

Analyse biologisch aktiver, oxidierter Lipide in Pflanzen und Menschen

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

vorgelegt von
Kathrin Karg
aus Nürnberg

Würzburg, 2006

Dissertation eingereicht am: 08.08.2006

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Georg Nagel

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin J. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Högger

Tag des Promotionskolloquiums: 17.11.2006

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (engl.: amino acid)
ABA	Abscisinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
avr	avirulent
BHT	tert-Butylhydroxytoluol
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C ₁₈ ec	octadecyl end capped
CI	positive chemische Ionisation (engl.: chemical ionization)
COX	Cyclooxygenase
DIEPA	N,N-Diisopropylethylamin
EI	Elektronenstoßionisation (engl.: electron impact)
FG	Frischgewicht
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
IAA	Indolessigsäure
IPA	Indolpropionsäure
iP	Isoprostane
JA	Jasmonsäure
LnA	Linolensäure (engl.: linolenic acid)
LOX	Lipoxygenase
MS	Massenspektrometrie
NCI	negative chemische Ionisation
NH ₂	Aminopropyl
norVal	Norvalin
oANI	ortho-Anisinsäure
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
PFB	Pentafluorbenzyl-Gruppe
PG	Prostaglandin
PP	Phytoprostan
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> path. <i>tomato</i> (biotrophes Bakterium)
Pst avr	auf <i>Arabidopsis thaliana</i> avirulenter Pst-Stamm
Pst vir	auf <i>Arabidopsis thaliana</i> virulenter Pst-Stamm
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA	Salicylsäure
SiOH	Silica
SOD	Superoxid-Dismutase
SPE	Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction)
TG	Trockengewicht
TMS	Trimethylsilyl-Gruppe
TPP	Triphenylphosphin
VPE	Gasphasenextraktion (engl.: vapor phase extraction)

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	5
I.1	Reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidation.....	6
I.1.1	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	6
I.1.2	Oxidativer Stress	8
I.1.3	Mechanismus der Lipidperoxidation.....	8
I.2	Oxylipine im Tier	10
I.2.1	Bildung von Eikosanoiden	10
I.2.2	Struktur und Nomenklatur der Prostaglandine und Isoprostane	15
I.2.3	Diffusion und Transport von Prostanoiden	17
I.2.4	Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR).....	24
I.2.5	Metabolismus von Prostaglandinen und Isoprostanen	27
I.3	Oxylipine in Pflanzen.....	29
I.3.1	Enzymatisch gebildete Oxylipine: Jasmonate.....	29
I.3.2	Autoxidativ gebildete Oxylipine: Phytoprostane	32
I.4	Profil von Phytohormonen und anderen Metaboliten	38
I.5	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	39
II	Material	40
II.1	Untersuchungsmaterial	40
II.1.1	Blütenpollen	40
II.1.2	Speiseöle.....	40
II.1.3	Blut- und Urinproben	41
II.1.4	Pflanzenmaterial	41
II.2	Chemikalien	42
II.2.1	Standards	42
II.2.2	Reagenzien	42
II.2.3	Enzyme.....	43
II.3	Verbrauchsmaterial	43
II.4	Geräte	43
II.4.1	Arbeitsgeräte	43
II.4.2	Instrumentelle Analytik.....	45
III	Methoden.....	46
III.1	Behandlung der Pflanzen	46
III.1.1	Infektion mit Pseudomonaden.....	46
III.1.2	Verwundung	46
III.2	Hydrolyse der Triacylglyceride in den Speiseölen	47
III.2.1	Enzymatische Hydrolyse mit Pankreas-Lipase	47
III.2.2	Alkalische Hydrolyse	47
III.3	Derivatisierungsmethoden.....	48
III.3.1	Methylierung von Carbonsäuren.....	48
III.3.2	Herstellung von Pentafluorbenzylestern	48
III.3.3	Herstellung von Trimethylsilylethern	48
III.3.4	Methoximierung von Ketogruppen	49
III.3.5	Hydrierung von Doppelbindungen.....	49
III.4	Bestimmung von Kreatinin	49
III.5	Chromatographische Methoden	50

III.5.1	Festphasenextraktion	50
III.5.2	Analytische HPLC.....	50
III.5.3	Präparative HPLC	52
III.5.4	GC/MS	52
IV	Ergebnisse	55
IV.1	Bestimmung von Phytoprostanen.....	55
IV.1.1	Extraktion von Phytoprostanen	55
IV.1.2	Festphasenextraktion an Aminopropyl- und Silika-Material	55
IV.1.3	Bestimmung der einzelnen Phytoprostanklassen	56
IV.1.4	Bestimmung von Phytoprostanen in Blütenpollen.....	61
IV.1.5	Bestimmung von Phytoprostanen in Speiseölen	63
IV.1.6	Phytoprostan-Gehalt von autoxydierten Speiseölen	79
IV.1.7	Dehydratisierung von PPD ₁ und PPE ₁ in künstlichem Magensaft.....	83
IV.1.8	Resorption und Exkretion von Phytoprostanen.....	85
IV.2	Herstellung [¹⁸ O]-markierter Standards	91
IV.2.1	Enzymkatalysierter Austausch	92
IV.2.2	Säurekatalysierter Austausch	95
IV.2.3	Rücktausch der Ketogruppe	99
IV.2.4	Stabilität der markierten Carboxylgruppe	99
IV.2.5	Einsatz [¹⁸ O] ₂ -markierter Standards zur Analytik.....	100
IV.3	Bestimmung von Phytohormonen und anderen Metaboliten in Pflanzen.....	102
IV.3.1	Konventionelle Methoden	102
IV.3.2	Modifizierte Methode nach Schmelz et al.....	107
IV.3.3	Bestimmung von org. Säuren und Aminosäuren	117
V	Diskussion.....	127
V.1	Phytoprostanen in fetten Ölen	127
V.1.1	Bedeutung der Phytoprostane in der menschlichen Ernährung	127
V.1.2	Bildung von Phytoprostanen in Ölen	128
V.1.3	Autoxidation freier und veresterte Fettsäuren	132
V.2	Bioverfügbarkeit von Phytoprostanen.....	133
V.2.1	Direkte Infusion von Phytoprostanen.....	133
V.2.2	Resorption von oral aufgenommenen Phytoprostanen.....	134
V.2.3	Endogene Bildung von Phytoprostanen	137
V.2.4	Transport von Phytoprostanen in die Zellen	139
V.3	Wirkungspotential von Phytoprostanen im Menschen.....	140
V.3.1	Archetypische Prostaglandine	140
V.3.2	Wirkorte von Phytoprostanen.....	142
V.3.3	Wirkungen von Phytoprostanen in vitro	145
V.3.4	Potentielle Wirkung von Phytoprostanen im Menschen	153
V.4	Ausblick	155
VI	Zusammenfassung	156
VII	Anhang	160
VII.1	Publikationsliste	160
VII.2	Literatur	160
VII.3	Danksagung	177
VII.4	Lebenslauf	178

I Einleitung

Oxylipine sind Reaktionsprodukte ungesättigter Fettsäuren mit Sauerstoff. Einige Vertreter dieser Gruppe werden von Pflanzen und Tieren enzymatisch durch zahlreiche Oxygenasen (Cytochrom P450-Monooxygenasen, Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen u.a.) hergestellt. Pflanzen benutzen als Ausgangsprodukte vor allem Linol- und Linolensäure, die sie zu Hydroxyfettsäuren und Jasmonaten umsetzen. Im Gegensatz dazu verwendet der tierische Organismus hauptsächlich die Arachidonsäure und bildet daraus Lipoxine, Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane uvm. Die synthetisierten Oxylipine dienen den Organismen als hochaktive Signalstoffe und Mediatoren, welche an fast allen Lebensvorgängen beteiligt sind. Dabei sind sie sowohl an der Regulation des Primärstoffwechsels oder Entwicklung, Wachstum und Fortpflanzung beteiligt, als auch an Reaktionen des Sekundärstoffwechsels (Abwehrreaktionen u.ä.). Neben der kontrollierten enzymatischen Synthese können Oxylipine aber auch über einen autoxidativen, radikalisch katalysierten Mechanismus entstehen. Diese Arbeit richtet ihren Schwerpunkt auf eine Familie nichtenzymatischer Lipidperoxidationsprodukte, die Phytoprostane. Dabei handelt es sich um cyclische Autoxidationsprodukte der α -Linolensäure, welche Strukturanaloga zu enzymatisch gebildeten Lipidmediatoren in Tieren (Prostaglandine) und Pflanzen (Jasmonate) darstellen. Deshalb werden diese Verbindungen als pflanzliche Dinor-Isoprostane oder Phytoprostane bezeichnet. Hier soll ihre Bildung in Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln sowie ihre Bioverfügbarkeit aus den verzehrten Nahrungsmitteln erforscht werden. In diesem Zusammenhang ist auch die physiologische Bedeutung der Phytoprostane in Säugetieren von Interesse. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass die im jeweiligen Organismus gebildeten Isoprostane dort auch biologische Aktivität ausüben. Dies gilt beim Säugetier für Isoprostane aus Arachidonsäure (Mueller, 1998) und bei Pflanzen für Isoprostane aus Linolensäure (Thoma et al., 2003). Dennoch bedürfen auch im pflanzlichen Organismus Phytoprostane noch genauerer Einordnung in ihrer Funktion im Signalnetzwerk. Auf diesem Gebiet ist es von Interesse, wie einzelne Metaboliten (Hormone, Fettsäuren, Aminosäuren, Zucker) auf einen Stimulus hin zu- oder abnehmen, wie diese verschiedenen Signalstoffe miteinander interagieren und wie sich dabei die Kinetiken der einzelnen Stoffe zeitlich überschneiden. Um dieses Zusammenspiel verschiedener Signalstoffe, Mediatoren und Metaboliten richtig beurteilen zu können, ist es ideal, wenn man eine möglichst universelle Aufarbeitungsmethode besitzt, mit der man sämtliche dieser Stoffe aus der selben Probe gemeinsam erfassen kann. Auch dieses Problem wird in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und die Basis für weiterführende Untersuchungen des pflanzlichen Metaboloms geschaffen, die es möglich machen werden, die Rolle der Phytoprostane als Signalstoffe in der Pflanze noch besser zu verstehen.

I.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidation

I.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Für die nichtenzymatische Bildung von Lipidperoxidationsprodukten werden lediglich ungesättigte Lipide und Sauerstoff benötigt. Von wesentlicher Bedeutung für die Autoxidation von Lipiden ist die Anwesenheit von reaktionsfähigem Sauerstoff. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$, das Superoxid-Anion $\bullet\text{O}_2^-$ bzw. dessen protonierte Form, das Perohydroxyl-Radikal $\text{HOO}\bullet$, Wasserstoffperoxid sowie das Hydroxyl-Radikal $\bullet\text{OH}$.

Die direkte Anlagerung von Sauerstoff an Doppelbindungen findet normalerweise nicht statt, da im Grundzustand die Aktivierungsenergie für diese Reaktion sehr hoch ist. Die Ursache dafür liegt in hohen Spin-Barrieren, denn beide Reaktionspartner liegen in unterschiedlichen Elektronenkonfigurationen vor: Das Kohlenstoffatom einer Methylengruppe befindet sich normalerweise im Singulettzustand. Der Sauerstoff hingegen befindet sich im Grundzustand im Triplettzustand $^3\text{O}_2$, wo beide Elektronen verschiedene Molekülorbitale besetzen und gleichen Spin haben (Abb. 1). Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ ist molekularer Sauerstoff, bei dem sich die beiden äußeren Elektronen auf einem höheren Energieniveau befinden. Durch Aufnahme von 92 kJ geht der Sauerstoff in den 1. Singulett-Zustand über, bei dem die beiden Elektronen gepaart sind. Es existiert auch ein zweiter, noch weitere 63 kJ/mol energiereicherer Singulett-Zustand. Bei diesem sind beide Elektronen wieder ungepaart, besitzen aber antiparallelen Spin. Singulett-Sauerstoff wird gebildet, wenn Licht einen Sensibilisator (z.B. Chlorophyll) aktiviert und dieser die aufgenommene Energie weiter auf ein Sauerstoffmolekül überträgt. Gehemmt wird die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Quencher wie Carotinoide, welche die Energieübertragung vom Sensibilisator auf den Sauerstoff verhindern und aktiviertem Sauerstoff selbst die Energie nehmen können. Danach geben die Quencher diese Energie strahlungslos als Wärme wieder ab.



Abb. 1: Singulett-Sauerstoff. Links sind die unterschiedlichen Energieniveaus und rechts ist die jeweils dazugehörige Besetzung der Molekülorbitale dargestellt.

Die Lebensdauer eines Sauerstoffmoleküls im 1. Singulett-Zustand beträgt 5 Minuten in der Gasphase und 1 Mikrosekunde bis 1 Millisekunde in Flüssigkeiten. Der 2. Singulettzustand ist noch instabiler und existiert in der Gasphase 7-12 Sekunden und in Flüssigkeiten 1 Nanosekunde und spielt damit bei biologisch relevanten Prozessen keine Rolle. Aufgrund seiner reaktiven Eigenschaften kann Singulett-Sauerstoff direkt mit ungesättigten Fettsäuren reagieren und mit dieser ein Hydroperoxid bilden (Abb. 2). Dabei läuft eine Cyclo-Addition ab:

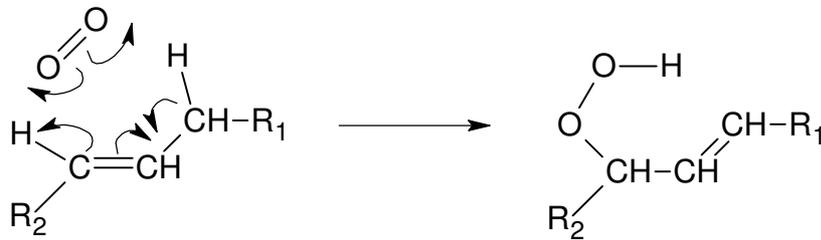
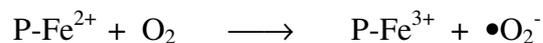


Abb. 2: Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an ungesättigte Fettsäuren.

Freie Radikale entstehen in Zellen ständig als Nebenprodukt des normalen Zellstoffwechsels, zum Beispiel bei der Atmungskette in den Mitochondrien, daneben aber auch durch Enzyme wie Cytochrom P450, NADPH-Oxidasen oder Lipoxygenasen. In einigen Situationen werden sie von den Organismen gezielt gebildet, etwa während der Phagozyten-Aktivierung bei Entzündungsvorgängen oder beim „oxidative burst“ in der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen. Daneben können sie auch aus exogenen Quellen wie Umweltgiften (Ozon, Stickoxide) oder Zigarettenrauch hervorgehen (Siems et al., 1998).

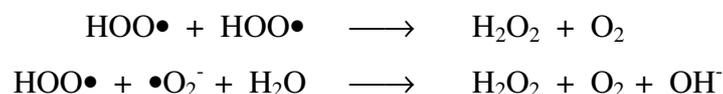
Das Superoxid-Anion ist nur wenig reaktiv. Produziert wird es entweder von Flavinenzymen wie der Xanthinoxidase oder es entsteht autoxidativ durch Häm(in)-Katalyse:



Häm-Fe-Proteine kommen in tierischen Geweben in den Proteinen Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C sowie in Pflanzen in den Enzymen Katalase und Peroxidase vor.

In wässriger Lösung liegt das Superoxid-Radikal im Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure, dem Perhydroxyl-Radikal $HOO\bullet$ (bei pH 7,4 < 1 % protoniert) vor. Das Perhydroxyl-Radikal kann im Gegensatz zum Superoxidradikal direkt mit ungesättigten Fettsäuren reagieren (Bielski et al., 1972).

Durch Disproportionierung von $\bullet O_2^-$ und $HOO\bullet$, welche spontan (nur sehr langsam) oder katalysiert durch Superoxiddismutase (schnell) abläuft, entsteht Wasserstoffperoxid H_2O_2 .



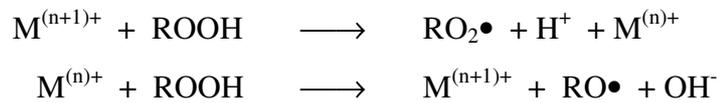
Wasserstoffperoxid ist in vivo relativ stabil ($T_{1/2} = 1$ ms), allerdings auch ziemlich reaktionsträge und kann selbst keine Lipidperoxidation auslösen. Es kann biologische Membranen durchdringen und somit weit weg vom Entstehungsort diffundieren. Wasserstoffperoxid disproportioniert spontan oder durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff oder wird von Peroxidasen (Glutathion-Peroxidase, Ascorbat-Peroxidase) abgebaut.

Das reaktivste Sauerstoffradikal ist das Hydroxylradikal, welches ein Wasserstoffatom direkt aus jeglichen C-H-Bindungen abstrahieren kann. Seine Halbwertszeit in Zellen beträgt etwa eine Nanosekunde. Die Bildung des Hydroxylradikals erfolgt aus Wasserstoffperoxid, haupt-

sächlich durch Katalyse von Übergangsmetallen (Fe, Cu, Co) in der Fenton-Reaktion (Cheng et al.; 2002).



Analog dazu können aus organischen Hydroperoxiden durch Metallkatalyse Peroxylradikale $ROO\bullet$ und Alkoxyradikale $RO\bullet$ entstehen:



I.1.2 Oxidativer Stress

Ein vermehrtes Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und freie Sauerstoffradikale) und einem gleichzeitig vorliegenden Defizit an antioxidativen Schutzmechanismen wird als oxidativer Stress bezeichnet. Zu den antioxidativ wirksamen Schutzmechanismen gehören Enzyme wie die Katalase oder die Superoxid-Dismutase sowie niedermolekulare Antioxidantien wie Vitamin E oder C, Selen und Glutathion. Im Menschen wird oxidativer Stress als eine Ursache vieler akuter und chronischer Krankheiten angesehen, wie beispielsweise Arteriosklerose, rheumatoide Arthritis, neurodegenerative Krankheiten (Alzheimer und Parkinson) und Krebs (Montuschi et al., 2004). Die dabei gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies sind von wesentlicher Bedeutung für die Pathogenese, denn Singulett-Sauerstoff und freie Radikale reagieren sehr leicht mit Biomolekülen wie Lipiden, Proteinen oder DNA und führen so direkt zu Zellschädigung und Gewebszerstörung. Nachfolgend soll die Bildung von Oxylipinen durch nichtenzymatische Lipidperoxidation erläutert werden.

