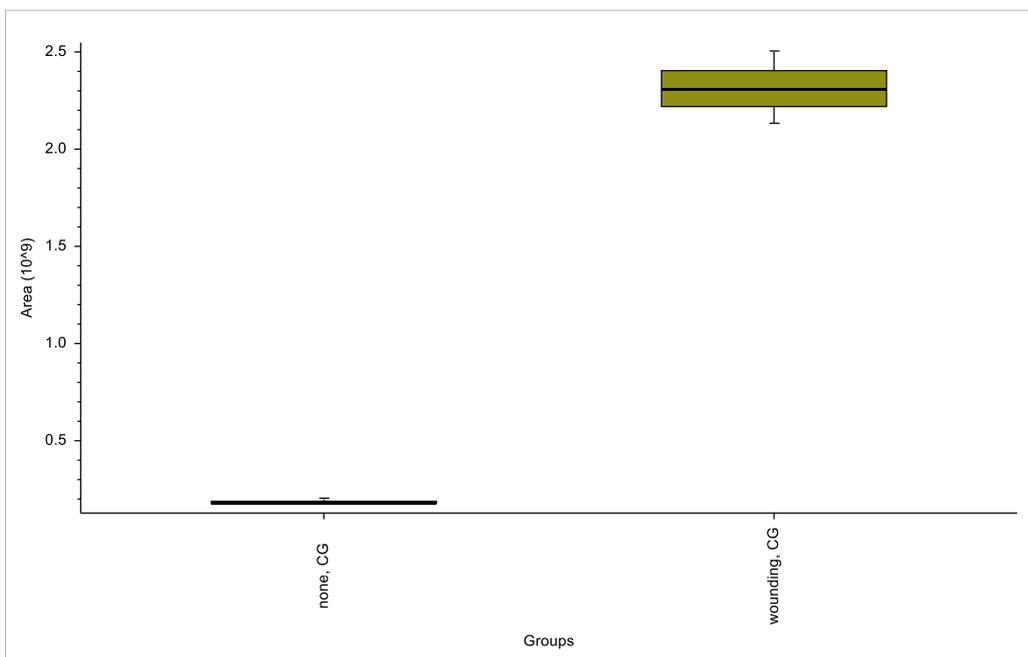
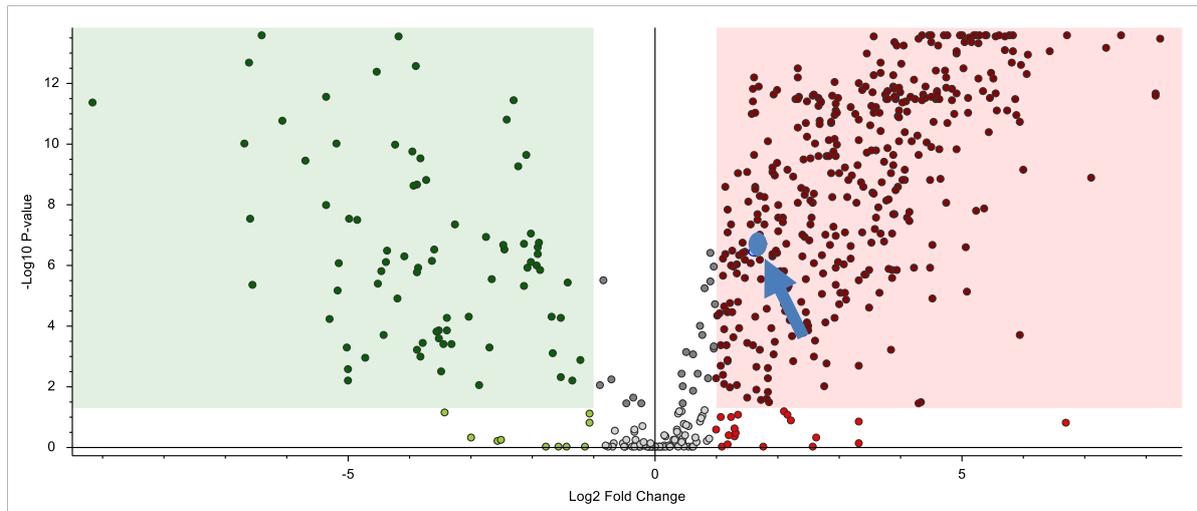


Abbildung 30: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA, blau markiert) in *C. granii*; Die Differentialanalyse in Compound Discoverer lieferte: $\log fc = 3.69$ und $p = 4.9E^{137}$; In b) ist eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe (wounding) in Experiment 2 (Methode A) gegenüber der Kontrollgruppe (none) zu sehen; in a) liegt das Feature im roten Bereich für eine relative Hochregulation in der Verwundungsgruppe

a)



b)

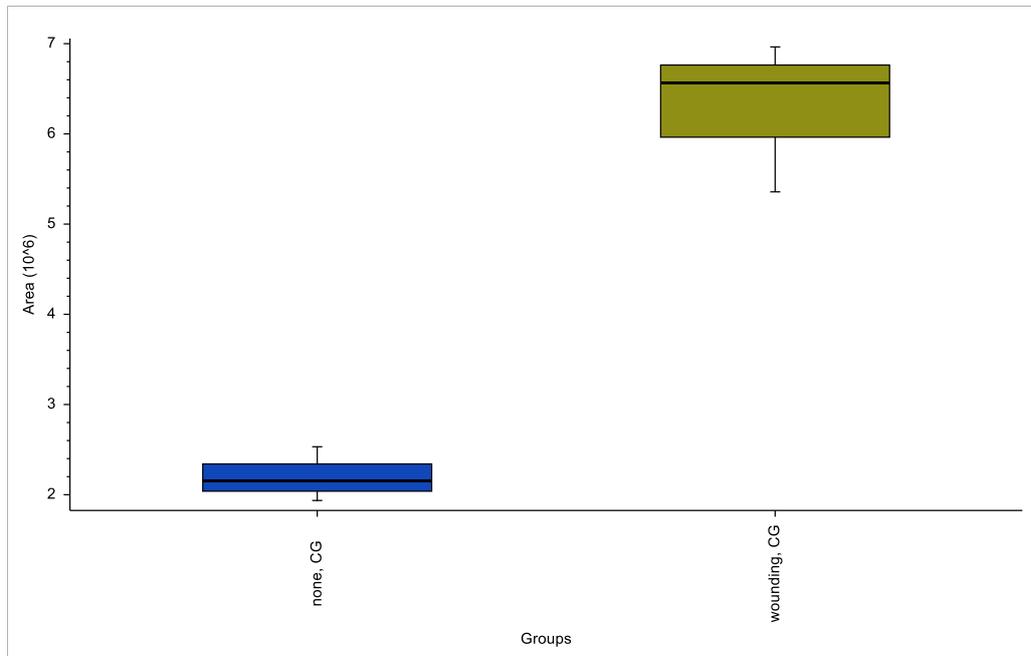
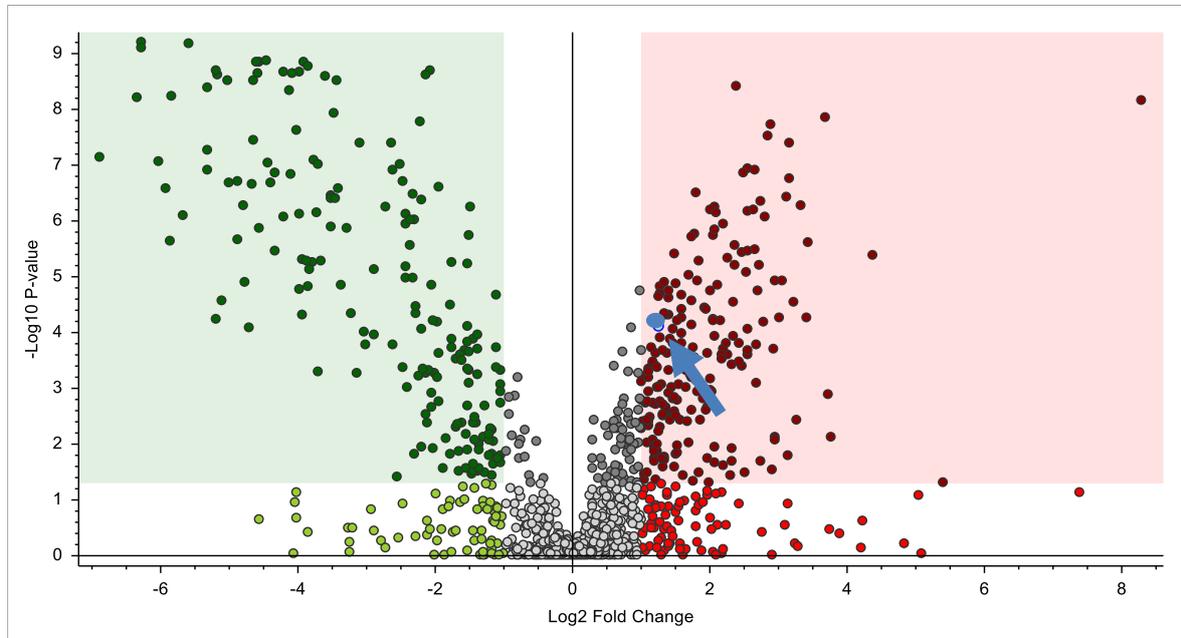