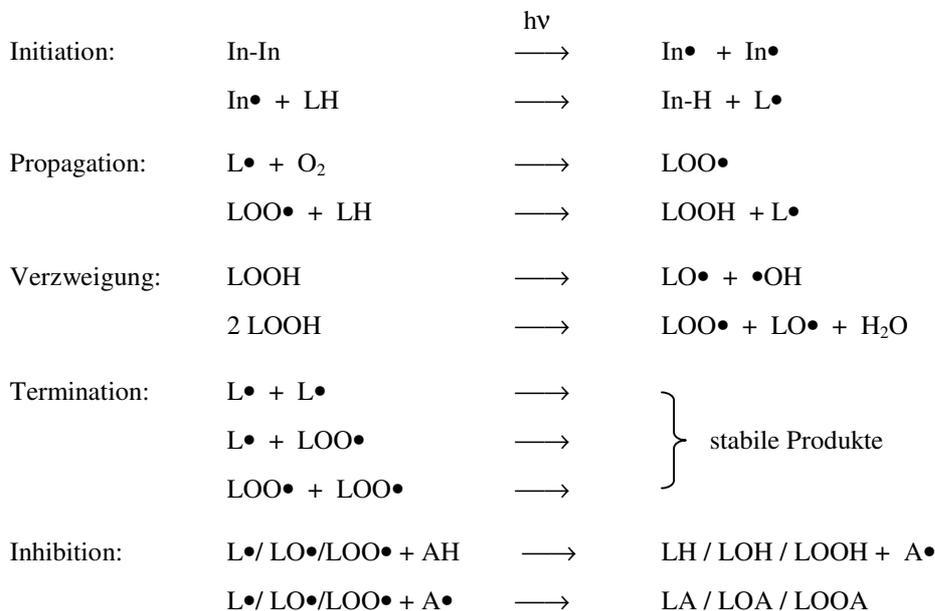
I.1.3 Mechanismus der Lipidperoxidation

Lipide sind ein Hauptangriffsziel freier Radikale, welche eine Lipidperoxidation initiieren. Lipidperoxidation ist eine autokatalytische Kettenreaktion, die nur durch Antioxidantien beendet werden kann (Yin und Porter, 2005). Der dabei ablaufende Mechanismus ist in Abbildung 3 gezeigt: Das Starterereignis ist die Bildung eines Initiatorradikals $In\bullet$. Dieses kann durch Zersetzung eines Hydroperoxids von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} oder Cu^+ in der Fenton-Reaktion (s.o.) entstehen, durch Gamma-Strahlung oder UV-Licht gebildet werden oder auch eine von Enzymen produzierte reaktive Sauerstoff-Spezies sein. Das Initiatorradikal induziert dann die Bildung eines Lipidradikals $L\bullet$. Dabei hängt die Energie für die Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms von dessen Position im Molekül ab. Die Dissoziationsenergie der C-H-Bindung ist am niedrigsten für die bisallylischen Position, da das ungepaarte Elektron im ent-

stehenden Pentadienylradikal besonders gut delokalisiert werden kann. Aus diesem Grund ergibt sich für die Autoxidationsanfälligkeit der Fettsäuren folgende Reihenfolge:

Ölsäure < Linolsäure < Linolensäure < Arachidonsäure

Bei der Propagation der Lipidperoxidation wird an das Lipidradikal molekularer Sauerstoff angelagert. Dabei entsteht ein Fettsäure-Peroxy-Radikal LOO•. Dieses kann nun seinerseits wieder ein Wasserstoff-Atom von einem anderen Lipid-Molekül L-H abstrahieren, was wiederum zu einem Lipidradikal führt. Diese Reaktion ist allerdings, bedingt durch die relative Stabilität der Peroxy-Radikale, relativ langsam und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Kettenreaktion dar. Bei der Kettenverzweigung tritt ein Zerfall der Hydroperoxide auf, welcher durch Schwermetalle und Häm-Verbindungen katalysiert werden kann (s.o.). Zur Termination gelangt der Prozess schließlich, wenn zwei Radikale aufeinandertreffen und sich miteinander verbinden. Durch Antioxidantien (z.B. Phenole) kann die Kettenreaktion unterbrochen werden, da Antioxidantien stabile Radikale liefern. In der Regel kann ein Molekül Antioxidans zwei Radikale abfangen.



In = Initiator, L = Lipid, A = Antioxidans

Abb. 3: Radikalkettenreaktion der Lipidautoxidation.

Dieser hier vorgestellte Reaktionsmechanismus ist die grundlegende Basis für die Bildung von Isoprostanen und Phytosteranen. Diese Lipidperoxidationsprodukte werden aus freien oder veresterten Fettsäuren unter Einwirkung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies gebildet.

I.2 Oxylipine im Tier

Die Lipidperoxidation kann nicht nur *in vitro* ablaufen, sondern auch in Organismen können durch autoxidative Prozesse Oxylipine gebildet werden. Daneben gibt es noch eine Reihe von Enzymen, die aus ungesättigten Fettsäuren direkt Oxylipine verschiedenster Struktur produzieren. Dabei wird im Tier vor allem die 4-fach ungesättigte C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure) zu Lipidmediatoren umgesetzt. Allgemein heißen Oxylipine die aus Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen bestehen Eikosanoide. Diese Gruppe gehört zu den am intensivsten erforschten Oxylipin-Familien.

Die ersten Eikosanoide – die Prostaglandine – wurden 1935 von Ulf von Euler (Stockholm) im menschlichen Sperma entdeckt. Unter der Bezeichnung „Prostaglandine“ beschrieb er Substanzen aus dem menschlichen Samen, welche blutdrucksenkende und gefäßmuskelstimulierende Wirkungen zeigten. Ihren Namen erhielten die Prostaglandine aufgrund der falschen Annahme, dass diese Substanzen von der Prostata sezerniert werden (Russell et al, 1975).

I.2.1 Bildung von Eikosanoiden

I.2.1.1 Enzymatische Bildung von Prostanoiden

Tatsächlich scheint die Bildung von Eikosanoiden jedoch in jedem Gewebe stattfinden zu können. Die dazu benötigte Arachidonsäure muss allerdings zuerst aus den Phospholipiden der Plasmamembran mit entsprechenden Phospholipasen (v.a. des A₂-Typs = PLA₂) herausgeschnitten werden. Extrazelluläre Signale wie Hormone, Neurotransmitter, Stressfaktoren, Umweltreize u.a. können zu einer Aktivierung der cytoplasmatischen PLA₂ führen. Die so freigesetzte Arachidonsäure kann dann enzymatisch zu verschiedenen Oxylipinen umgesetzt werden: Durch Cytochrom P450-haltige Monooxygenasen werden Hydroxy- und Epoxyeikosanoide produziert. Mittels Lipoxygenasen werden u.a. Leukotriene gebildet. Die Aktivität der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) führt zur Synthese von Prostanoiden, weshalb diese Enzyme auch Prostaglandin-H-Synthasen genannt werden (Marks, 2000). Die Isoform COX-1 findet sich in allen Säugetiergeweben, produziert permanent eine geringe Menge an Prostaglandin H und ist nicht induzierbar. COX-2 dagegen ist nur in wenigen Organen wie Gehirn, Lunge, Niere und Hoden konstitutiv vorhanden. In allen anderen Geweben wird COX-2 ausschließlich nach Stimulation durch Cytokine, Wachstumsfaktoren oder andere mitogene Faktoren kurzzeitig gebildet (Rocca und Fitzgerald, 2002). Die Prostaglandin-H-Synthase besitzt zwei katalytisch aktive Zentren, welche auf gegenüberliegenden Seiten des Enzyms angeordnet sind. Die Cyclooxygenase-Seite des Enzyms führt die beiden Sauerstoffmoleküle ein und verknüpft die C-Atome 8 und 12 miteinander, wobei ein cyclisches Endoperoxid – Prostaglandin G₂ – entsteht. Dieses wird dann sofort von der Hydroperoxidase zu Prostaglandin H₂ reduziert (Abb. 4). Diese Verbindung ist allerdings instabil und wird durch weitere Enzyme in andere Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane oder nichtenzymatisch in Levuglandine (Secoprostanoiden) umgewandelt (Hansen et al., 1999; Fischer, 1997). Bei den Prostaglandinen kennt man die Klassen A, B, D, E, F, G, H; J und deoxy-J,

welche sich in der Substitution ihres Ringsystems unterscheiden. Dabei können aus PGH_2 sämtliche Prostaglandine direkt oder über mehrere Reaktionsschritte entstehen. Die Prostaglandin-Endoperoxid-Isomerasen produzieren PGE_2 und PGD_2 . $\text{PGF}_{2\alpha}$ entsteht entweder über nichtenzymatische Reduktion von PGH_2 oder aus PGE_2 mittels einer 9-Keto-Reduktase. PGE_2 kann im Serum zu PGA_2 dehydratisiert werden, welches über das hypothetische Zwischenprodukt PGC_2 weiter zu PGB_2 isomerisiert werden kann. Dabei ist die Dehydratisierung ein relativ langsamer Prozess. Die Isomerisierung hingegen verläuft etwas schneller: Nach 3h in menschlichem Serum sind 10 % PGA_1 zu PGB_1 umgesetzt. Für diese Reaktionen wurden 1975 von Polet und Levine entsprechende Enzyme im Serum postuliert (PGE -Dehydrase, PGA -Isomerase, PGC -Isomerase), welche allerdings nie gefunden wurden. Tatsächlich werden diese Aktivitäten durch Albumin vermittelt (Fitzpatrick et al., 1984). PGD_2 kann spontan zu PGJ_2 dehydratisieren, welches spontan weiter zu 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 oder in Gegenwart von Albumin zu Δ^{12} - PGJ_2 dehydratisiert werden kann (Shibata et al., 2002).

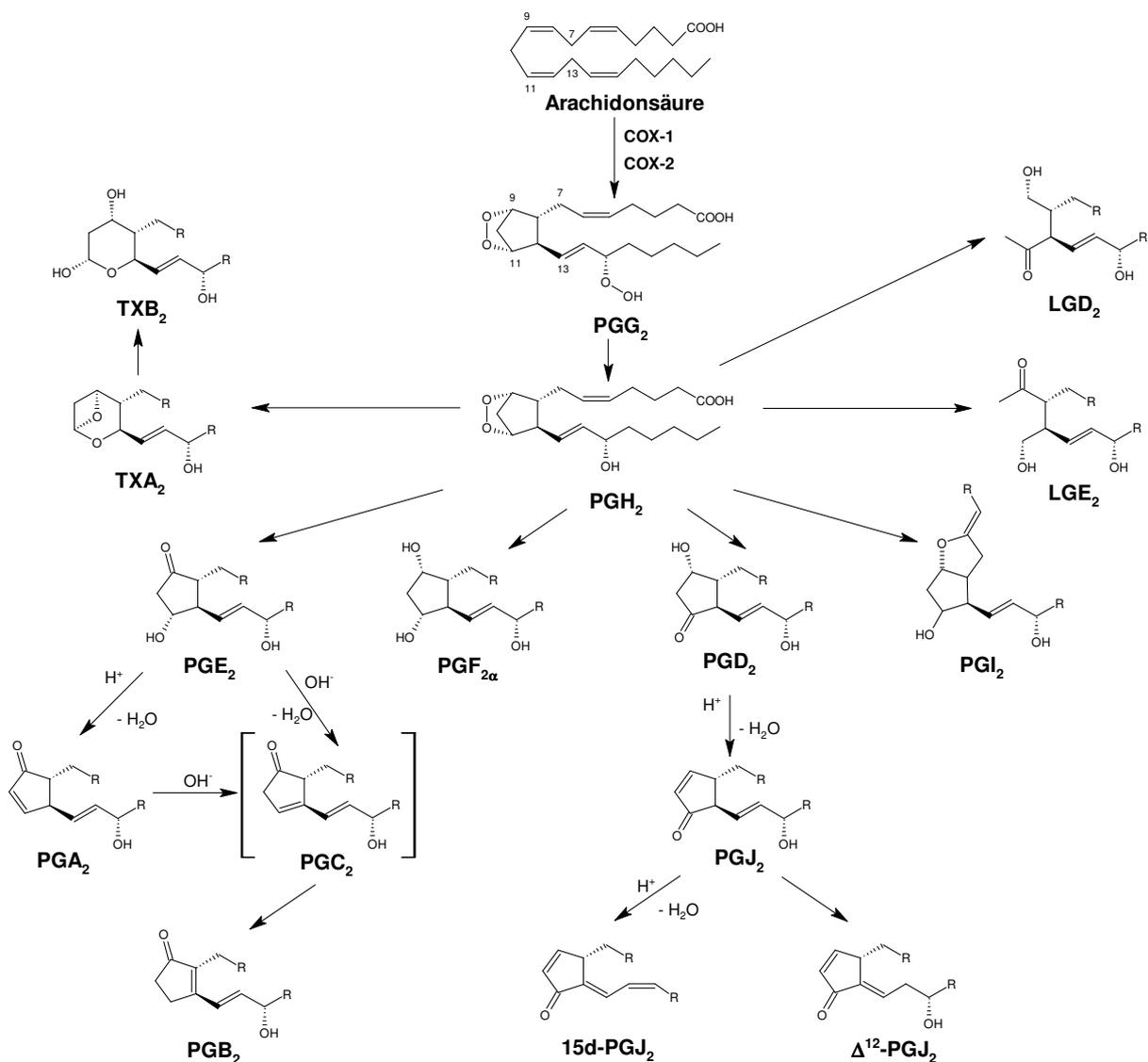


Abb. 4: Synthese von Prostaglandinen, Thromboxanen und Levuglandinen.

Prostanoide mit nur einer Doppelbindung in der Seitenkette (z.B. PGH_1) werden mittels Cyclisierung von di-homo- γ -Linolensäure durch COX-1 und 2 hergestellt (Tapiero et al., 2002). Diese Precursor-Fettsäure wird durch Desaturierung der Linolsäure (aus der Nahrung) zur γ -Linolensäure und anschließender Kettenverlängerung um 2 C-Atome synthetisiert. Ebenso können aus Eikosapentaensäure (durch die Nahrung über Meerespflanzen und Seetiere aufgenommen) Prostanoide mit 3 extracyclischen Doppelbindungen synthetisiert werden.

I.2.1.2 Vorkommen von Prostaglandinen

In Säugetiergeweben kommen Prostaglandine typischerweise nur in sehr geringen Mengen vor: 0,03-17 nmol/l im menschlichen Serum und 1 – 100 pmol/g in Geweben (Russell et al., 1975). Die basalen Spiegel von Prostaglandinen im Blutplasma gesunder Menschen sind nur spärlich dokumentiert: PGA_1 kommt im Konzentrationsbereich von ~0,07 nmol/l vor (Zia, Golub und Horton, 1975), PGA_2 weniger als 0,03 nmol/l (Green und Steffenrud, 1976), PGB_1 von ~0,14 nmol/l (Hishinuma et al., 1995), PGE_1 ~0,25 nmol/l (Allegra et al., 1976), PGE_2 ~0,45 nmol/l und $\text{PGF}_{2\alpha}$ ~0,71 nmol/l (Yang und Gao, 1999). Die cerebrospinale Flüssigkeit enthält ~0,03 nmol/l PGE_2 und ~0,02 nmol/l $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Aizawa und Yamada, 1976).

In körperlichen Ausnahmesituationen kann eine deutliche Zunahme der systemischen Prostaglandin-Konzentrationen auftreten: Nach Induktion einer Entzündung mit LPS konnten Plasmaspiegel von mehr als 300 nmol/l PGE_2 beobachtet werden (von Aulock et al., 2003). Bei Asthmatikern kann der Plasmaspiegel von PGE_1 auf ~1,3 nmol/l ansteigen (Allegra et al., 1976). Ein dramatischer Anstieg von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde auch bei akuten Schädel-Hirn-Verletzungen gemessen: Im Falle von leichten Verletzungen stiegen die Plasmaspiegel von PGE_2 auf ~0,7 nmol/l und von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf ~1,2 nmol/ml, wohingegen sie bei schweren Schädigungen bis auf ~1,8 nmol/l PGE_2 bzw. ~1,9 nmol/l $\text{PGF}_{2\alpha}$ ansteigen können (Yang und Gao, 1999). Bei zentralnervösen Erkrankungen wurden höhere Spiegel von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der cerebrospinalen Flüssigkeit detektiert: ~0,48 nmol/l bei ischämischen Ereignissen, ~0,43 nmol/l bei multipler Sklerose, weiterhin wurden erhöhte Werte bei Hirntumoren und entzündlichen Prozessen festgestellt (Egg et al., 1980). Vor kurzem wurde auch bei Rauchern eine erhöhte endogene Bildung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ festgestellt (Helmersson et al., 2005).

I.2.1.3 Autoxidative Bildung von Isoprostanen

Neben der enzymatischen Synthese ist die Bildung von Prostanoiden auch auf autoxidativem Wege möglich. Die Bildung von prostaglandinartigen Verbindungen während der Autoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren wurde erstmals 1974 von Pryor et al. in vitro beschrieben. Ihre Bildung in vivo wurde allerdings erst 1990 von Morrow et al. entdeckt. Da diese nichtenzymatisch gebildeten Prostanoide racemische Isomere der Prostaglandine sind, wurden sie Isoprostane genannt. Die Seitenketten der Isoprostane nehmen dabei im Gegensatz zu den enzymatisch gebildeten Prostaglandinen überwiegend die cis-Position ein. Mittlerweile ist die Existenz der Isoprostanklassen F, E, D A und J in vivo bewiesen (Morrow et al., 1990; Morrow et al., 1993; Chen et al., 1999).

Isoprostane entstehen durch nichtenzymatische Peroxidation von Arachidonsäure. Da die Arachidonsäure 4 allylische Doppelbindungen besitzt, können daraus 3 verschiedene meso-

meriestabilisierte Arachidonyl-Radikale entstehen. Diese können abhängig von der Stelle der Wasserstoffabstraktion und Sauerstoffanlagerung vier verschiedene Peroxyl-Radikale bilden. So kann sich im Gegensatz zu den Prostaglandinen der Fünfring auch durch Verknüpfung anderer C-Atome bilden (Russell et al., 1975). Die dabei entstehenden Konstitutionsisomere werden als Regioisomere Typ III-VI bezeichnet. In vivo werden ungefähr gleiche Mengen der Regioisomere III und VI produziert, aber nur untergeordnete Mengen von Typ IV und V (Cracowski et al., 2002). Bei der Bildung der Isoprostane wird das primär entstehende Peroxylradikal in mehreren Schritten und unter Anlagerung eines zweiten Sauerstoffmoleküls in ein bicyclisches Endoperoxid umgelagert, welches Prostaglandin G₂ entspricht. Nach dem von Pryor et al. vorgeschlagen „Endoperoxid-Mechanismus“ (gezeigt in Abb. 5) erfolgt nach der Bildung des Peroxy-Radikals unmittelbar dessen Endocyclisierung zum cyclischen Endoperoxid. An das radikalische Kohlenstoff-Atom der Seitenkette wird dann nochmals ein Molekül Sauerstoff addiert. Durch Anlagerung eines Wasserstoffs erhält man Isoprostan G₂, welches anschließend zum Isoprostan H₂ reduziert wird. Von Corey et al. wurde ein anderer interessanter Mechanismus zur Isoprostanbildung vorgeschlagen, welcher auf einem Dioxetan-Intermediat beruht. Mittlerweile konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Autoxidation nach dem Dioxetan-Mechanismus sehr unwahrscheinlich ist (Yin et al., 1993).

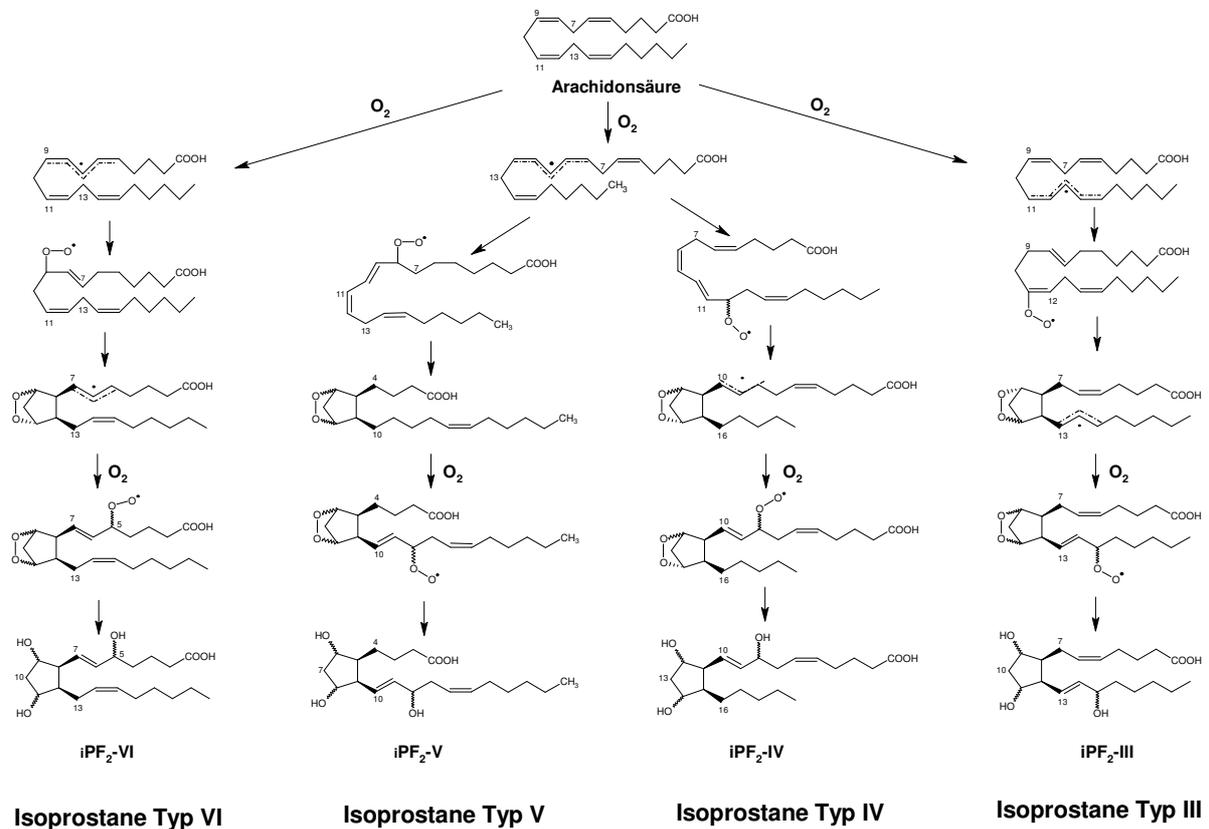


Abb. 5: Bildung von Isoprostanen nach dem Endoperoxid-Mechanismus.