Abbildung 31: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{22}H_{32}O_2$ (vermutlich DHA, blau markiert) in *C. granii*; Die Differentialanalyse in Compound Discoverer lieferte: $\log fc = 1.61$ und $p = 3.8E-7$; In b) ist eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe (wounding) in Experiment 2 (Methode A) gegenüber der Kontrollgruppe (none) zu sehen; in a) liegt das Feature im roten Bereich für eine relative Hochregulation in der Verwundungsgruppe

Extraktionsmethode B

Coscinodiscus granii

a)



b)

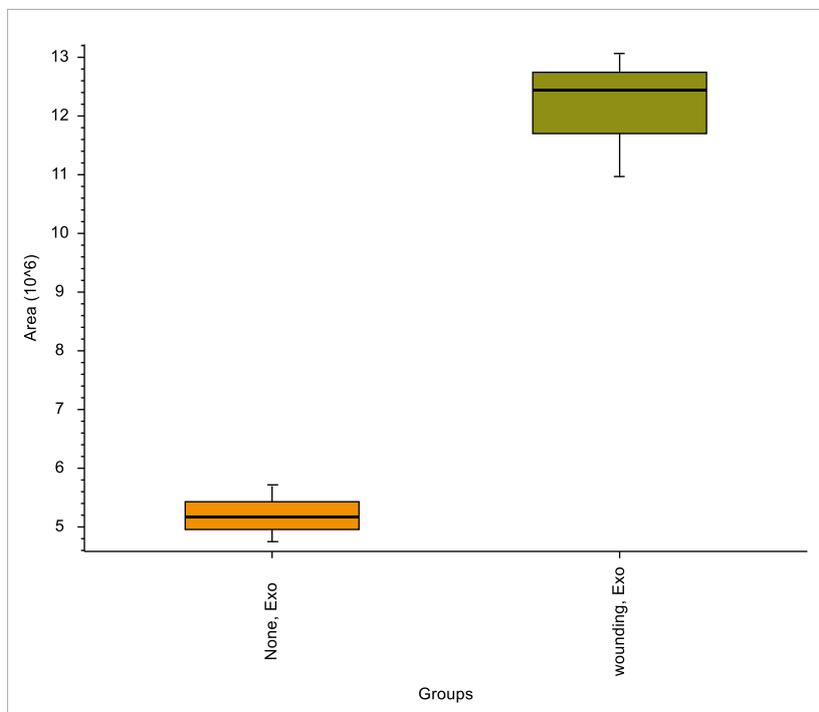