Das bei der Autoxidation zunächst entstehende Prostaglandin H₂ entsprechende Zwischenprodukt ist instabil und besitzt eine Halbwertszeit von ~ 5 Minuten. Es kann entweder zu F₂-Isoprostanen reduziert oder zu E₂-, D₂-, A₂-, J₂-Isoprostanen, Isothromboxanen und Isoketalen

(hochreaktive γ -Ketoaldehyde) umgelagert werden. Die vollkommen autoxidative Bildung bedingt natürlich das Entstehen einer Vielzahl von Isomeren. So setzt sich beispielsweise die Klasse der F₂-Isoprostan-Verbindungen aus 4 Regioisomeren zusammen, welche ihrerseits jeweils wieder aus acht racemischen Diastereomeren bestehen.

Weiterhin ist auch die Synthese von F₃-Isoprostanen aus Eikosa-pentaensäure (C_{20:5} ω ₃) bekannt (Nourooz-Zadeh et al., 1997), wobei allerdings 6 Regioisomeren gebildet werden können. Zu den Isoprostanen analoge Oxylipine können auch aus Docosa-hexaensäure (C_{22:6} ω ₃) geformt werden (Roberts et al., 1998; Reich et al., 1999; Fam et al., 2002). Die aus Docosa-hexaensäure gebildeten F₄-Isoprostane setzen sich allerdings aus 8 Regioisomeren zusammen, weil hier die Ausgangs-Fettsäure 6 Doppelbindungen besitzt. Nachdem diese Fettsäure vor allem im Nervensystem und im Gehirn vorkommt, nennt man die aus ihr entstandenen Prostanoid Neuroprostan und ihre Ketoaldehyde Neuroketale.

I.2.1.4 Vorkommen von Isoprostanen

In vivo werden Isoprostane in Gefäßmuskelzellen, Mesangialzellen, Nierenepithelzellen, Blutplättchen und Monozyten gebildet (Habib und Badr, 2004). Sie entstehen zunächst verestert in den Phospholipiden, aus welchen sie durch eine Lipase freigesetzt werden (Morrow et al., 1992). F₂-Isoprostane konnten verestert im Gewebe von Leber, Niere, Herz, Lunge, Gehirn, Aorta und Skelettmuskeln nachgewiesen werden (Morrow und Roberts, 1997). Sie wurden bisher in sämtlichen untersuchten Körperflüssigkeiten gefunden, unter anderem in Plasma, Urin, Galle, Magensaft, Lymphe, Gelenkschmiere und Liquor (Morrow und Roberts, 1996). Über 90 % der F₂-Isoprostane im Plasma liegen verestert vor (vermutlich in LDL/HDL-Lipoproteinen). Im menschlichen Plasma finden sich mit 15-115 pmol/l nur geringe Mengen freier F₂-Isoprostane (Morrow et al., 1990). Nach alkalischer Hydrolyse steigen ihre Konzentrationen auf ~ 700 pmol/l (Ferraro et al., 2003) an. Urin von gesunden Menschen enthält 8-iso-PGF_{2 α} im Bereich von 160 bis 1270 pmol / mmol Kreatinin (Morrow et al., 1990). Im Lebergewebe von Ratten fanden sich verestert ~ 17 pmol 8-iso-PGF_{2 α} / g (Morrow et al., 1992). Die basalen Mengen der D₂- und E₂-Isoprostane wurden bisher nur verestert im Gewebe von Rattenlebern bestimmt und lagen dort mit ~ 2,5 pmol/g bei etwa einem Drittel der Menge von F₂-Isoprostanen (Morrow et al., 1993). In freier Form konnten im Blut gesunder Tiere keine D₂- und E₂-Isoprostane detektiert werden, d.h., sie kommen in Konzentrationen < 15 pmol/l vor; sie steigen aber nach Induktion mit Tetrachlormethan bis auf ~ 600 pmol/l an. Auch die A₂- und J₂-Isoprostane wurden bisher nur verestert im Lebergewebe von Ratten gefunden, wo ihre basalen Spiegel bei ~ 14 pmol/g liegen. Frei im Blut waren sie selbst nach Induktion mit Tetrachlormethan nicht nachweisbar, was wahrscheinlich auf eine schnelle Konjugatbildung mit Glutathion zurückzuführen ist (Chen et al., 1999).

Oxidativer Stress führt zu einem dramatischen Anstieg der in vivo gebildeten Isoprostanmengen. So induziert die Gabe von Tetrachlormethan •CCl₃-Radikale und damit Lipidperoxidation. Dabei steigen die Plasmaspiegel von F₂-Isoprostanen auf das 200-fache (Morrow et al., 1990), die veresterten Isoprostane auf das 142-fache (Morrow et al., 1992). Die veresterten E₂/D₂-Isoprostane in der Leber erhöhen sich auf das 94-fache (Morrow et al., 1994) und die veresterten A₂/J₂-Isoprostane auf das 24-fache (Chen et al., 1999). Rauchen, das endogen mit der Bildung freier Radikale und Oxidantien verbunden ist, führt zu einer Zunahme der freien F₂-Isoprostane im Plasma um 235 % (Morrow und Roberts, 1997). Auch durch Konsum von Alkohol (0,9g / kg Körpergewicht) steigt die mit dem Urin ausgeschiedene Menge von iPF_{2 α} -

III vorübergehend stark an und beträgt im Zeitraum von 0-12h nach Alkoholgenuss das 4-fache der Ausgangsmenge (Meagher et al., 1994). Bei Allergikern führt Kontakt mit Allergenen zu einer Zunahme der Urinausscheidung von 8-iso-PGF_{2α} auf das 1,7-fache (Dworski et al., 1999). Auch bei einigen Krankheiten des Menschen, die mit oxidativen Schäden in Verbindung gebracht werden (Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen, Lungen-, Leber- und Nierenkrankheiten sowie neurodegenerative Erkrankungen) steigen die Plasmaspiegel von F₂-Isoprostanen auf ein Vielfaches an (Montuschi et al., 2004).

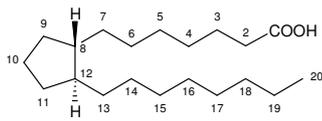
I.2.1.5 Begleitende Freisetzung von Prostaglandinen und Isoprostanen

In vielen physiologischen Situationen werden Prostaglandine und Isoprostane oft auch nebeneinander freigesetzt. Dies ist gut an den oben aufgeführten Beispielen von Asthmatikern und Rauchern zu erkennen (Allegra et al., 1976; Dworski et al., 1999; Helmersson et al., 2005). Ähnliches konnte auch bei entzündlichen Prozessen beobachtet werden. Experimentell wurde die gleichzeitige verstärkte Freisetzung von Prostaglandinen und Isoprostanen von Jourdan et al. 1999 bei einer Cytokin-induzierten Entzündung mit menschlichen Gefäßmuskelzellen in vitro untersucht. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass bei Entzündungsvorgängen die Bildung von Isoprostanen als Nebenprodukt der COX-2 an Bedeutung gewinnen kann.

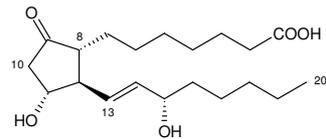
I.2.2 Struktur und Nomenklatur der Prostaglandine und Isoprostane

Bei der Einführung der Nomenklatur der C₂₀-Eikosanoide wurde der von Euler ursprünglich vergebene Name „Prostaglandine“ beibehalten. Mittlerweile bezieht sich die Bezeichnung „Prostaglandine“ auf eine Gruppe von Oxylipinen, welche die in der Natur nicht vorkommende, 1963 vorgeschlagene, Prostansäure als Grundstruktur besitzen (Abb. 6). Anhand der Substitution des Cyclopentan-Rings der Prostansäure mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen werden die Prostaglandine in verschiedene Klassen eingeteilt. Der numerische Index (z.B. „1“ in PGE₁) gibt die Anzahl der Doppelbindungen in den aliphatischen Seitenketten wieder. Die räumliche Anordnung der Hydroxylgruppe des Cyclopentanrings in Bezug auf die Ringebene wird mit α (unterhalb) und β (oberhalb) ausgedrückt. So lautet der systematische Name für PGE₁ beispielsweise 9-oxo-11α-15(S)-dihydroxy-13-trans-Prostensäure (Russell et al., 1975).

Den autoxidativ geformten Prostaglandin-Isomeren wurde vom Komitee für Eikosanoid-Nomenklatur der Namen „Isoprostane“ gegeben. Die Benennung erfolgt gemäß der Nomenklatur für Prostaglandine, wobei Abweichungen von der Konfiguration der Prostaglandine durch entsprechende Präfixe („iso“, „epi“) gekennzeichnet werden. Dabei verwenden jedoch verschiedene Autoren unterschiedliche Systeme und so existiert eine Nomenklatur nach Taber und eine Nomenklatur nach Rockach.

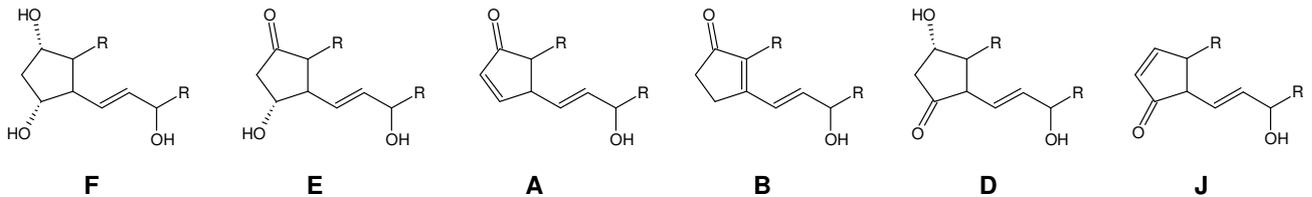


Prostansäure

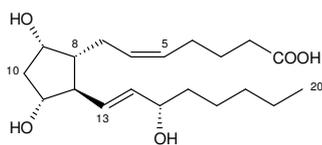


**Prostaglandin E₁ =
9-oxo-11α-15(s)-dihydroxy-13-trans-Prostensäure**

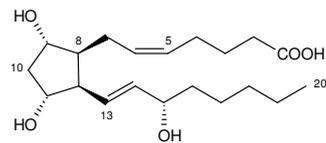
Verschiedene Ringsysteme von Prostaglandinen und Isoprostanen:



Prostaglandine und Isoprostane:



Prostaglandin F_{2α}



**8-iso-PGF_{2α}
15-F_{2t}-IsoP bzw. iPF_{2α}-III**

Abb. 6: Nomenklatur der Prostaglandine und Isoprostane. Oben ist links die Struktur der Prostansäure und rechts die systematische Nomenklatur von Prostaglandinen ausgehend von der Prostansäure am Beispiel von Prostaglandin E₁ aufgezeigt. In der Mitte ist die Bezeichnung der verschiedenen Prostaglandin-Ringsysteme dargestellt. Unten ist am Beispiel von PGF_{2α} der Unterschied von Prostaglandinen (links) und Isoprostanen (rechts) zu sehen. Dabei ist das F₂-Isoprostan in der ersten Zeile mit der alten Bezeichnung versehen. In der unteren Zeile wurde links die Taber-Nomenklatur und rechts die Rockach-Nomenklatur verwendet.

Bei der Nomenklatur nach Taber (Taber et al., 1997) werden die Isoprostane mit IsoP abgekürzt. Die Regioisomere werden hier mit einer vorangestellten Ziffer bezeichnet, welche die Nummer des Kohlenstoffatoms wiedergibt, an welchem sich die Hydroxylgruppe der Seitenkette befindet (5-IsoPs, 8-IsoPs, 12-IsoPs und 15-IsoPs). Die Anordnung der Seitenketten relativ zu den Hydroxylgruppen des Cyclopentanrings wird mit den Subskripten „t“ für trans bzw. „c“ für cis wiedergegeben. Demnach wird 8-iso-PGF_{2α} bei Taber zu 15-F_{2t}-IsoP. Allerdings hat diese Nomenklatur den Nachteil, dass sie für andere Isoprostane wie die Neuroprostane oder die Phytprostane schlecht anwendbar ist. Auch für endogen bei der Metabolisierung von Isoprostanen gebildete dinor-dihydro-Isoprostane ist diese Nomenklatur schlecht anwendbar, da sich hier die Klassifizierungsnummer ändert.

Dieses Problem besteht bei der Nomenklatur nach Rockach (Rockach et al., 1997) nicht, da hier ein universelles System entwickelt wurde. Die Benennung der Regioisomere wird in römischen Zahlen angegeben und richtet sich ausgehend vom ω-C-Atom nach der Nummer des Kohlenstoffs, von dem der Wasserstoff abgespalten und wo der Sauerstoff angelagert wurde.

Die aus α -Linolensäure gebildeten Isoprostane setzen sich aus den Typen I und II zusammen (siehe Abb. 12), die Isoprostane aus γ -Linolensäure aus den Regioisomeren III und IV sowie die Regioisomere aus Arachidonsäure aus den Typen III bis VI (siehe Abb. 5). Details dieser Nomenklatur sind in Übersichtsartikeln (Rockach et al., 1997; Mueller, 1997) beschrieben. Deshalb soll in dieser Arbeit im Folgenden die Rockach-Nomenklatur verwendet werden. In der Rockach-Nomenklatur, wird die Abkürzung iP für Isoprostan verwendet. Das Präfix „epi“ gibt Abweichungen der Hydroxylgruppe der Seitenkette von der normalen Konfiguration wieder. Mit „iso“ wird eine Inversion der Chiralität einer Seitenkette ausgedrückt. Somit wird 8-iso-PGF_{2 α} nach Rockach mit iPF_{2 α} -III bezeichnet. Im Folgenden werden in dieser Arbeit sämtliche Isoprostane und Phytoprostane entsprechend der Rockach-Nomenklatur benannt.

I.2.3 Diffusion und Transport von Prostanoiden

PGH₂ wird im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert, diffundiert durch die ER-Membran und wird an der cytoplasmatischen Seite des ER durch Synthesen zu polareren Prostanoiden umgebildet. Um mit den spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche reagieren zu können, müssen sie die Zelle verlassen. Dies geschieht durch Diffusion, wobei die meisten Prostaglandine allerdings nur sehr schlecht durch biologische Membranen diffundieren (Schuster, 2002). Außerhalb der Zelle können sie dann auch im Blutkreislauf verteilt werden.

Zur Inaktivierung, müssen Prostaglandine unter Energieverbrauch über die Plasmamembran aufgenommen werden und in das Cytoplasma gelangen, wo die Prostaglandin-Dehydrogenasen sowie weitere Prostaglandin abbauende Enzyme lokalisiert sind. Bisher wurden mehrere Prostaglandin-Carrier kloniert und charakterisiert. Der Prostaglandin-Transporter (PGT) zeigt eine breite Gewebsexpression und ist ein integrales Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen.

I.2.3.1 Prostanoid-Rezeptoren

Enzymatisch gebildete Prostanoiden dienen dem Säugetier als Lipidmediatoren. Ihre Wirkung entfalten sie über spezifische Membran-Rezeptoren, welche zur Familie der Rhodopsin-Typ-Rezeptoren gehören. Diese besitzen 7 Transmembrandomänen, wobei die Ligandenbindungsdomäne auf der Zellaußenseite angeordnet ist (Abb. 7). Über gekoppelte G-Proteine kontrollieren sie die Bildung von intrazellulären Signalmolekülen (second messengers) wie cAMP, Phospholipase C, Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerin (Ushikubi et al., 1995). Die Prostanoid-Rezeptoren werden aufgrund ihrer Affinität zu den 5 natürlich vorkommenden Prostanoiden PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} und TXA₂ klassifiziert und in fünf Gruppen eingeteilt. Diese werden gemäß der Festsetzung der internationalen Vereinigung für Pharmakologie (UPHAR) DP-, EP-, FP-, IP- (Prostacyclin) und TP- (Thromboxan) Rezeptoren genannt. Innerhalb der Gruppen kann man beim TP-Rezeptor zwei Untergruppen (DP₁ und DP₂) und beim EP-Rezeptor vier Untergruppen (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) unterscheiden, vom TP-Rezeptor existieren die Isoformen TP _{α} und TP _{β} (Armstrong, 1996). Der DP₂-Rezeptor gehört allerdings

zur Superfamilie der Formylpeptid-Rezeptoren, besitzt 7 Transmembrandomänen und ist ebenfalls an ein G-Protein gekoppelt. Da er fast ausschließlich in Th2-Zellen (daneben noch in Eosinophilen und Basophilen) exprimiert wird, wird er auch als CRTH₂-Rezeptor = Chemotactic Receptor on Th2-Cells (Scher und Pillinger, 2005) bezeichnet.

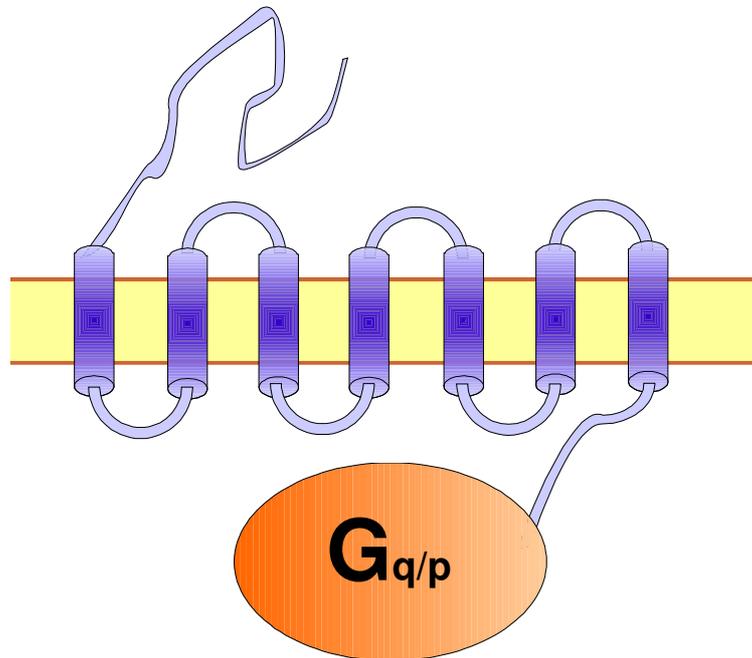


Abb. 7: Prostaglandin-Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen, gekoppelt an ein G-Protein.

Die Prostanoid-Rezeptoren können nach ihrer Funktion (bestimmt durch den Typ des G-Proteins) in 3 Gruppen eingeteilt werden: Relaxation hervorrufende Rezeptoren (IP, DP₁, EP₂ und EP₄) vermitteln einen Anstieg in der cAMP-Konzentration und induzieren Relaxation der glatten Muskeln. Die Rezeptoren (TP, DP₂, EP₁ und FP) vermitteln eine Calcium-Mobilisierung und induzieren eine Kontraktion der glatten Muskulatur. Der EP₃-Rezeptor ist ein inhibitorisch wirkender Rezeptor, welcher einen Rückgang in der cAMP-Konzentration vermittelt und Relaxation der glatten Muskeln inhibiert (Bos et al., 2004).