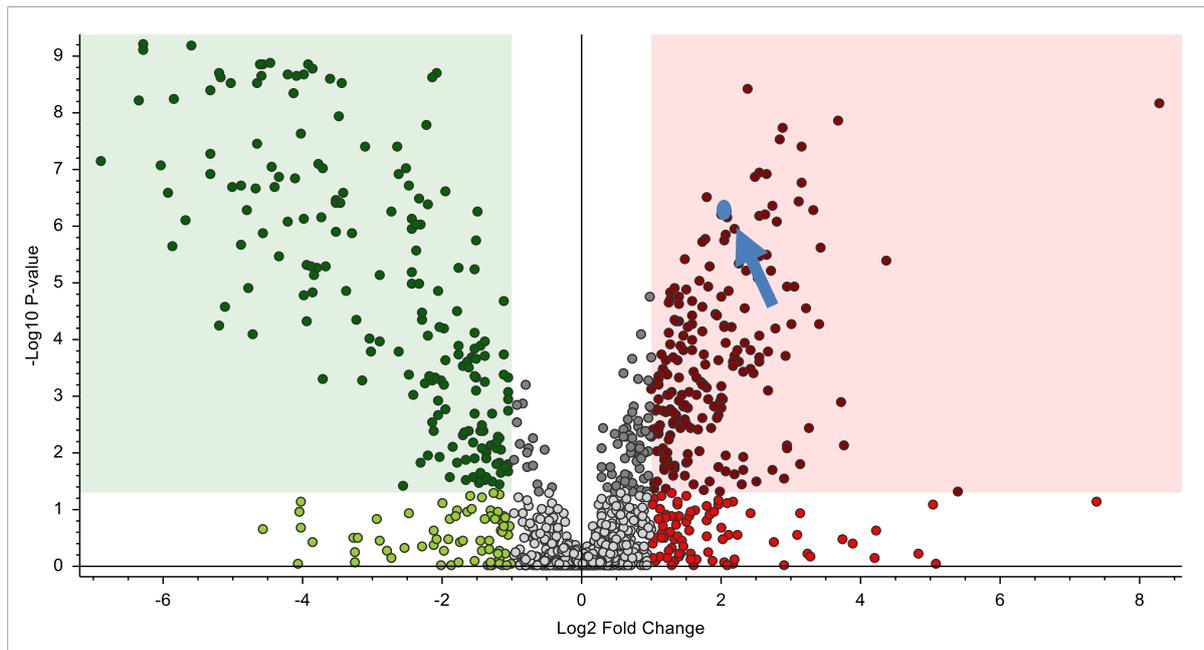


Abbildung 32: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{32}O_3$ (vermutlich HETE, blau markiert) in *C. granii*; Die Differentialanalyse in Compound Discoverer lieferte: $\log fc = 1.27$ und $p = 7.8E^{-5}$; In b) ist eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe des Exometaboloms (wounding Exo) in Experiment 2 (Methode B) gegenüber der Kontrollgruppe (none Exo) zu sehen; in a) liegt das Feature im roten Bereich für eine relative Hochregulation in der Verwundungsgruppe

a)



b)