Jeder Rezeptor bindet seinen eigenen Liganden mit einer Dissoziationskonstante von 1,3 bis 40 nM. Daneben gibt es noch eine Kreuz-Reaktivität mit Rezeptoren für andere Prostanoiden, wobei hier die Bindungsaffinitäten für gewöhnlich mehr als zwei Größenordnungen niedriger sind (Ushikubi et al., 1995). Der FP-Rezeptor ist der am wenigsten selektivste, da er auch PGD₂ und PGE₂ in nanomolaren Konzentrationen bindet (Abramovitz et al., 2000). Einige Aktivitäten der Prostaglandine PGE₁, PGF_{2α} und PGD₂ werden auch über den Thromboxan-Rezeptor vermittelt, obwohl die K_D hier 100 nM beträgt (Hanasaki und Arita, 1989). Für PGA₂, PGB₂ und PGJ₂ sind bislang keine spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche bekannt. Allerdings konnte für die Dehydratisierungsprodukte von PGD₂ gezeigt werden, dass diese an den DP-Rezeptor ligieren können (Monneret et al., 2001; Monneret et al., 2002). Auch für PGA und PGB wird eine Interaktion mit den EP-Rezeptoren diskutiert (Parker, 1995; Straus und Glass, 2001). Im Wesentlichen vermitteln Cyclopentenone ihre Wirkungen jedoch rezeptorunabhängig im Zellkern (siehe Abschnitt I.2.4.3).

Tab. 1: Rezeptorvermittelte biologische Aktivitäten der Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxan A₂.

Eicosanoid	Rezeptor	Wirkung
PGD₂	DP₁ DP₂	Inhibierung der Plättchenaggregation, Dilatation von Gefäßen und Bronchien, Schleimsekretion, Schlafinduktion, Schmerz Aktivierung und Migration von Th2-Zellen, Eosinophilen, Basophilen
PGE₁ PGE₂	EP₁ EP₂ EP₃ EP₄	Vasodilatation, Inhibierung der Plättchenaggregation Ovulation, Fertilisation, Bronchiodilatation, Prod. von Cytokinen Fieber, Schmerz, Reduktion der Magensäure, Angiogenese Auf- und Abbau von Knochen, Produktion von Cytokinen
PGF_{2α}	FP	Zellwachstum, Mitose, Schwangerschaft, Nierenfunktion, Augenninnendruck, Konstriktion von Gefäßen und Bronchien
PGI₂	IP	Inhibierung der Plättchenaggregation, Dilatation von Gefäßen und Bronchien, Schmerz, Produktion von Cytokinen
TXA₂ PGH₂	TP_α TP_β	Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen, Konstriktion von Gefäßen und Bronchien, Zelldifferenzierung und Proliferation

Durch Ligation ihrer Rezeptoren sind Prostaglandine bereits in pico- bis nanomolaren Konzentrationen biologisch aktiv und üben im Menschen vielfältige Wirkungen aus (siehe auch Tab. 1). Sie beeinflussen vegetative Funktionen wie Zellwachstum und Zellteilung, Steuerung des lokalen Blutflusses über Vasodilatation und Vasokonstriktion, Induktion und Inhibition der Plättchenaggregation, Auslösen von Schmerzempfinden, Steuerung von Wach- und Schlafzustand sowie Regelung von Fruchtbarkeit und Schwangerschaft. Außerdem nehmen sie eine zentrale Rolle in Entzündungsgeschehen ein, indem sie den lokalen Blutfluss steigern und so Schwellung und Rötung hervorrufen, Fieber auslösen und die Immunabwehr modulieren (Sugimoto et al., 2000; Kobayashi und Narumiya, 2002; Bos et al., 2004). Dabei haben die einzelnen Prostaglandine in unterschiedlichen Geweben abhängig vom Rezeptor-Subtyp, der Zell-Population und dem Kontext der Aktivierung unterschiedliche und manchmal sogar gegensätzliche Wirkung (Hata und Breyer, 2004).

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen werden Prostaglandine sowie stabilere Prostaglandinanaloga als Arzneimittel eingesetzt (Rote Liste 2000; Bygdeman, 2003). Zur Behandlung von arteriellen Durchblutungsstörungen können ca. 20 µg Alprostadil (PGE₁) injiziert werden. Gegen Thrombosen können etwa 0,5 - 2 ng / kg Körpergewicht Iloprost, welches eine Hemmung der Thrombozytenaggregation bewirkt, infundiert werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet für Prostaglandine ist die Gynäkologie: Von Dinoproston (PGE₂), Gemprost (16,16-Dimethyl-trans-Δ²-PGE₁-Methylester), Dinoprost (PGF_{2α}) oder Carboprost (15-Methyl-PGF_{2α}) können 1-3 mg vaginal oder 5 mg intravenös zum Abbruch der Schwangerschaft oder zur Einleitung von Wehen eingesetzt werden. Ferner können mit diesen Medikamenten Hämorrhagien nach der Niederkunft behandelt werden. Einige Prostaglandine (PGE₁, E₂, A₁ und

A₂) besitzen gastroprotektive Wirkung: Sie inhibieren die Sekretion von Magensaft und stimulieren die Bicarbonatsynthese im Zwölffingerdarm und die Produktion von Schleim in der gastroduodenalen Mucosa (Wollin et al., 1976; Aly, 1987). Diese Eigenschaften macht man sich medizinisch zu Nutze, wenn man Misoprostol (15-Methyl-PGE₁) in oralen Dosen von 200 µg gegen Magengeschwüre und Geschwüre des Zwölffingerdarms verabreicht. Außerdem wird ein synthetisches Analogon von PGF_{2α} in der Augenheilkunde lokal eingesetzt. Glaukumpatienten können Augentropfen mit der Einzeldosis von 1-5 µg Latanoprost zur Senkung des Augeninnendrucks verordnet werden. Dabei bewirkt das Prostaglandin eine erhöhte Durchlässigkeit des Ziliarkörpers, was zu einer Steigerung des Abflusses von Kammerwasser über den uveoskleralen Weg führt (Stjerschantz, 2001).

Nachdem hier die vielfältigen Wirkungen von Prostaglandinen dargestellt wurden, soll im Folgenden das bislang bekannte Wirkspektrum der Isoprostane aufgezeigt werden.

1.2.3.2 Biologische Aktivität der Isoprostane

Nichtenzymatisch gebildete Isoprostane hingegen vermitteln nur begrenzt die Wirkung der ihnen entsprechenden Prostaglandine und sind auch erst in nano- bis mikromolekularen Konzentrationen biologisch aktiv. Die meisten Untersuchungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen iPF_{2α}-III durchgeführt. Für dieses Isomer konnte eine Reihe beträchtlicher biologischer Aktivitäten nachgewiesen werden. Jedoch sind diese meist Struktur-spezifisch und Isomere mit anderer Stereochemie wirken meist schwächer oder gar nicht. Auch die Anzahl der Doppelbindungen ist entscheidend für die Wirksamkeit. Die E- und F-Isoprostane sind vor allem für ihre vasomodulatorischen Eigenschaften bekannt, wobei sie auf die Zellen der glatten Muskulatur wirken. Sie können aber auch Blutplättchen aktivieren, in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten Zellproliferation und Mitogenese induzieren sowie in Herzmuskelzellen Hypertrophie hervorrufen. Ferner sind noch Wirkungen auf Nervenzellen sowie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile beschrieben. Gute Übersichtsartikel, in denen Wirkungen der Isoprostane beschrieben sind, wurden von Janssen, Cracowski und Montuschi verfasst (Janssen, 2001; Cracowski, 2004 und Montuschi et al., 2004).

Die Aktivität wird dabei meist durch direkte Ligation von Rezeptoren vermittelt, wobei hierfür die Prostanoid-Rezeptoren sowie ein putativer Isoprostanrezeptor in Frage kommen. Daneben existiert für die Isoprostane noch ein zweiter indirekter Wirkmechanismus, der bislang nur bei der Kontraktion der Arteriolen der Netzhaut und des Gehirns beobachtet wurde. Isoprostane bewirken Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur der Retina, indem sie mittels Aktivierung der Phospholipase A₂ in den Parenchym- und Endothelzellen der Retina die Synthese von TxB₂ durch die Cyclooxygenase und die Thromboxansynthese induzieren. Zu einem geringeren Ausmaß ist auch die Freisetzung von Endothelin-1 aus diesen Zellen an der Konstriktion der Gefäßmuskelzellen beteiligt. Diese Effekte werden durch einen Calciumeinstrom in die Zelle ausgelöst, welcher möglicherweise über spannungsunabhängige ligandengesteuerte Kanäle verläuft (Lahaie et al., 1998). Im Gehirn induzieren Isoprostane die Bildung von TxB₂ durch Endothel- und Astrogliazellen, was zu einer Konstriktion der cerebralen Mikrogefäße führt. Auch hier sind Calciumkanäle an der Reaktion beteiligt (Hou et al., 2000). Versuche zur biologischen Aktivität von Isoprostanen zeigten, dass E-Isoprostane in nano- oder micromolaren Konzentrationen über den EP-vermittelte Reaktionen hervorrufen können, aber dabei meist weniger potent sind als PGE₂. In Magen- und Darmzellen können iPE₂-III

den EP₁ ligieren (Sametz et al., 2000). In den Bronchien kann iPE₂-III über Aktivierung des EP₂ Dilatation der glatten Muskulatur erzeugen (Helli et al., 2004). In den Arterien und Venen der Lunge können iPE₁-III und iPE₂-III den EP₃ ligieren (Janssen und Tazzeo, 2000). Im Dünndarm können iPE₂-III den EP₄ und den FP aktivieren (Unmack et al., 2000). Auch iPF_{2α}-III kann seinen kognitiven Rezeptor ligieren, wobei es in der Induktion einiger zellulärer Reaktionen ebenso potent wie PGF_{2α} wirkt, in anderen aber ca. 10mal schwächer (Kunapuli et al., 1998). Der EP₁ allerdings kann von iPF_{2α}-III nicht aktiviert werden (Sametz et al., 2000). Auch der Thromboxan-Rezeptor kann von den E- und F-Isoprostanen im mikromolaren Konzentrationsbereich ligiert werden (Mohler et al., 1996; Audoly et al., 2000). Bei der TP-vermittelten Vasokonstriktion ist iPE₂-III mehr als 20mal potenter als PGE₂ (Cracowski et al., 2001) und iPF_{2α}-III ist etwa gleich potent wie PGF_{2α} (Mohler et al., 1996). Dabei scheinen die E-Ring-Verbindungen wirksamer als die F-Ring-Verbindungen zu sein. Für die Thromboxan-Rezeptor-Isoform TP_α auf humanen Blutplättchen ist iPF_{2α}-III offensichtlich ein schwacher Agonist, da dieses erst ab einer Konzentration von 10 μM intracelluläres Ca²⁺ mobilisieren kann (Kinsella et al., 1997). Der humane Prostacyclin-Rezeptor hingegen kann von verschiedenen F₂-Isoprostanen (iPF_{2α}-III, 9β,11β-PGF₂, 8,12-iso-iPF_{2α}-III, iPF_{2α}-IV und iPF_{2α}-VI) bis zu Konzentrationen von 10 μM nicht aktiviert werden (Kunapuli et al., 1997).

Ihren entsprechenden Prostaglandinrezeptor sowie den Thromboxanrezeptor können Isoprostane meist erst in mikromolaren Konzentrationen aktivieren. Demgegenüber aktivieren sie einen putativen Isoprostanrezeptor (Fukunaga, 1993; Janssen und Tazzeo, 2002) mit einer EC₅₀, welche im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt. Erste Hinweise auf die Existenz eines eigenständigen Isoprostan-Rezeptors neben dem TP-Rezeptor wurden in den 90er Jahren durch Ligandenverdrängungsversuche an Blutplättchen (Morrow et al., 1992; Longmire et al., 1994; Praticó et al., 1996) und glatten Gefäßmuskelzellen erhalten (Fukunaga et al., 1993 a+b). Daraufhin wurden Studien zur Ligandenbindung durchgeführt. Dabei konnten in verschiedenen Geweben 2 Bindungsstellen für TXA₂/PGH₂ gefunden werden, wovon eine Bindungsstelle niedrige Affinität und die andere hohe Affinität für die Isoprostane aufwies. 1996 wurde von Praticó et al. ein für Isoprostane hochaffiner Rezeptor aus der Membran von Thrombozyten kloniert und charakterisiert, der sich vom bekannten TP-Rezeptor in Ligandenbindung und Signaltransduktion unterschied. Entsprechende Bindungsstellen wurden auch in Glomeruli und Mesangialzellen (Fukunaga et al., 1993a) sowie in den glatten Muskelzellen und den Endothelzellen der Aorta (Yura et al., 1997) identifiziert. Bei den hochaffinen Bindungsstellen beträgt die Dissoziationskonstante für iPF_{2α}-III jeweils ~ 30 nM, wohingegen sie bei den Bindungsstellen mit niedriger Affinität mit ~ 1 μM relativ hoch ist. Wahrscheinlich entspricht die Bindungsstelle mit niedriger Affinität dem Thromboxan-Rezeptor und die Bindungsstelle mit hoher Affinität dem Isoprostan-Rezeptor.

Dabei können in einem Gewebe auch durchaus mehrere Rezeptoren gleichzeitig aktiviert werden, was dann im Gesamterscheinungsbild zu einer komplexen Wirkung führt (Elmhurst et al., 1997). Da in der Anzahl und Verteilung der einzelnen Rezeptoren bei verschiedenen Arten beträchtliche Spezies-Unterschiede existieren, kann man starke Unterschiede in den beobachteten Wirkungen der Isoprostane bei verschiedenen Arten beobachten (Janssen et al., 2000; Cracowski et al., 2000; Cracowski et al., 2001).

I.2.3.3 Wirkungen der Cyclopentenone

Für die Prostaglandine PGA_2 , PGJ_2 , $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ und 15d-PGJ_2 kennt man bislang noch keinen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Stattdessen vermitteln diese Prostaglandine ihre Wirkung über andere, Cyclopentenon-spezifische Mechanismen. Zu den Cyclopentenonen gehören die Prostanoiden mit A- J- und deoxy-J-Ringsystem sowie der pflanzliche Signalstoff 12-Oxophytodiensäure (siehe Kap. 1.3.1). Cyclopentenone werden aktiv in die Zellen transportiert, im Cytosol an Proteine gebunden und aktiv in den Zellkern transportiert (Fukushima, 1992; Ohno und Hirata, 1993; Negishi et al., 1995). Dort interagieren sie mit spezifischen zellulären Targets wie Signalmolekülen, Schlüsselregulatorproteinen und Transkriptionsfaktoren.

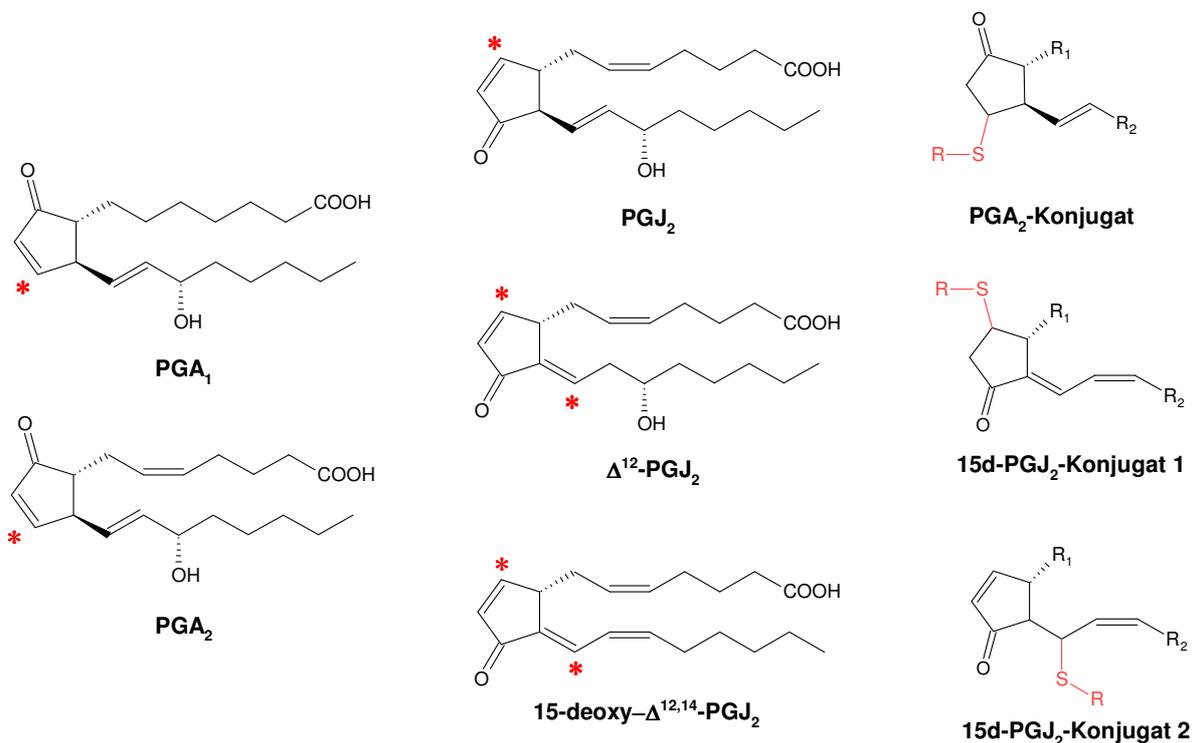


Abb. 8: Cyclopentenon-Prostaglandine mit elektrophilem Kohlenstoffatom (*). Rechts sind die Strukturen von drei möglichen Konjugaten dargestellt.

Cyclopentenone besitzen als besonderes Strukturmerkmal eine chemisch reaktive α,β -ungesättigten Carbonylverbindung. Diese elektrophile Gruppe befähigt das Molekül zur kovalenten Bindung an SH-Gruppen von Proteinen über eine Michael-Addition (Abb. 8). Dabei wird nicht nur unspezifisch das Proteasom alkyliert, sondern es werden auch Enzyme und Transkriptionsfaktoren modifiziert. Die Bindung von PGA_1 oder PGA_2 an Proteine ist reversibel, die Bindung von $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ dagegen irreversibel. Das liegt daran, dass $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ und 15d-PGJ_2 im Gegensatz zu PGA_1 oder PGA_2 , welche nur eine Thiolgruppe kovalent binden können, ein weiteres reaktives elektrophiles Kohlenstoffatom in der Seitenkette besitzen und so ein stabiles Biskonjugat mit zwei Thiolgruppen bilden können. Allerdings wird der elektrophile Kohlenstoff im Ring bevorzugt für die Konjugation verwendet (Straus und Glass, 2001). Diese Bindungseigenschaft spiegelt sich auch in ihrer Wirkung wieder: Der von PGA_2

induzierte Stop des Zellwachstums ist reversibel, wohingegen der von Δ -¹²-PGJ₂ induzierte irreversibel ist (Negishi et al., 1995).

Im unteren mikromolekularen Konzentrationsbereich können Cyclopentenone das Zellwachstum inhibieren, die Zelldifferenzierung fördern und die Synthese einer Reihe von stressbedingten Genen und Zellzyklusregulatoren induzieren. Dazu gehören beispielsweise Hitzeschockproteine (HSPs), γ -Glutamylcysteinsynthase, ein Enzym zur Synthese von intrazellulärem Glutathion (GSH) und damit von zentraler Bedeutung für die Entgiftung der Zelle, oder Hämoxidase, welche den Abbau von toxischem Häm katalysiert (Negishi et al., 1995). Auch die Aktivierung einer stress-aktivierten MAP-Kinase, der c-Jun N-terminalen Protein-Kinase (JNK), ist bekannt. Ferner sind Cyclopentenone gegen eine ganze Reihe von DNA- und RNA-Viren wirksam und können deren Replikation verhindern (Santoro et al., 1980; Santoro et al., 1989; Parker et al., 1995; Straus und Glass, 2001).