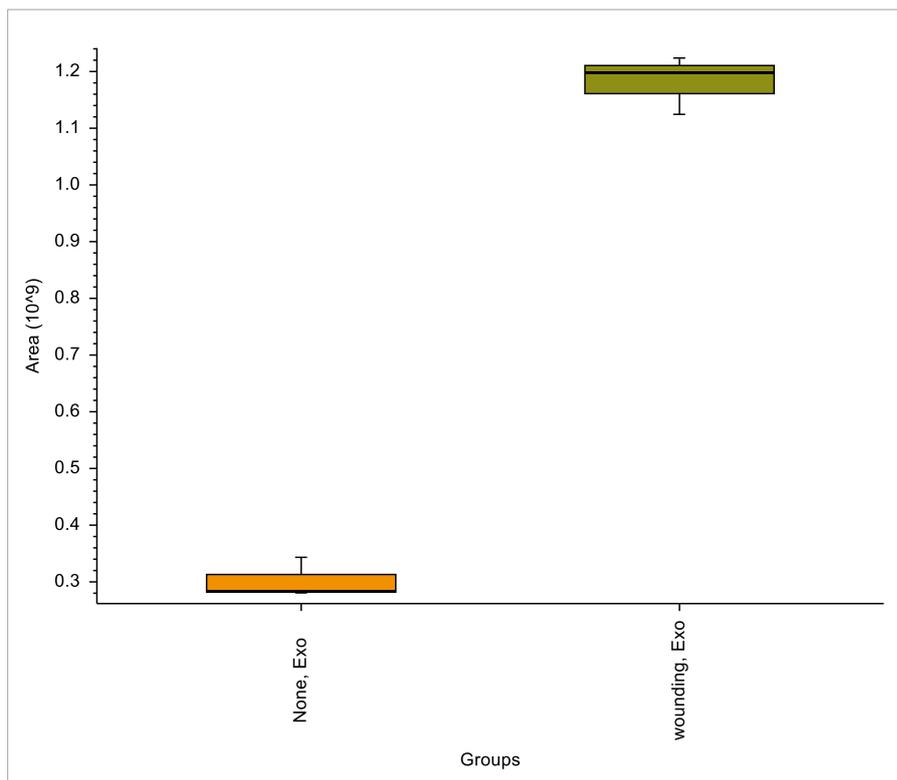
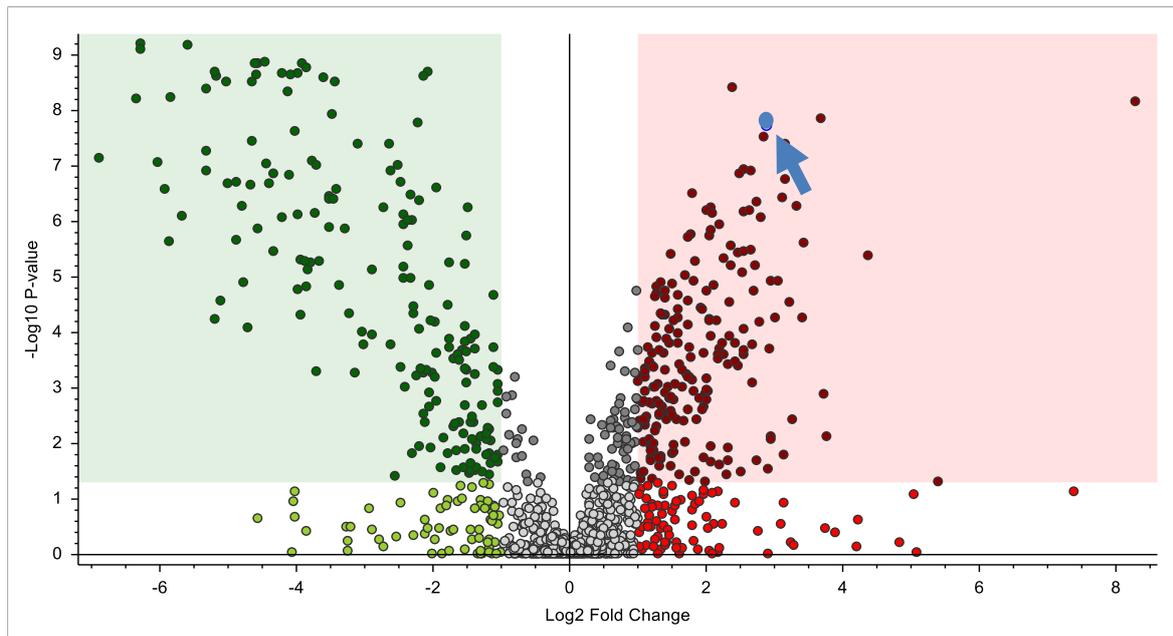


Abbildung 33: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA, blau markiert) in *C. granii*; Die Differentialanalyse in Compound Discoverer lieferte: $\log fc = 2.08$ und $p = 5.7E^{-7}$; In b) ist eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe des Exometaboloms (wounding Exo) in Experiment 2 (Methode B) gegenüber der Kontrollgruppe (none Exo) zu sehen; in a) liegt das Feature im roten Bereich für eine relative Hochregulation in der Verwundungsgruppe

a)



b)