Im Hinblick auf das Zellwachstum wurden für Cyclopentenone in verschiedenen Zelltypen konzentrationsabhängige Effekte beobachtet: Niedrige Dosen (1 μ M PGJ₂; 3 μ M 15d-PGJ₂) führten zu einer verstärkten Zellproliferation und größere Mengen (3 μ M PGJ₂; 10 μ M 15d-PGJ₂; 25 μ M PGA₂) verursachten einen Stillstand des Zellzyklus. Noch höhere Konzentrationen (30 μ M PGJ₂ oder 15d-PGJ₂; 50 μ M PGA₁) induzierten schließlich Apoptose (Parker, 1995; Clay et al., 1999; Levonen et al., 2001; Emi und Maeyama, 2004; Erl et al., 2004). Wachstumsinhibierung und Apoptose sind auch über Induktion von PPAR γ möglich, verlangen aber die 10-fache Konzentration des Liganden (Clay et al., 1999; Keelan et al., 1999). Dennoch scheint der PPAR γ an der Induktion von Apoptose durch 15d-PGJ₂ zumindest in manchen Zelltypen beteiligt zu sein (Bishop-Bailey und Hla, 1999).

Cyclopentenone üben potente anti-inflammatorische Wirkungen aus, indem sie die Expression einer Anzahl entzündungsrelevanter Gene in Makrophagen oder Chondrozyten hemmen, wie beispielsweise der Gene für die Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Tumor-Necrose-Faktor α (TNF α), Gelatinase B oder COX-2. Ein Teil dieser Effekte wird über die Ligation des PPAR γ (s. Kap. 1.2.9) vermittelt. Über diesen Mechanismus kann auch die über die Transkriptionsfaktoren κ B und AP-1 induzierte Genexpression inhibiert werden (Boyault et al., 2001; Hinz et al., 2003). Diese besitzen eine Schlüsselrolle beim transkriptionalen Anschalten vieler Gene, die während der Immunantwort aktiviert werden (z.B. iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF α , Adhäsionsmoleküle, Metalloproteinasen).

Die Repression der NF- κ B-induzierten Genexpression kann aber auch unabhängig von PPAR γ erfolgen, indem Cyclopentenone direkt kritische Cysteinreste einer beteiligten Kinase sowie der DNA-Bindungsdomäne von NF- κ B alkylieren (Abb. 9): In ruhenden Zellen liegt NF- κ B im Cytoplasma assoziiert mit dem inhibitorischen Protein I κ B vor. Als Reaktion der Zelle auf das Signal inflammatorischer Cytokine wird die I κ B-Kinase (IKK) aktiviert, welche I κ B an zwei Serinresten phosphoryliert. Daraufhin wird I κ B ubiquitinyliert und durch Proteasen degradiert, wodurch NF- κ B freigesetzt wird. Danach kann NF- κ B in den Zellkern migrieren und dort die Expression proinflammatorischer Gene induzieren. Cyclopentenone z.B. 15d-PGJ₂ können in stimulierten Zellen die Aktivierung von Genen über NF- κ B mit zwei verschiedenen Mechanismen hemmen. In gewissen Zellen wie Makrophagen und leukämischen Jurkat-T-Zellen können 1 μ M 15d-PGJ₂ die Aktivierung von IKK als Reaktion auf LPS oder Cytokine verhindern. Dies erfolgt, indem 15d-PGJ₂ IKK an spezifischen Cysteinresten kovalent modifizieren und damit ihre Funktion außer Kraft setzen. Weiterhin verhindern sie die Migration von NF- κ B in den Zellkern. In anderen Zellen wie HeLa-S-Zellen können 15d-

PGJ₂ die Bindung von NF-κB an seine Zielsequenzen der DNA verhindern, indem sie Cystein-Reste innerhalb der DNA-Bindungsdomäne alkylieren. Die Inhibierung der Degradierung von NF-κB sowie des Eintretens von IκB in den Zellkern findet in diesen Zellen allerdings nicht statt (Straus et al., 2000; Cernuda-Morollón et al., 2001; Straus und Glass, 2001). Beide Mechanismen können separat oder kombiniert ablaufen, wobei die relative Bedeutung des einen oder anderen Mechanismus zwischen verschiedenen Zelltypen variiert.

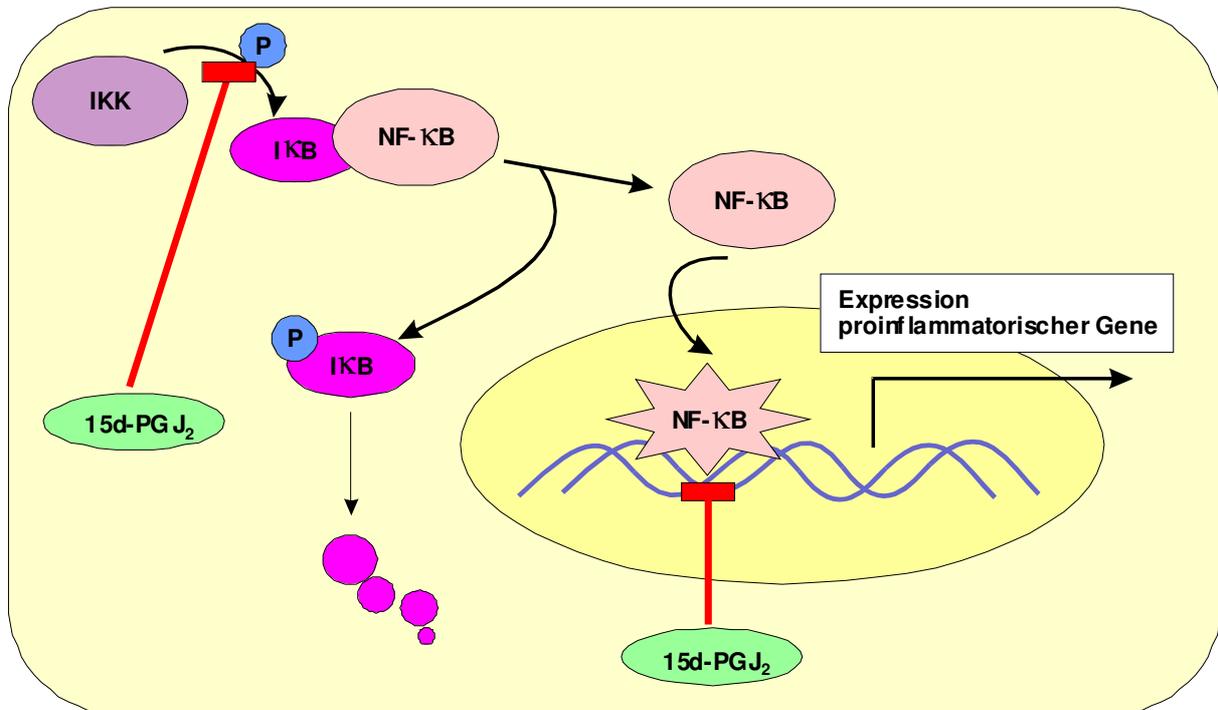


Abb. 9: Hemmung der NF-κB-induzierten Genexpression durch Cyclopentenone. Als Cyclopentenon wurde hier beispielhaft 15d-PGJ₂ dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

1.2.4 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Neben ihren spezifischen Rezeptoren können Prostaglandine und Isoprostane ähnlich wie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren auch die Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) im Zellkern ligieren. Als Transkriptionsfaktoren regulieren die PPAR die Aktivität zahlreicher Gene. Von den PPAR-Rezeptoren sind 3 Subtypen mit unterschiedlicher Gewebsexpression und biologischer Aktivität bekannt. Der PPAR α wurde 1990 von Issemann und Green entdeckt, als sie den Rezeptor suchten, der im Nagetier die Proliferation von Peroxisomen induziert (Issemann und Green, 1990). Die Subtypen γ und δ wurden erst später identifiziert. PPAR α (NR1C1) wird vor allem in Leber, Herz; Muskel und Niere exprimiert und ist für den Fettsäurekatabolismus zuständig. PPAR δ/β (NR1C2) wird ubiquitär exprimiert und besitzt funktionelle Bedeutung in der Differenzierung von Keratinozyten, Wundheilung, Lipidakkumulation von Makrophagen sowie Lipidmetabolismus des Gehirns (Bishop-Bailey

und Wray, 2003). PPAR γ (NR1C3) wird in Adipozyten, Makrophagen, Lunge sowie im Fettgewebe exprimiert und regelt die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen, Fettspeicherung sowie die Glucose-Homeostase.

PPAR gehören zur Superfamilie der Kernrezeptoren, zu der auch die Steroid-, Thyroid- und Retinoid- und die Vitamin A-Rezeptoren gehören (Evans, 1988). Diese Rezeptoren sind strukturell durch ein zentrales Typ II Zinkfinger-DNA-Bindungsmotiv gekennzeichnet, welches an Hormon-responsive Elemente (HREs) des Promotors der Zielgene binden kann. Im Ruhezustand ist PPAR an eine Reihe von Corepressor-Proteinen gebunden, welche die Transkription verhindern. Durch Ligandenbindung wird der Rezeptor aktiviert und der Corepressor kann abdissoziieren. PPAR kann dann zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein Heterodimer bilden (Abb. 10). Dieser Komplex kann dann an die DNA binden und dort die Transkription bestimmter Gene induzieren (Kliwer et al., 1992; Bull, 2003).

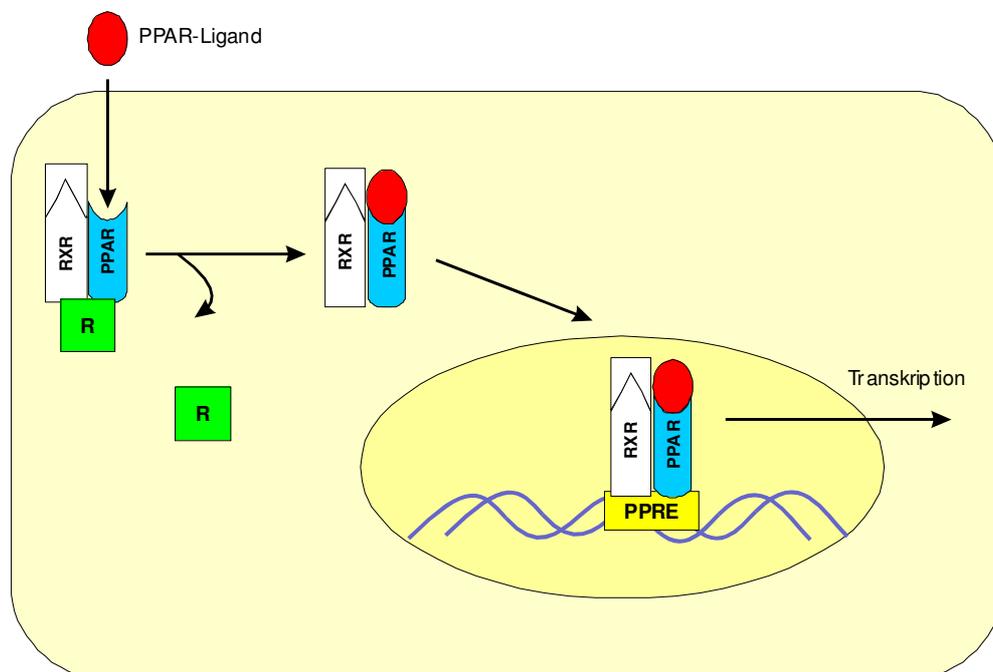


Abb. 10: Ligand-aktivierte Transkription durch PPAR. RXR = Retinoid-Rezeptor; PPAR =m Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor; R = Repressor; PPRE = Peroxisomen Proliferator responsives Element.

Als weiteres Strukturelement besitzen Kernrezeptoren eine hydrophobe Ligandenbindungstasche, mit der sie Hormone mit hoher Affinität und Spezifität binden können (Lee et al., 2003). Die natürlichen Liganden der PPAR (Tab. 2) sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C14 bis C20 sowie Eikosanoide (z.B. 8(S)-HETE, LTB₄; aber auch PGH₂, dPGJ₂, PGA₂ und PGI₂ sowie einige Isomere der Isoprostane E₂ und F₂). Dabei liegt der IC₅₀ für die Ligandenbindung der PPAR mit 1-10 μ M relativ hoch (Forman et al., 1995; Dusault et al., 2000, Ferry et al., 2001; Bishop-Bailey und Wray, 2003; McNamara et al., 1999; McNamara et al., 2002). Momentan sind als Liganden mit höherer Affinität nur synthetische Verbindungen bekannt, deren K_i-Werte im Bereich von 10-100 nM liegen. Interessanterweise sind unter den synthetischen Liganden bedeutende Arzneimittel wie die lipidsenkenden Fibrate und die antidiabetisch wirkenden Thiazolidindione. Aufgrund des Fehlens von natürlichen

hochaffinen Liganden werden die PPAR eher als Lipidsensoren, die eine ganze Reihe von Fettsäuren und ihre Metabolite erkennen, anstatt als Rezeptoren für ein einziges Hormon betrachtet (McNamara et al., 2002).

Tabelle 2: Natürliche und synthetische Liganden der drei PPAR-Rezeptor-Isoformen.

	natürlicher Ligand	Arzneistoff
PPARα	SFA: 14:0; 16:0; 18:0 PUFA: 16:1 bis 20:5 konjugierte Linolensäure 8(S)-HETE LTB ₄ 15d-PGJ ₂ ; PGI ₂ ; PGA ₁ , PGA ₂ iPE ₂ -III; 8,12-iso-iPF _{2α} -III; iPF _{2α} -V; 8,12-iso-iPF _{2α} -V; 8,12-iso-iPF _{2α} -VI	Fibrate (Lipidsenker) Wy-14,643 ETYA
PPARδ/β	SFA: 16:0; 18:0 PUFA: 16:1 bis 20:5 15d-PGJ ₂ ; PGI ₂ ; PGA ₁ , PGA ₂	Fibrate (GW50516; GW2433) Carbaprostacyclin
PPARγ	PUFA: 16:1 bis 20:5 9-HODE; 13-HODE 15d-PGJ ₂ ; PGH ₁ ; PGH ₂ ; PGG ₂ iPE ₂ -III; iPF _{2α} -III; iPF _{2α} -V	Thiazolidindione (Antidiabetika) LY171883 (LTD ₄ -Rezeptor Antagonist)

Die PPAR regeln vor allem den Lipidmetabolismus. Daneben sind für alle 3 Subtypen viele Beispiele für entzündungshemmende, antithrombotische und antiarteriosklerotische Effekte bekannt (Vergès, 2003; Cuzzocrea et al., 2004; Marx et al., 2004; Israelian-Konarakı und Reaven, 2005). PPAR α -Agonisten üben negative Kontrolle auf die Entzündungsmediatoren NF κ B und AP-1 aus und senken in Patienten mit Hyperlipidämie die inflammatorischen Proteine C-reaktives-Protein, TNF α und Interferon- γ . Weiterhin können sie Thrombose verhindern, indem sie die Expression des Plättchen-aktivierenden Faktors und des Gewebefaktors in Monozyten und Makrophagen inhibieren und die Plasmaspiegel an Fibrinogen senken (Vergès, 2003). In klinischen Studien zeigten die Fibrate auch antiarteriosklerotische Wirkungen (Marx et al., 2004; Israelian-Konarakı und Reaven, 2005). Aktivierung von PPAR β/δ kann in Endothelzellen eine Inhibierung der Translokation von NF- κ B in den Nukleus bewirken. Ferner können Liganden von PPAR β/δ in Endothelzellen die Produktion der vascularen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 sowie MCP-1 inhibieren und so die Bindung von Monocyten an diese Zellen verhindern (Rival et al., 2002). Ligation von PPAR γ wirkt positiv auf die Glucose-Homeostase und den Lipidmetabolismus ein (Vergès, 2004). Weiterhin zeigte sich auch hier entzündungshemmende Wirkung: Die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten sowie die Produktion der inflammatorischen Cytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β kann inhibiert und die Expression der Gene für die proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1, STAT und NF- κ B gehemmt werden. In diesem Zusammenhang können sie auch der Entstehung von Arteriosklerose entgegenwirken (Marx et al., 2004). Ferner kann Ligation von PPAR γ das Wachstum von Tumorzellen unterdrücken und die Angiogenese bremsen (Ferry et al., 2001, Bishop-Bailey und Wray, 2003; Zingarelli et al., 2003).

I.2.5 Metabolismus von Prostaglandinen und Isoprostanen

Prostaglandine und Isoprostane sind also potente Signalstoffe in Säugetieren, die je nach Zelltyp und Rezeptorinteraktion unterschiedliche Wirkungen vermitteln können. Dabei ist auch das Andauern der Wirkung interessant, welches durch den Abbau der Mediatoren begrenzt wird.

I.2.5.1 Enzymatische Abbauwege für Prostaglandine und Isoprostane

Endogen gebildete Mediatoren wie Prostaglandine können ihre Wirkung typischerweise nur lokal begrenzt am Ort ihrer Bildung entfalten. Das liegt daran, dass sie von den Zellen sehr schnell wieder abgebaut werden. Im Blutplasma verschiedener Arten findet sich nur wenig oder keine Aktivität von Prostaglandin abbauenden Enzymen. In der Zelle hingegen gibt es Prostaglandin-Dehydrogenasen, die viele verschiedene Prostanoid oxidieren können. Deshalb kann eine Metabolisierung erst nach einer Transporter-abhängigen Aufnahme der Prostaglandine in die Zellen von Geweben stattfinden (Schuster, 1998).

So beträgt die biologische Halbwertszeit der Prostaglandine im Blutkreislauf lediglich ein paar Minuten, da sie in der Lunge, Leber, Nierenrinde und anderen Geweben sehr schnell metabolisiert werden (Hamberg und Samuelsson, 1971). Die Prostaglandine E und F werden hauptsächlich von der Lunge aufgenommen und dort metabolisiert. Für PGE beträgt die Entnahme aus dem Blutplasma durch die Lunge ~ 68 % und die Entnahme durch die Extremitäten nur ~ 7%. Dagegen werden PGA nur zu ~ 8 % von der Lunge entnommen, dafür aber ~ 56 % vom Eingeweide-Kreislauf, ~ 50 % von der Niere und ~ 34 % durch die Extremitäten. Auch PGB wird über die Lunge kaum degradiert (Robertson, 1975). Goleb und Mitarbeiter zeigten in einem Experiment mit infundierten PGA und PGE, dass Prostaglandine, die in die Vene gelangen, auch das Potential, über den systemischen Kreislauf entfernte Organe zu erreichen und dort Wirkung zu entfalten. Obwohl die Aufnahme durch verschiedene Organe beachtlich war, war sie nicht komplett und von der infundierten Substanz war auf jeden Fall eine nennenswerte Menge im peripheren Kreislauf enthalten (Goleb et al., 1975).

Der Hauptweg der Metabolisierung beinhaltet zuerst die Oxidation der allylischen Hydroxylgruppe am C15 zum Keton durch das im Säugetiergewebe weit verbreitete Enzym Prostaglandin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.141). Anschließend erfolgt eine Reduktion der Doppelbindung am C13 mittels einer Reduktase. Danach finden β - und ω -Oxidationen statt. Prostaglandin-Isomere wie die Isoprostane werden meist langsamer durch die 15-Dehydrogenasen umgesetzt. 15-epi-PGE₁ ist sogar ein effektiver Inhibitor der Aktivität der 15-Dehydrogenase (Russell et al., 1975). So beträgt die Halbwertszeit für die Clearance von iPF_{2 α} -III im Plasma der Ratte immerhin ~ 16 min (Morrow und Roberts, 1997). Bei der Metabolisierung von Isoprostanen tritt auch oft eine Reduktion von Doppelbindungen ein, was für den Metabolismus von Prostaglandinen weniger bekannt ist (Chiabrando et al., 2002).

I.2.5.2 Bildung polarer Konjugate

Neben der oben beschriebenen Dehydrierung werden Cyclopentenone wie Prostaglandin bzw. Isoprostan A oder J in vivo sehr schnell an Glutathion konjugiert. Die Konjugation von PGA_2 oder PGJ_2 kann im Menschen von der Glutathion-S-Transferase A1, A2-2, M1a-1a und P1-1 katalysiert werden (Bogaards et al., 1997).