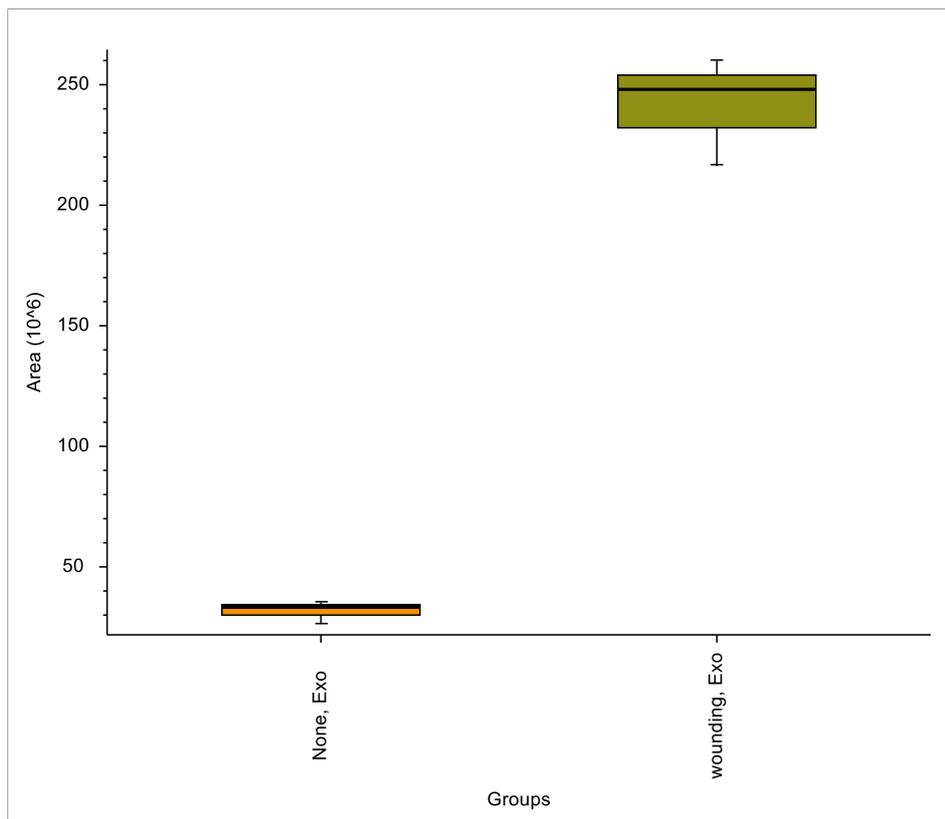


Abbildung 34: Volcano-Plot (a) und Box-Whisker-Plot (b) zum Feature $C_{16}H_{26}O_2$ (vermutlich HDTA, blau markiert) in *C. granii*; Die Differentialanalyse in Compound Discoverer lieferte: $\log fc = 2.89$ und $p = 1.8E^{-8}$; In b) ist eine Hochregulation in der Verwundungsgruppe des Exometaboloms (wounding Exo) in Experiment 2 (Methode B) gegenüber der Kontrollgruppe (none Exo) zu sehen; in a) liegt das Feature im roten Bereich für eine relative Hochregulation in der Verwundungsgruppe

7.3 Experiment 3

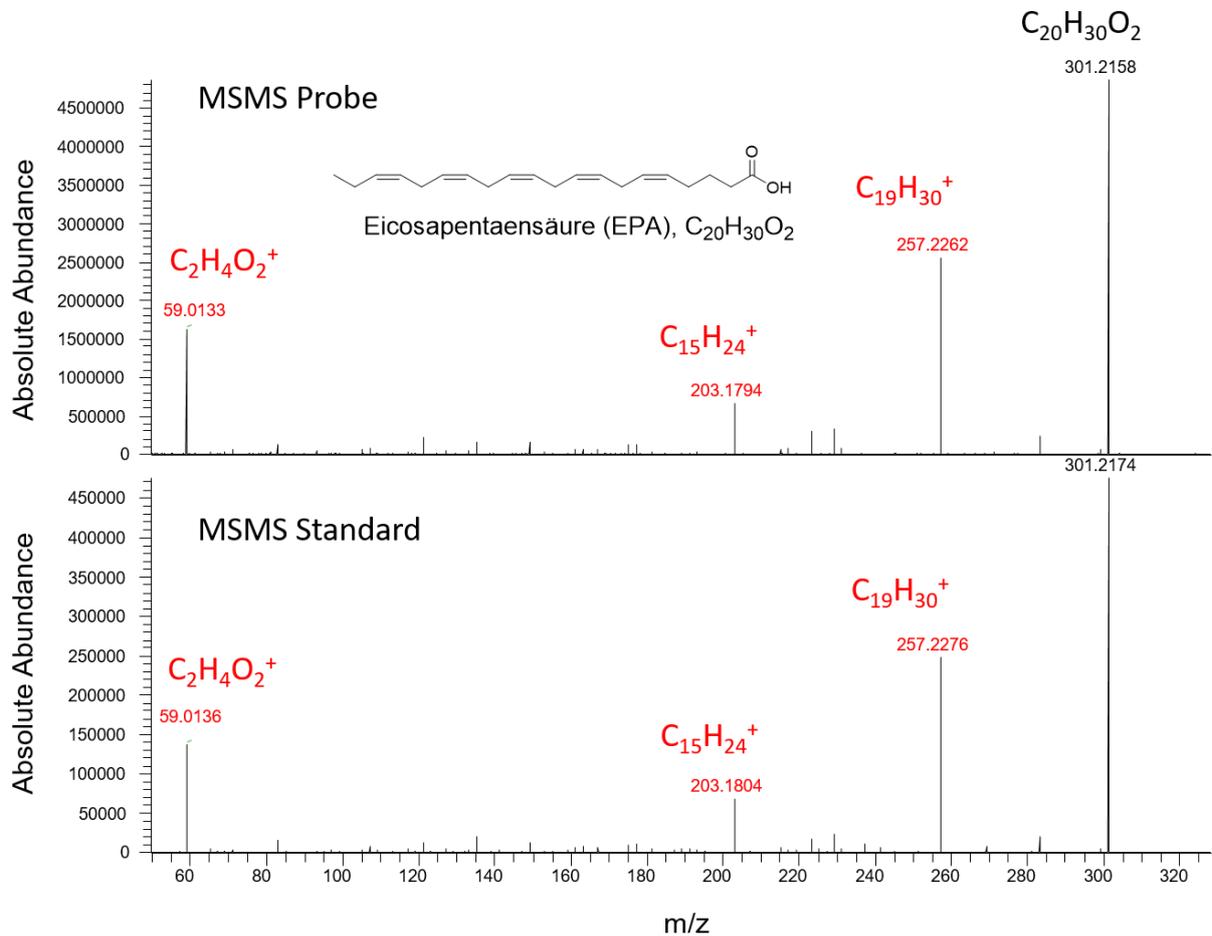


Abbildung 35: MSMS des Features $C_{20}H_{30}O_2$ (vermutlich EPA) in der gepolten QC der Proben (oben, RT: 14.13 Min) und einem gleichzeitig vermessenen Standard (unten, RT: 14.02 – 14.27 Min); Die Kollisionsenergien betragen jeweils 30 eV mit Elektronensprayionisation (ESI) im negativen Polarisationsmodus; Die Abweichungsgrenzen für die Massen betragen ± 5 ppm; Die Precursor-Ionen sind schwarz, Fragmente rot gekennzeichnet

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach Publikationen anderer Autoren entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist nicht anderweitig als Prüfungsleistung verwendet worden oder in deutscher oder einer anderen Sprache als Veröffentlichung erschienen.

Ort, Datum

Unterschrift