Dabei kann $\text{iPA}_2\text{-III}$ ebenso schnell und in gleichem Ausmaß wie PGA_2 eine Konjugation mit Glutathion bzw. Albumin eingehen. In Gegenwart von Glutathion-S-Transferasen und GSH kann $\text{iPA}_2\text{-III}$ innerhalb von 8 min komplett in das GSH-Konjugat überführt werden. In Abwesenheit des Enzyms erfolgt diese Reaktion wesentlich langsamer. Für $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ wurde eine schnelle enzymatische Konjugatbildung schon früher gezeigt. Die Bildung kovalenter Addukte mit Albumin verläuft wieder für beide Prostanoiden gleich, hier nur langsamer und weniger intensiv. Bei einer Albuminkonzentration von 20 mg/ml und einem Prostanoid zu Albumin im Verhältnis von 1:20 haben sich nach 30 min 30 % Addukt gebildet und nach 120 min 50 % (Chen et al., 1999). Allerdings wurde gezeigt, dass die Cyclopentenone durch die Kopplung an GSH ihre spezifische Aktivität (Inhibierung von Zellwachstum und Proliferation, Induktion von Apoptose) verlieren (Atsmon et al., 1990). Gebildete GSH-Konjugate werden über die Multidrug-Resistenz-Proteine MRP1 und MRP2 aus der Zelle gepumpt (Evers et al., 1997; Straus und Glass, 2001), gelangen in den systemischen Blutkreislauf und werden von dort aus direkt oder nach weiterer Metabolisierung über die Nieren ausgeschieden.

I.2.5.3 Nichtenzymatische Dehydratisierung von PGD und PGE

Unter verschiedenen Bedingungen können PGD und PGE im wässrigen Medium nichtenzymatisch dehydratisiert werden. Bei 25°C wird diese Dehydratisierung durch Säuren und Basen katalysiert. Vor allem PGD_2 ist eine ziemlich instabile Verbindung: Bereits unter milden basischen Bedingungen (Anwesenheit eines tertiären Amins) gehen 10-20 % von PGD_2 in $\Delta^{12}\text{-PGD}_2$ über. In stärker alkalischem Medium kann PGD_2 relativ leicht zu PGJ_2 dehydratisiert werden. Ebenso kann im sauren Medium eine direkte Dehydratisierung zu 15-deoxy- PGJ_2 stattfinden. Im Gegensatz zu PGD_2 ist PGE_2 aber relativ stabil. PGE_2 kann im wässrigen Medium zu PGA_2 dehydratisiert werden und sich dann über Keto-Enol-Tautomerie weiter zu PGB_2 umlagern (Stehle, 1982). Bei sehr niedrigem pH (~ 1-2) kann die Hydroxylgruppe am C-11 direkt protoniert werden und so eine gute Abgangsgruppe bilden. In Puffer (pH 4-8) ist PGA_1 stabil (Polet und Levine, 1975) und es erfolgt keine Isomerisierung zu PGB . In ausreichend alkalischem Medium kann das Proton am C-10 abstrahiert werden und bei Konzentrationen von 0,5M KOH (pH 10,3) bildet sich PGB_2 innerhalb von Sekunden.

Ferner kann im Plasma vorhandenes Albumin die Dehydratisierung von PGD_2 und PGE_2 katalysieren, indem es an der Ligand-Bindungsstelle eine basische Mikroumgebung schafft (Fitzpatrick und Wynalda, 1983; Fitzpatrick et al., 1984). Bei 37°C in Gegenwart von 10 mg/ml Albumin sind nach 30h 90 % von PGD_2 metabolisiert und die Halbwertszeit für die Dehydratisierung von 15-keto- PGE_2 beträgt unter diesen Bedingungen 5,3h. (Negishi et al., 1995). Die physiologische Konzentration von Albumin im Blutplasma beträgt 0,6 mM (ca. 40 mg/ml), daneben kommt Albumin auch in Geweben und Sekreten vor (Curry et al., 1999). Ein Molekül Albumin besitzt mehrere Bindungsstellen für Lipide, bindet aber unter normalen physiologischen Bedingungen nur 0,1-2 Moleküle Fettsäuren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Blut zirkulierende Prostaglandine und Isoprostane relativ rasch in die Zellen aufgenommen werden nach ihrem Eintritt in die Zelle ziemlich schnell metabolisiert werden, was einer Inaktivierung gleich kommt. Cyclopentenone werden umgehend durch Kopplung an Glutathion oder Albumin inaktiviert und dann weiter abgebaut. Weiterhin kann im Organismus durch veränderte pH-Werte oder Albumin eine Dehydratisierung von PGD oder PGE erfolgen, wobei reaktive Cyclopentenone wie PGJ, dPGJ, PGA oder PGB entstehen.

I.3 Oxylipine in Pflanzen

I.3.1 Enzymatisch gebildete Oxylipine: Jasmonate

I.3.1.1 Biosynthese von Jasmonaten

Auch in Pflanzen dienen Oxylipine als Signalstoffe. Ebenso wie die Prostaglandine in Säugtieren (siehe Kapitel 1.2.4) nehmen die Jasmonate eine Schlüsselrolle in Entwicklung, Wachstum und Reproduktion der Pflanze ein. Weiterhin sind sie für die Abwehr der Pflanze gegen Pilze, Bakterien und Herbivoren von Bedeutung (Mueller, 1998). Da höhere Pflanzen keine mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren bilden können, bleibt das Vorkommen von Prostaglandinen auf das Tierreich beschränkt. Bei vielen Pflanzen, wie beispielsweise den Blättern der Tomatenpflanze, sind Linolsäure (C₁₈:2 ω₆) und Linolensäure (C₁₈:3 ω₆) die dominierenden Fettsäuren in Membranen (Conconi et al., 1996). Höhere Pflanzen können aus α-Linolensäure eine Gruppe ähnlicher Cyclopentanonsäuren, die Jasmonate, bilden. Zu dieser Gruppe gehören 12-Oxophytodiensäure (OPDA), Jasmonsäure sowie ihre jeweils 2 Methylengruppen kürzeren Zwischenstufen (10,11-Dihydro-OPDA und Oxo-Pentenyl-Cyclopentancarbonsäuren 4:0, 6:0 oder 8:0) aus der Jasmonatbiosynthese (Mueller, 1998). Analog zu den Prostaglandinen muss die für die Bildung der Jasmonate benötigte Linolensäure erst mit einer Lipase (z.B. Phospholipase A) aus den Glycolipiden der Chloroplastenmembran freigesetzt werden, bevor sie von Lipoxygenasen oxidiert werden kann (Abb. 11). Die Freisetzung der Linolensäure ist der limitierende Faktor in der Jasmonatproduktion; alle anderen Enzyme sind konstitutiv in der Pflanzenzelle vorhanden (Farmer und Ryan, 1992). Die gebildete 13-Hydroperoxylinolensäure wird anschließend von der Allenoxidsynthase in ein instabiles α,β-ungesättigtes Epoxid (Allenoxid) umgewandelt. Daraufhin wird mittels Allenoxid-Cyclase ein Ringschluss geformt und es entsteht 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA). Aus der OPDA kann Jasmonsäure gebildet werden, indem zunächst eine enzymatische Reduktion erfolgt und anschließend dreimal eine β-Oxidation (Beale und Ward, 1998). Die Synthese von OPDA erfolgt im Chloroplasten. Die Reduktion von OPDA und die β-Oxidation findet dagegen in den Peroxisomen statt (Schaller, 2001; Strassner et al., 2002). Allerdings liegen mehr als 90 % der OPDA in *Arabidopsis*-Blättern verestert als sn1-O-(12-

Oxophytodienoyl)-sn2-O-(Hexadecatrienoyl)-Monoglactosyldiglycerid in der Chloroplastenmembran vor (Stelmach et al., 2001). Von dort kann es nach Verwundung vermutlich sehr schnell mittels einer sn1-spezifischen Lipase herausgelöst werden.

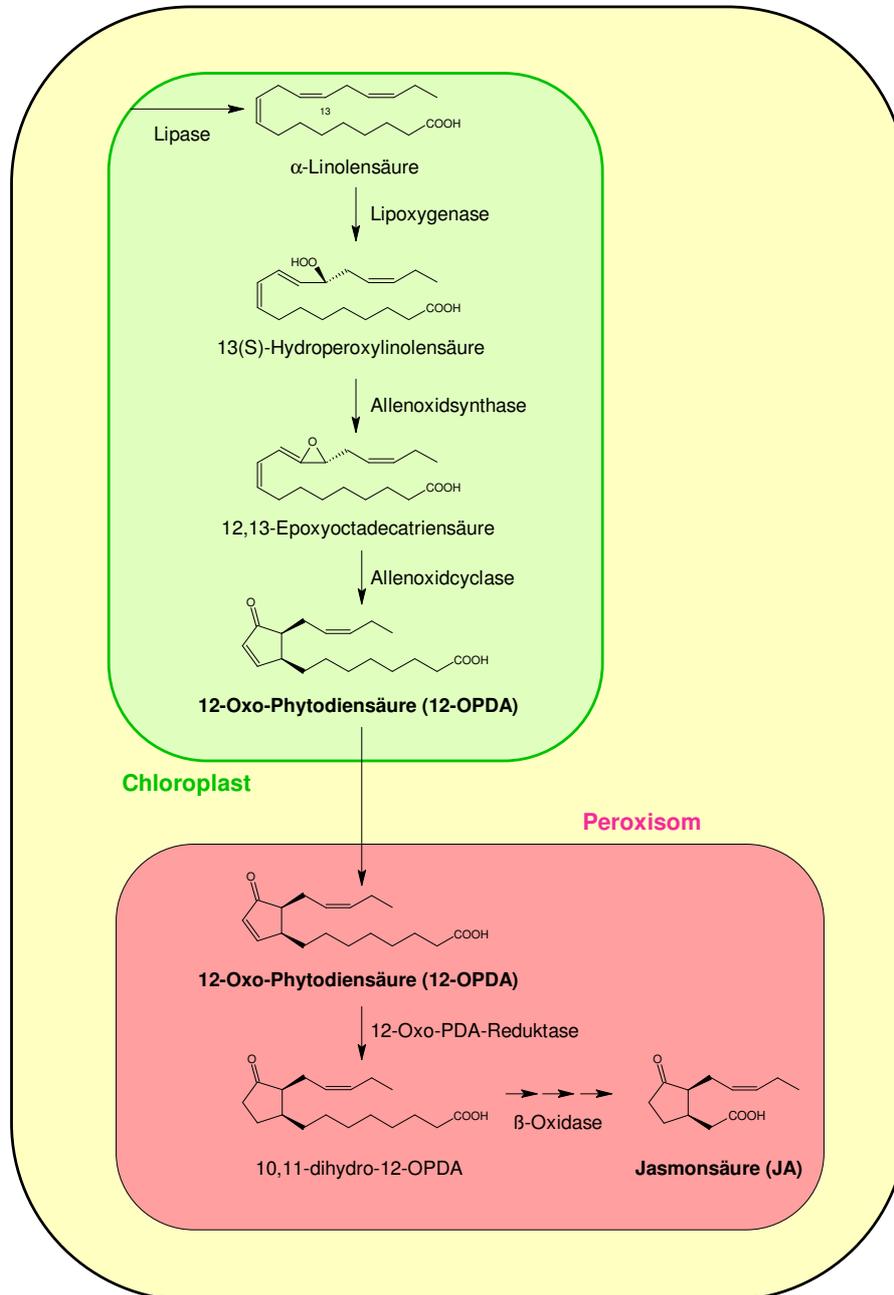


Abb. 11: Biosynthese der Jasmonate.

Jasmonate kommen in allen Pflanzengeweben vor. Ihre höchsten Konzentrationen haben sie in wachsenden Geweben wie im Sprossspitze, Wurzelspitzen, jungen Blättern und sich ent-

wickelnden Früchten (Wasternack und Parthier, 1997). Unbehandelte Pflanzen enthalten 5-250 pmol JA/g Frischgewicht. Durch Verwundung oder Elicitierung können die lokalen Konzentrationen bis auf einige nmol JA/g ansteigen (Beale und Ward, 1998).

In Tomatenblättern beispielsweise beträgt der basale Gehalt ~100 pmol JA / g Trockengewicht und ~ 630 pmol OPDA /g Trockengewicht (Parchmann et al., 1997). Hier steigen die Spiegel der Jasmonate nach Verwundung stark an: In verwundeten Tomatenblättern erreicht die Zunahme von OPDA nach 30-50 min mit einem Anstieg auf das 11-fache sein Maximum, wohingegen JA erst nach 60 min auf den Maximalwert, welcher das 177-fache des Wertes im Grundzustand beträgt, angestiegen ist. Versuche mit Zellkulturen zeigten, dass sich Jasmonate auch mit einem Elicitor aus autoklavierten Hefezellwänden sehr gut induzieren lassen, allerdings ist hier die Induktion von Jasmonsäure meistens nicht nur deutlich schwächer als die von OPDA, sondern erfolgt auch deutlich später (Parchmann et al., 1997). Durch Infektion von Tomaten mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* steigt die Konzentration der Jasmonsäure innerhalb von 48h auf das 3- bis 4-fache an (Thoma et al., 2003). Neben diesen biotischen Stressfaktoren lässt sich die Synthese der Jasmonsäure auch durch abiotische Stresssituationen wie Austrocknung, Salz oder Feuchtigkeit induzieren (Wasternack und Parthier, 1997), allerdings nicht durch Schwermetalle, Licht, Kälte und Hitze (Blechert et al., 1995).

I.3.1.2 Wirkungsspektrum von Jasmonaten

Jasmonate fungieren als endogene Regulatoren von pflanzlichen Reaktionen und vermitteln ihre Wirkung durch Induktion der Transkription von Zielgenen. Die Transduktion des JA-Signals erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor. Allerdings wurde bislang noch kein Rezeptor gefunden (Turner et al., 2002).

Jasmonsäure reguliert eine Reihe wichtiger physiologischer Prozesse wie Wachstumsvorgänge, Synthese von vegetativen Speicherproteinen, Pollenreifung, Fruchtreife sowie Seneszenz und Degradation von Chlorophyll (Farmer und Ryan, 1992b). Bei Verwundung oder einem Befall von Pflanzen mit Herbivoren oder Pathogenen können JA und OPDA de novo gebildet werden und die Synthese von Proteinase-Inhibitoren (Farmer und Ryan, 1992a) und Phytoalexinen (Blechert et al., 1995) induzieren. Darüber hinaus wird die Transkription einer Reihe weiter Abwehrgene gesteigert (Doares et al., 1995). Dabei unterscheidet man Gene, die entweder nur von OPDA oder JA, oder von beiden Substanzen induziert werden können. So kann in *Arabidopsis* OPDA die Abwehrfunktionen von JA nahezu voll ersetzen, allerdings nicht deren vegetative Funktionen wie beispielsweise die Pollenreifung (Turner et al., 2002). Dies zeigt, dass es zumindest in *Arabidopsis* wenigstens zwei Signaltransduktionswege gibt. Die Induktion von Jasmonat-responsiven Genen verläuft über die wichtige Signalkomponente COI-1, welche ein F-Box-Protein ist. Im Gegensatz dazu verläuft die Induktion von OPDA-responsiven Genen COI-unabhängig (Taki et al., 2005). Daneben unterscheidet man noch eine Elektrophil-induzierte Genexpression, an welcher OPDA als Cyclopentenon ebenfalls beteiligt ist (Stintzi et al., 2001). Zur Klassifizierung verwendet man Mutanten: Die *Arabidopsis*-Mutante *aos* kann weder JA noch OPDA produzieren, wohingegen die *Arabidopsis*-Mutante *opr3* zwar OPDA, aber keine JA synthetisieren kann. Ferner existiert noch die *Arabidopsis*-Mutante *coi1*, in welcher das Protein COI1 fehlt (Turner et al., 2002).

I.3.1.3 Metabolismus der Jasmonsäure

Wie viele Signalstoffe hat Jasmonsäure nur eine kurze Halbwertszeit und wird in vivo schnell metabolisiert. Dabei kann JA zu hydroxylierten und glykosylierten Metaboliten Verbindungen metabolisiert werden. Weiterhin kann eine oxidative Decarboxylierung zum flüchtigen cis-Jasmon erfolgen (Beale und Ward, 1998).

I.3.2 Autoxidativ gebildete Oxylipine: Phytoprostane

I.3.2.1 Bildung von Phytoprostanen

In Pflanzen findet nicht nur eine enzymatisch kontrollierte Oxidation der Linolensäure statt, sondern auch ihre Autoxidation. Als mehrfach ungesättigte Fettsäure kann die Linolensäure analog zur Arachidonsäure in Tieren ebenfalls autoxidativ zu Isoprostanen umgewandelt werden. Allerdings sind diese pflanzlichen Isoprostane aufgrund der anderen Vorläufer-Fettsäure um zwei Methylengruppen kürzer als ihre tierischen Analoga und besitzen nur eine Doppelbindung, weshalb sie früher auch als Dinor-Isoprostane bezeichnet wurden (Mueller, 1998). Die autoxidative Entstehung der Phytoprostane beginnt mit der Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einer der beiden bisallylischen Methylengruppe der α -Linolensäure, in der Folge zu 2 verschiedenen Phytoprostan-Regioisomeren führt (Abb. 12). Danach folgt wie bei der Bildung der Isoprostane die Anlagerung von Sauerstoff, Cyclisierung zum Bicycloendoperoxid. Daraufhin findet nochmals Addition von Sauerstoff statt, wobei G₁-Phytoprostane entstehen. Schließlich passiert eine Reduktion zu H₁-Phytoprostanen. H₁-Phytoprostane (Abb. 13) sind instabil und können entweder zu D₁- und E₁-Phytoprostanen umgelagert werden oder durch zelluläre Reduktionsmittel wie Glutathion, Liponsäure oder Glutathion-Peroxidase zu F₁-Phytoprostanen reduziert werden (Parchmann und Mueller, 1998; Imbusch und Mueller, 2000a). D₁-Phytoprostane sind instabil und können schnell zu 13-deoxy-J₁-Phytoprostanen dehydratisiert werden (Krischke et al., 2003). E₁-Phytoprostane sind relativ stabil, können aber noch weiter zu A₁- oder B₁-Phytoprostanen dehydratisiert und isomerisiert werden (Thoma et al., 2003). F₁-Phytoprostane sind stabile Endprodukte der Lipidperoxidation.

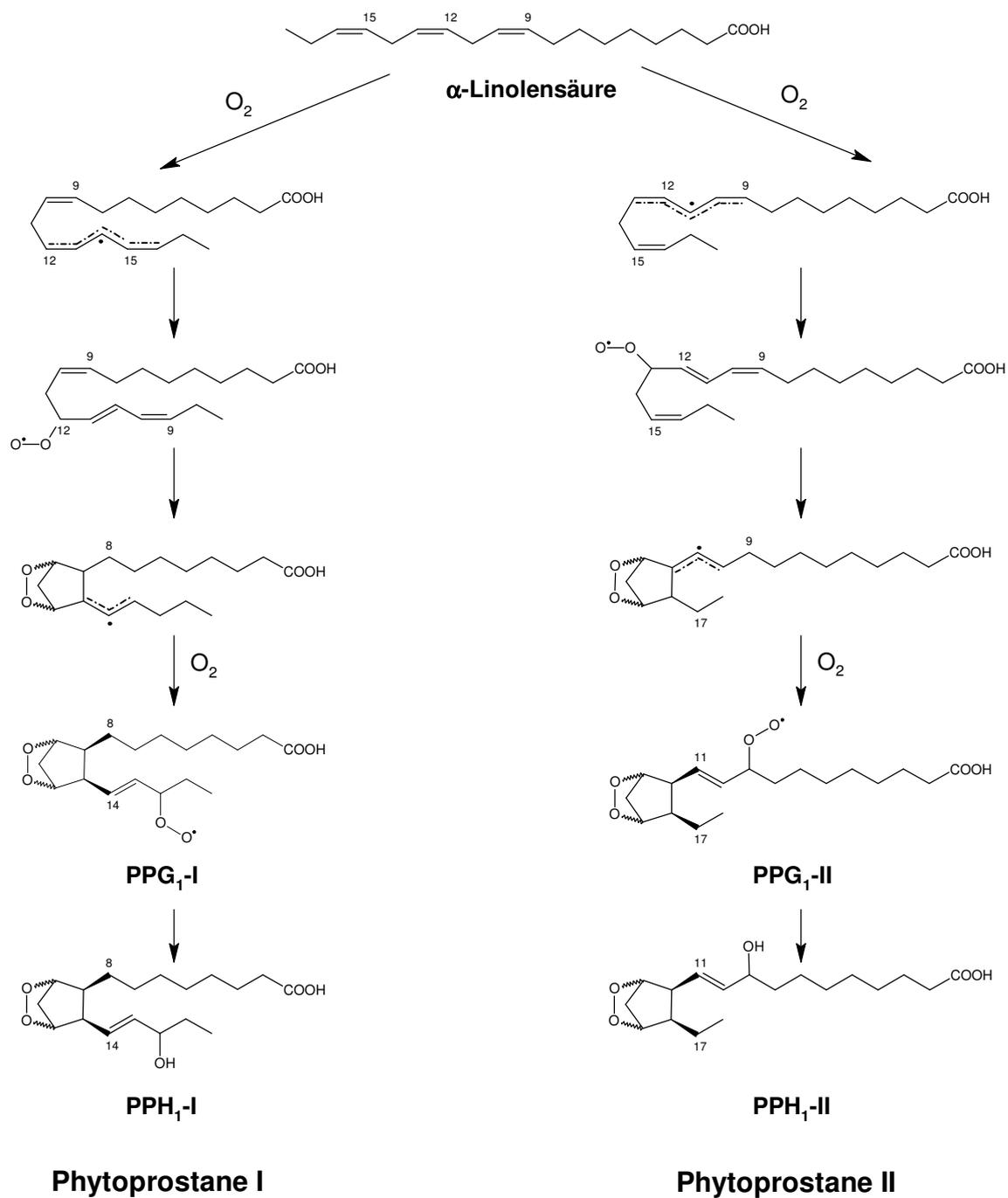


Abb. 12: Bildung der Phytostane (Endoperoxid-Mechanismus).

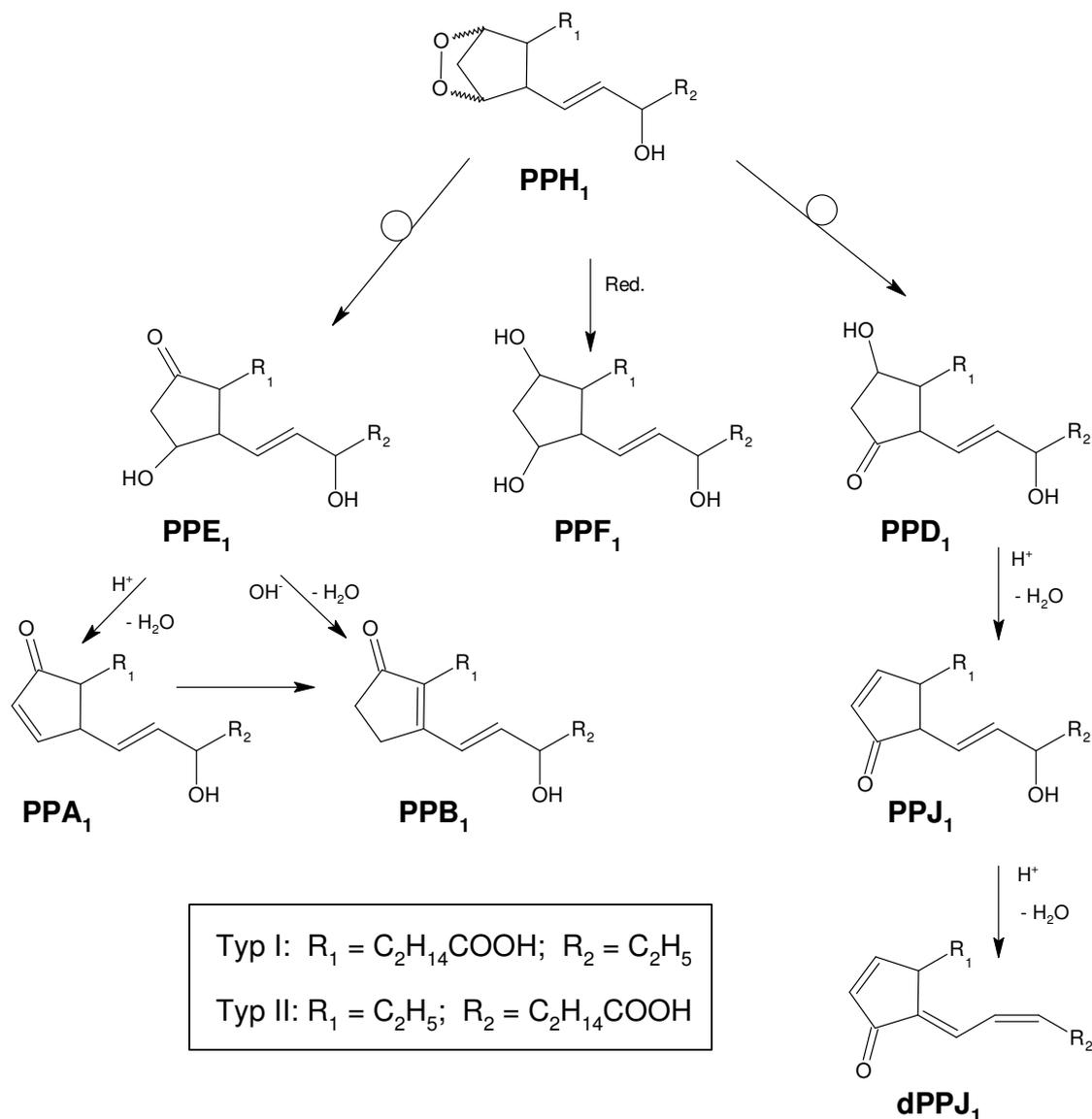


Abb. 13: Entstehung verschiedener Phytoprostanklassen aus PPH₁.

I.3.2.2 Nomenklatur der Phytoprostane

Die Nomenklatur der Phytoprostane lehnt sich an die Isoprostan-Nomenklatur (Abschnitt 1.2.4) an. Um Verwechslungen mit tierischen Dinor-Isoprostanen zu vermeiden, werden die pflanzlichen Dinor-Isoprostane als Phytoprostane bezeichnet und mit PP abgekürzt. Nach den Regeln von Rockach setzen sich die aus der α -Linolensäure hervorgegangenen Phytoprostane aus den Regioisomeren Typ I und II sowie die Phytoprostane aus γ -Linolensäure aus Typ III und Typ IV zusammen (Imbusch und Mueller, 2000a).

I.3.2.3 Vorkommen von Phytoprostanen

Freie A₁-, B₁-, D₁-, E₁-, F₁-, und deoxy-J₁-Phytoprostane konnten in taxonomisch verschiedensten Pflanzenspezies in Blättern, Blüten, Kraut und Wurzeln nachgewiesen werden (Parchmann und Mueller, 1999; Imbusch und Mueller, 2000a; Krischke et al., 2003; Thoma et al., 2003). Sie kommen anscheinend ubiquitär im Pflanzenreich vor.

Tab. 3: Konzentrationen von enzymatisch und autoxidativ gebildeten Linolensäuremetaboliten in Tomatenblättern (*Lycopersicon esculentum* cv Moneymaker).

Blätter von <i>Lycopersicon esculentum</i> cv Moneymaker		
Linolensäuremetaboliten [pmol/g TG]		
Jasmonate:		
12-OPDA	541 ± 130	
JA	95 ± 24	
Cyclopentan(on)-Phytoprostane:		
	Typ I	Typ II
PPD₁	1408 ± 399	2141 ± 494
PPE₁	107 ± 25	107 ± 37
PPF₁	229 ± 76	229 ± 76
Cyclopentan(on)-Phytoprostane:		
	Typ I	Typ II
PPA₁	11 ± 6	4 ± 6
PPB₁	4 ± 4	2 ± 5
dPPJ₁	958 ± 65	5451 ± 660

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. von Blättern 3 verschiedener Pflanzen (Thoma et al., 2004).

Dabei liegen mehr als 90 % der Phytoprostane im Gewebe verestert vor. Suspensionszellkulturen verschiedener Familien enthalten 1,5-187 pmol freie PPE₁ / g Trockengewicht (Parchmann und Mueller, 1999). Frische Pfefferminzblätter enthalten 133 pmol freie PPE₁ / g Trockengewicht und 399 nmol veresterte PPE₁ / g Trockengewicht. An F₁-Phytoprostanen besitzen frische Pflanzen 131-4.207 pmol freie PPF₁ / g Trockengewicht und 1.432-35.040 ng veresterte PPF₁ / g Trockengewicht (Imbusch und Mueller, 2000a). Auch die Dehydratisierungsprodukte von PPE₁ kommen in Pflanzen vor. Die Summe von PPA₁ und PPB₁ liegt im Bereich von 36-425 pmol freie PPA₁/PPB₁ / g Trockengewicht. Dabei beträgt das Verhältnis von PPA₁ zu PPB₁ in den zwei untersuchten Arten, - *Lycopersicon esculentum* (cv. Moneymaker) und *Nicotiana tabacum* (cv. Xanthi) - bei ~ 70:30 (Thoma et al., 2003). PPD₁ kommen frei in verschiedenen Pflanzen in Mengen von 2.577-19.123 pmol freie PPD₁ / g Trockengewicht vor und von dPPJ₁ findet man Mengen von 6.412-10.931 pmol freie dPPJ₁ / g Trockengewicht. Enzymatisch gebildetes OPDA befindet sich im Bereich von 171-1.401 ng OPDA / g

Trockengewicht (Krischke et al., 2003). Damit liegen in unbehandelten Pflanzen die Phytoprostane in der gleichen Größenordnung wie die Jasmonate vor (Krischke et al., 2003; Thoma et al., 2003; Thoma et al., 2004).

Ähnlich wie die Isoprostane steigen auch die Phytoprostane in Stresssituationen an. So lassen sie sich durch oxidativen Stress beispielsweise durch Gabe von Butylhydroperoxid oder Kupferacetat innerhalb einiger Stunden auf das 6- oder 10-fache steigern. Die Jasmonsäureproduktion hingegen wird durch Butylhydroperoxid nicht induziert (Imbusch und Mueller, 2000b; Thoma et al., 2003). In getrockneten Pflanzen findet man die 8-250-fache Menge der freien sowie die 4-16-fache Menge der veresterten PPF₁ (Imbusch und Mueller, 2000a). Interessant ist auch die Veränderung der Phytoprostankonzentrationen bei Verwundung und Pathogenbefall, denn auf beide Ereignisse hin reagiert die Pflanze mit einer massiven Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Dieses Ereignis wird als „oxidative burst“ bezeichnet (Cheong et al., 2002). Nach Verwundung steigen die freien und veresterten Phytoprostane rasch an und liegen bei ihrem Maximum nach ca. 1 h auf dem 4-fachen Wert (Imbusch und Mueller, 2000b). Auch bei Pathogenbefall steigen die Phytoprostangehalte an: In Tomatenblättern, die mit dem necrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* infiziert wurden, steigen innerhalb von 48h die Werte von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ ebenso wie die von Jasmonsäure auf das drei- bis vierfache (Thoma et al., 2003).

I.3.2.4 Biologische Aktivität von Phytoprostanen

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Phytoprostane zu den Jasmonaten und ihrer Induzierbarkeit bei Stresssituationen und Verwundung liegt die Vermutung nahe, dass Phytoprostane mehr als bloße Abfallprodukte sind. Tatsächlich konnte die Hypothese, dass Phytoprostane in Pflanzen biologische Aktivität vermitteln, anhand einiger Beispiele untermauert werden. Jasmonate und Phytoprostane steigen aufgrund biologischer Reize wie Verwundung oder Pathogenbefall an und führen dann zur Bildung von Phytoalexinen. Allerdings wird bei Betrachtung der Geninduktion durch beide Stoffklassen deutlich, dass sich hier die Wirkungsspektren von Phytoprostanen und Jasmonaten zwar überlappen, aber nicht decken. Dabei findet (in Tabakzellkulturen) durch PPA₁ und PPB₁ selbst bei Konzentrationen von 50µM keine Induktion der Jasmonatbiosynthese statt (Thoma et al., 2003).

So können die Phytoprostane PPE₁, PPA₁, PPB₁ Typ I und II sowie dPPJ₁ Typ I und II in Konzentrationen von 10µM in Tabakzellen die Produktion des Phytoalexins Scopoletin induzieren. Bemerkenswerterweise ist diese Reaktion in Ausmaß und zeitlichem Verlauf ähnlich zur Reaktion von Tabakzellen auf Jasmonsäure und OPDA (Thoma et al., 2003; Iqbal et al., 2005). Die Induktion von Phytoalexinen ist nicht auf Tabak beschränkt und findet sich auch bei *Eschscholzia californica* (Isobavachalcon-Alkaloide) und *Crotalaria cobaltiola* (Benzophenantridinalkaloide), wobei die Reaktion auf die Phytoprostane PPB₁, PPE₁ und PPF₁ wiederum mit der Reaktion auf JA konform verläuft. Auch in *Arabidopsis* können PPA₁, PPB₁ und dPPJ₁ ein Phytoalexin, das Camalexin, induzieren (Thoma et al., 2004; Loeffler et al., 2005).

Auf zellulärer Ebene besitzen PPA₁ I + II, PPB₁-II und dPPJ₁ I + II in Konzentrationen von 75µM die Fähigkeit, eine MAP-Kinase (MBP-Kinase = myelin basic protein kinase) zu induzieren. Weder PPB₁-I noch Methyljasmonat (MeJA) sind dazu in der Lage (Thoma et al., 2003; Iqbal et al., 2005).

Ferner wurde der Effekt von Phytoprostanen auf die Induktion zweier Gene untersucht, die für gewöhnlich in Stresssituationen hochreguliert werden: Extrazelluläre Invertase (Lin6), ein Gen aus dem Primärstoffwechsel, sowie Phenylalaninammonium-Lyase (PAL), ein Schlüsselenzym des Sekundärstoffwechsels. 75µM MeJA, PPB₁ Typ I oder II können die Konzentration an Lin6 mRNA erhöhen, wohingegen PPA₁ Lin6 nicht induzieren kann. PAL kann ebenfalls von MeJA und PPB₁/II induziert werden, wobei der durch die B₁-Phytoprostane verursachte Anstieg der mRNA früher auftritt und stärker ist als der durch MeJA vermittelte. PPA₁ hingegen kann dieses Gen nicht induzieren. Zusätzlich wurde noch Pin2, ein Markergen für MeJA getestet. Wie erwartet, wurde Pin2 zwar durch MeJA stark induziert, aber weder durch PPA₁ noch durch PPB₁ (Thoma et al., 2003). Schließlich wurde noch untersucht, ob Cyclopentenon-Phytoprostane die Glutathion-S-Transferase1 in Arabidopsis induzieren. Dieses Enzym dient der Inaktivierung von elektrophilen Verbindungen, indem es diese an Glutathion koppelt. Dabei wurde bereits gezeigt, dass GST 1 in Arabidopsis durch OPDA, aber nicht durch JA, induziert werden kann. Auch PPA₁, PPB₁ und dPPJ₁ vermögen diese drastisch zu induzieren (Thoma et al., 2003; Iqbal et al., 2005). Vor kurzem wurde die Aktivität der Phytoprostane B₁ in einem cDNA-Array untersucht (Loeffler et al., 2005). PPB₁-I und PPB₁-II induzieren in Arabidopsis mehr als 60 Gene, wobei die Reaktion auf PPB₁-I stärker als auf PPB₁-II ausfällt. Zu den induzierten Genen gehören Entgiftungsgene (Glutathion-S-Transferasen, Glycosyltransferasen, ABC-Transporter), Gene für den Sekundärmetabolismus (PAD3 für die Camalexinsynthese, Adenylsulfatreduktase) und andere.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Phytoprostane in Pflanzen ein beachtliches Spektrum an biologischen Aktivitäten aufweisen, welches ähnlich, aber nicht gleich dem Wirkungsprofil der Jasmonate ist. So gibt es einige Gene, die sowohl von Jasmonaten, als auch verschiedenen Phytoprostanen induziert werden. Dabei ähneln die Phytoprostane mehr der OPDA als der JA. Möglicherweise sind die elektrophilen Eigenschaften der OPDA und der Cyclopentenon-Phytoprostane für die Induktion einer Reihe von Genen verantwortlich. Für die Cyclopentenon-Phytoprostane PPA₁, PPB₁ und dPPJ₁ konnte gezeigt werden, dass diese ein ähnliches Set an Genen wie OPDA induzieren (persönliche Kooperation Prof. M.J. Mueller). Dazu gehören Gene für die Signaltransduktion (Kinasen, Calcium-abhängige Signalkomponenten und Calmoduline), Transkriptionsfaktoren, stressrelevante Proteine sowie mit dem Sekundärmetabolismus, Phytohormonsynthese oder Transportsystemen assoziierte Gene (Details siehe Taki et al., 2005). Allerdings gibt es auch viele JA-induzierte Gene die nicht durch Phytoprostane induziert werden.

I.3.2.5 Metabolisierung von Phytoprostanen in planta

Da Phytoprostane biologisch hochaktive Verbindungen sind und im Zellstoffwechsel kontinuierlich gebildet werden, müssen sie vermutlich von der Pflanze zügig metabolisiert werden, da sie sonst akkumulieren würden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass exogen zugegebene PPA₁ und PPB₁ schnell in die Pflanzenzellen aufgenommen und innerhalb weniger Stunden in noch unbekannte Metabolite umgewandelt werden. Die Halbwertszeit von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ beträgt dabei weniger als 30 min (Thoma et al., 2003; Loeffler et al., 2005).

1.4 Profil von Phytohormonen und anderen Metaboliten

Über die Phytoprostane weiß man bereits, dass sie Sekundärstoffe induzieren können. Um ihre Bedeutung genauer beurteilen zu können, muss man Phytoprostane im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen und Signalstoffen betrachten. An der Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren sind verschiedene Phytohormone in Form eines komplexen Signalnetzwerks beteiligt. In Zuge von Abwehrvorgängen verändern sich in Pflanzen nicht nur die Konzentrationen an Phytohormonen, sondern es treten auch eine ganze Reihe anderer metabolischer Veränderungen auf. Metabolom-Analyse ist der Versuch, alle Metaboliten der Pflanze zu identifizieren und zu quantifizieren. Sie kann als eine Ergänzung zur den bisher angewandten allumfassenden Untersuchungen der Proteine (Proteom-Analyse) und Genexpression (Genom-Analyse) angewandt werden. So bietet eine Metabolom-Analyse die Möglichkeit, die Genaktivitäten von der phänotypischen Seite her zu beurteilen und ermöglicht dabei zusätzliche Einblicke, welche durch Betrachtung der Genexpression nicht vermittelt werden können (Fiehn; 2002). Dazu gehört es beispielsweise die Vernetzung der verschiedenen Signalwege aufzuzeigen. Die Induktion eines Signalstoffs kann weitreichende Effekte auf die Synthese und Akkumulation anderer Phytohormone haben. In diesem Zusammenhang sind vor allem wichtig. Zu den Phytohormonen und pflanzlichen Mediatoren gehören Salicylsäure (SA), Jasmonate (JA und OPDA), Abscisinsäure (ABA), Indoleessigsäure (IAA) sowie 1-Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC), der Precursor des Ethylens, (Gray, 2004). Die Strukturformeln der Jasmonate sind in Abb. 11, die der anderen Phytohormone sind in Abb. 15 dargestellt.

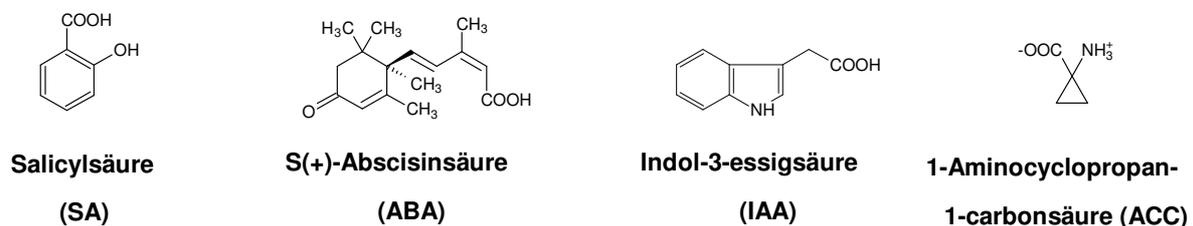


Abb. 14: Verschiedene Phytohormone.

Weiterhin ist die Untersuchung von Zwischenstufen in der Biosynthese pflanzlicher Mediatoren sowie von weiteren wichtigen Metaboliten (organische Säuren, Aminosäuren und Zucker) von Interesse. Durch eine Analyse des Metaboloms können im Gegensatz zur Proteom- und zur Genomanalyse auch nichtenzymatisch entstandene Produkte wie die Phytoprostane oder autoxidativ gebildete Hydroxyfettsäuren erfasst werden. Dabei können autoxidativ gebildete Oxylipine Aufschluss über redoxabhängige Signalwege geben. In dieser Arbeit wurden der Ausbau und die Verbesserung bereits vorhandener Methoden in Angriff genommen.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe ist bereits gezeigt worden, dass Phytoprostane in Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln vorkommen. Ferner ist bereits bekannt, dass Phytoprostane in Pflanzen vielfältige biologische Aktivität besitzen. Die Wirkungen im tierischen Organismus hingegen sind erst spärlich erforscht: In Versuchen mit menschlichen und murinen Zellkulturen wurden immunmodulatorische, antiphlogistische und apoptotische Effekte von Phytoprostanen beobachtet (Dr. Traidl-Hoffmann, TU München; Dr. Dirsch, LMU München; unveröffentlicht). Ob Phytoprostane allerdings auch *vivo* im Menschen wirken können und ob in Menschen überhaupt genügend hohe Phytoprostan Spiegel erreicht werden können, war zu Beginn dieser Arbeit noch vollkommen unbekannt.

Zunächst sollte überprüft werden, in welchen Mengen Phytoprostane durch die Ernährung zugeführt werden. Unter den Lebensmitteln besitzen vermutlich pflanzliche Speiseöle den größten Gehalt an Phytoprostanen. In dieser Arbeit sollten verschiedene Klassen von Phytoprostanen quantifiziert werden, welche in frischen Speiseölen enthalten sind. Ferner galt es zu überprüfen, inwieweit im Zuge der Verdauung im sauren pH des Magens Dehydratisierungen von PPD₁ zu dPPJ₁ beziehungsweise von PPE₁ zu PPA₁ stattfinden. Da während der Lagerung im Haushalt Autoxidation stattfinden kann, sollten einige Modellversuche zur Autoxidation unternommen und an den Phytoprostan-Klassen E und F beispielhaft deren Konzentrationsänderung untersucht werden.

Ergänzend zu diesen Versuchen sollte die Resorption der Phytoprostane nach Verzehr von Speiseölen sowie deren Metabolismus im menschlichen Körper untersucht werden. Dies erfolgte im Rahmen der „Etude Biophyto 1“, einer randomisierten klinischen Pilotstudie, die von Prof. Dr. Jean-Luc Cracowski, Universität Grenoble, durchgeführt wurde. Die Messung der Phytoprostane in den vorliegenden Blut- und Urinproben sollte sich auf die Phytoprostan-Klasse F beschränken, da diese in den Speiseölen neben Phytoprostanen E am häufigsten vorkommen, aber chemisch stabiler als die Phytoprostane E sein sollten (Roberts und Morrow, 2000).

Darüber hinaus sollte die Menge an Phytoprostanen in Blütenpollen bestimmt werden, da es bereits Hinweise darauf gab, dass Phytoprostane an der Entstehung von allergischen Reaktionen beteiligt sein könnten. Entscheidend ist hier nur die Menge, welche durch Wasser bzw. eine Pufferlösung herausgelöst werden kann und damit für eine Interaktion mit Leukozyten in der bronchialen Flüssigkeit zur Verfügung steht.

Außerdem sollte die Analytik von Phytohormonen und anderen Metaboliten verbessert werden. Hier wurde nach einer Methode gesucht, mit welcher Phytohormone, Fettsäuren und Aminosäuren sowie viele weitere Verbindungen mit einer gemeinsamen, schnellen Aufarbeitung erfasst und mittels GC/MS bestimmt werden können. Für diesen Zweck sollten universelle Methoden etabliert werden, um isotoopenmarkierte interne Standards für die GC/MS-Analytik herzustellen.

II Material

II.1 Untersuchungsmaterial

II.1.1 Blütenpollen

Die Pollen von *Betula alba* wurden von Fa. Allergon (Batch 012500101, Allergon AB, Ängelholm/Schweden), Pollen von *Betula verrucosa* bei der Fa. Sigma (Lot 19FO783, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bezogen.

Die Extraktion der Pollen mit RPMI-1640 Medium wurde von Dr. Traidl-Hoffmann, Zentrum für Allergie und Umwelt der TU München durchgeführt. Diese Extrakte wurden bis zu ihrer Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

II.1.2 Speiseöle

Die Pflanzenöle und die Margarine wurden in örtlichen Supermärkten sowie im Reformhaus gekauft. Das rohe Leinöl ist ein Produkt von Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Infusionslösung Intralipide® (deutscher Handelsname Intralipid®) wurde direkt vom Hersteller Fresenius-Kabi (Frankreich) bezogen. Die Öle wurden unmittelbar nach dem Öffnen der Behältnisse untersucht.

Dabei wurden im einzelnen folgende Produkte verwendet:

- Leinöl roh: Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Charge 28628032)
- Sojaöl: Brändle vita Sojaöl fein und rein (Ölmühle P. Brändle GmbH, Empingen, Chargen-Nr./MHD 03/03 L 3B)
- Intralipid: Emulsion mit 30g gereinigtem Sojaöl in 100 ml, Infusionslösung der Fa. Fresenius-Kabi (Sèvres Cédex/Frankreich, Chargen-Nr./MHD 03/03 L 3B)
- Bio-Sojaöl: kaltgepresstes, nichtraffiniertes Sojaöl, Bio nach EG-Öko-Verordnung Fa. Vitaquell (Fauser Vitaquell KG, Hamburg, Chargen-Nr. 23 10:06 CH 343; MHD 24.12.2004 S)
- Sojamargarine "Sojola": Margarine aus Sojaöl und hydriertem Sojaöl (Fa. Vandemoortele Deutschland GmbH, Dresden, Chargen-Nr. L3492 05:37; MHD 26.03.2004 11)
- Rapsöl: Rapsöl Deutsche Küche tegut... (Ölmühle P. Brändle GmbH, Chargen-Nr./MHD: 07/05 L 1B)
- Bio-Rapsöl: Biovit Rapskernöl nativ-kaltgepresst und filtriert, biologisch (Ölmühle P. Brändle GmbH, Chargen-Nr./MHD: 05/05 L 4B)
- Walnussöl: Brändle vita Walnussöl (Chargen-Nr./MHD: 07/05 L1B)
- Olivenöl: Brändle vita natives Olivenöl extra kaltgepresst (Chargen-Nr./MHD: 05/05 L30)

Für die Studie „Etude Biophyto 1“ wurden in Frankreich handelsübliche Öle im Supermarkt eingekauft.

- Bio-Sojaöl Frankreich: nichtraffiniertes, nichtdesodoriertes kaltgepresstes (1. Pressung) Sojaöl, biolog. zertifiziert, Fa. Emile Noel, Pont Saint Esprit/Frankreich, Chargen-Nr./MHD: 05/05 L30
- Olivenöl: natürliches Produkt extra vierge: 1. Kaltpressung, Fa. Lesieur, Neuilly-sur-Seine Cédex /Frankreich, Chargen-Nr./MHD: 08 2004 241 06:30
- Traubenkernöl: Fa. Lesieur, Neuilly-sur-Seine Cédex, Chargen-Nr./MHD: 203 07 2004

Die deutschen Speiseöle befanden sich mit Ausnahme vom Bio-Sojaöl, welches in einer Metalldose vertrieben wurde, in braunen Glasflaschen. Bei den französischen Speiseölen war lediglich das Olivenöl in eine grünen Glasflasche abgefüllt, die anderen beiden befanden sich in weißen Glasflaschen. Das Intralipid® wird in einer durchsichtigen Glasflasche, welche oben mit einer Gummidichtung verschlossen ist, verwendet. Die Margarine befand sich in einer undurchsichtigen Plastikdose, welche mit Alufolie versiegelt war.

Zum Vergleich sowie für Autoxidationsansatz IV diente Linolensäure:

- „natürliche Linolensäure“: 70 % Linolensäure (GC), ~ 25 % Linolsäure, ~ 3 % Ölsäure, Fluka BioChemika (Fluka Chemika AG, Buchs), aufbewahrt in einer braunen Flasche bei -20°C

II.1.3 Blut- und Urinproben

Die Proben stammen von 18 Freiwilligen, die sich an der Studie „Etude Biophyto 1“ beteiligten (siehe Methoden). Die Blutabnahme sowie das Einsammeln der Urinproben wurde von dem mit der Durchführung dieser Studie betrauten Prof. Dr. Jean-Luc Cracowski, Universität Grenoble, vorgenommen. Diese Proben wurden bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

II.1.4 Pflanzenmaterial

II.1.4.1 Arabidopsis-Blätter

Die verwendeten *Arabidopsis*-Pflanzen (*A. thaliana* Ecotyp Columbia-0) stammen aus dem Gewächshaus (Klimakammer) des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg. Die Pflanzen unterlagen einem Kurztagesrhythmus (9h Tag, 15h Nacht) und wurden bei 20°C Raumtemperatur und 80 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Für die Versuche wurden ca. 8 Wochen alte Pflanzen (Blattrosette zur vollen Größe ausgewachsen, aber noch keine Blütenansätze) verwendet.

II.1.4.2 Pflanzenpathogene Bakterien

Die zur Infektion verwendeten *Pseudomonas*-Stämme wurden vom Institut für Pflanzenbiochemie der Universität Halle zur Verfügung gestellt. Das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ist auf *Arabidopsis* virulent. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

+ RPM1 besitzt ein zusätzliches Avirulenzplasmid (RPM1) und ist deswegen auf *Arabidopsis* avirulent. Im Folgenden werden diese Stämme mit Pst vir und Pst avr abgekürzt.

II.2 Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), J.T.Baker (Derenter, NL), Fluka (Fluka Chemie GmbH, Buchs), Merck (Darmstadt), Merck-Schuchardt (Hohenbrunn), Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bezogen.

II.2.1 Standards

Die als interne Standards verwendeten Chemikalien sind bei folgenden Firmen erhältlich:

Prostaglandine:	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
Methyljasmonat (racemisch):	Serva (Heidelberg)
ortho-Anisinsäure:	Aldrich
DL-Norvalin:	Sigma
Indol-3-Propionsäure:	Sigma
Margarinsäure:	Fluka

II.2.2 Reagenzien

Die zur Derivatisierung und für Synthesen verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen gekauft:

Pentafluorbenzylbromid:	Sigma
N,O-Bis(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid:	Fluka
Trimethylsilyl-Diazomethan (2,0M Lösung in Hexangemisch):	Aldrich
O-Methyl-hydroxylamin Hydrochlorid:	Aldrich
Platin(IV)-Oxid-Hydrat (80 % Pt):	Merck-Schuchardt
Methanol-D ₁ :	Sigma
Methyl-D ₃ -Alkohol-D ₁ :	Sigma
Deuteriumoxid	Merck
[¹⁸ O]-Wasser (> 95 atom % ¹⁸ O):	Campro Scientific (Veenendaal)
[¹⁸ O]-Wasser (> 85 atom % ¹⁸ O):	Campro
Ethylenglykol wasserfrei:	Aldrich

Chlorwasserstoff (4,0M Lösung in 1,4-Dioxan) wasserfrei:	Aldrich
Zinkchlorid trocken:	Merck
Eisen(III)chlorid-Tetrahydrat:	Merck
Kupfer(II)sulfat:	Merck

II.2.3 Enzyme

Esterase = EC 3.1.1.1 (aus Schweineleber, roh) Lipase Typ II = EC 3.1.1.3 (aus Schweinepankreas, roh) sowie Leber-Acetonpulver (vom Pferd) wurden bei Sigma gekauft.

II.3 Verbrauchsmaterial

Zur Festphasenextraktion wurden Aminopropyl (NH₂)- und Silica (SiOH)-Phasen der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Für die Gasphasenextraktion wurde Super Q 80/100 Polymer Packing (quervernetztes poriges Polymer aus Divinylbenzol/Ethylvinylbenzol; leicht polar, Maximaltemperatur 250°C) der Firma Alltech (Deerfield, USA) eingesetzt. Diese Materialien wurden in Festphasenextraktionssäulen der Größe 1cm x 6cm (Merck LiChrolut®) eingefüllt, welche oben und unten mit Antibiotika-Testblättchen (Durchmesser 9 mm) der Fa. Macherey-Nagel abgedichtet wurden. Auf den Konus der Säulen wurden Einmal-Injektionskanülen (DIN/EN/ISO 7864) der Fa. HZ Logistic GmbH (Gallin) gesteckt.

II.4 Geräte

II.4.1 Arbeitsgeräte

Wiegen:	Laborwaage Typ 31001 (Sartorius AG, Göttingen) Analysenwaage Mettler AT 200 (Mettler Instrumente GmbH, Gießen)
Messen:	Eppendorf Reference Kolbenhubpipetten (Eppendorf, Hamburg)

Homogenisieren:	<p>Ultra Turrax T25 basic mit Dispergierwerkzeug S25N-10G (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)</p> <p>Kugelmühle Retsch MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan) dazu Reaktionsgefäße 1 ml mit Gewinde + Gewindedeckel mit O-Ring aus Polypropylen (Hartenstein, Würzburg)</p> <p>Ultraschallbad Sonorex TK52 (Bandelin)</p>
Mischen:	<p>Vortex Heidolph Reax 2000 (Heidolph, Kehlheim)</p> <p>Eppendorf-Schüttler beheizbar Eppendorf Thermomix comfort 1,5 ml (Eppendorf GmbH, Engelsdorf)</p> <p>Überkopf-Schüttler GFL 3025 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)</p>
Zentrifugieren:	<p>Minifuge RF Heraeus Sepatech (Kendro Laboratory Products, Langenselboldt)</p> <p>Eppendorf-Zentrifuge Typ 5415C (Eppendorf GmbH, Engelsdorf)</p>
Probenkonzentrierung:	<p>Vakuum-Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111 mit Wasserbad Büchi 461 (Büchi, Flawil, Schweiz)</p> <p>Speedvac Typ RVC-18 (Christ, Osterode)</p>
Festphasenextraktion:	<p>Vakuumbox für SPE-Säulen (Diagen, Düsseldorf) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)</p>
Temperieren:	<p>Wasserbad Thermomix ® MM mit Thermostat (B. Braun AG, Melsungen)</p> <p>Trockenschrank Heraeus (Heraeus-Christ, Osterode)</p> <p>Magnetheizrührer IKA® RCT Basic mit Temperaturkontrollstab κETS-D4-fuzzy (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)</p>
Kühlen:	<p>-20°C Gefrierschrank (Liebherr, Bulle/Schweiz)</p> <p>-80°C Gefrierschrank Heraeus Hera freeze Sorvall (Kendro Laboratory Products, Langenselboldt)</p>
pH-Meter:	<p>HI 9321 Microprozessor (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)</p>

II.4.2 Instrumentelle Analytik

HPLC:	HPLC-Anlage Merck Hitachi (Darmstadt): L6200 Intelligent Pump AS 4000 Intelligent Autosampler L4250 UV-VIS-Detektor Software: Eurochrom Integration Package (Knauer, Berlin) HPLC-Anlage Waters (Milford, USA): Waters™ 600 Controller (Pumpe) Waters™ 717 plus Autosampler Waters™ 996 Photodiodenarray-Detektor Waters™ 474 Scanning Fluoreszenz-Detektor Software: Millennium 32
GC/MS:	GC/MS Finnigan Mat (Bremen) Gaschromatograph Varian 3400 (Varian, Darmstadt) Quadrupol-Massenspektrometer SSQ 700 (Finnigan Mat) GC/MS Jeol (Jeol, Tokio, Japan) Gaschromatograph Agilent 6890 Series (Agilent, Waldbronn) Sektorfeld-Massenspektrometer JMS-GCMate II (Jeol)
LC/MS:	LC/MS-Anlage von Thermo-Finnigan (Bremen) HPLC-System: Finnigan-Surveyor Plus mit Autosampler, HPLC-Pumpe, PDA-Detektor (mit LightPipe™) Massenspektrometer: LC Deca XP Plus mit Ionenfalle von Thermo-Electron-Corporation Software: Xcalibur
Photometer:	Specord 200 Spektralphotometer (Analytik Jena AG, Jena)

III Methoden

III.1 Behandlung der Pflanzen

III.1.1 Infektion mit Pseudomonaden

Zur Bereitung der Pseudomonaden-Suspensionen wurden Einzelkolonien in Nährmedium (Kings Medium B) gegeben und bei 28°C über Nacht im Schüttler angezogen. Am darauffolgenden Tag befanden sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Sie wurden vom Medium abzentrifugiert (10 min 3500 rpm, 4°C) und so lange mit 10 mM MgCl₂-Lösung verdünnt bis die Konzentration von 10⁸ koloniebildenden Einheiten (kbE) erreicht war. Die Konzentration der Bakterienzellsuspension wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt, wobei ein Absorptionswert von 0,2 ca. 10⁸ koloniebildende Einheiten pro ml entspricht.

Ca. 8 Wochen alte Pflanzen (siehe II.1.4) wurden entweder mit Bakteriensuspensionen (Pst vir bzw. Pst avr) oder als Kontrolle mit einer 10 mM MgCl₂-Lösung mittels einer Spritze infiltriert, wobei darauf geachtet wurde, dass jeweils das ganze Blatt vollständig durchtränkt war. Senescente oder verwundete Blätter wurden ausgelassen. Danach wurden die Pflanzen bis zu ihrer Ernte in der Klimakammer belassen. Bei der Ernte wurden die behandelten Blätter abgeschnitten, zügig in flüssigen Stickstoff gegeben und später vereinigt und pulverisiert.

III.1.2 Verwundung

An einer gesunden Pflanze wurde etwa die Hälfte der Blätter mit einem Nagelkissen (12 Nägel /cm²) durchstochen, während die Blätter auf der anderen Seite unbehandelt blieben. Nach 1 h wurden die Blätter abgeschnitten, einzeln abgewogen und in flüssigen Stickstoff gegeben. Bei der späteren Aufarbeitung wurden gleich alte und gleich entwickelte Blätter miteinander verglichen.

III.2 Hydrolyse der Triacylglyceride in den Speiseölen

Für die Hydrolyse der Triacylglyceride wurde die Methode nach W.W. Christie (Lipid Analysis. 2nd Edition 1982; Pergamon Press) angewandt. Zu Beginn der Testreihe wurde die Methode mittels Dünnschichtchromatographie überprüft und damit abgesichert, dass so eine vollständige Hydrolyse der in den Ölen enthaltenen Triacylglyceride erzielt wird.

III.2.1 Enzymatische Hydrolyse mit Pankreas-Lipase

Bis zu 100 mg Lipid wurden versetzt mit:

- 20 ml 1M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer pH 8,0
- 2 ml 2,2 %-ige Calciumchlorid-Lösung (m/v)
- 5 ml 0,05 %-ige Deoxycholsäure-Lösung (m/v)
- 20 mg (3580 U) Lipase Typ II, roh, aus Schweinepankreas [EC 3.1.1.3]

Um Autoxidationsvorgänge während der Hydrolyse zu vermeiden, wurde durch den Hydrolyseansatz 1 min Argon geleitet.

Die Hydrolyse wurde 1 Stunde dunkel bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler durchgeführt.

Danach wurden 1 Plättchen Triphenylphosphin, 1300µl 6M HCl + 700µl 1 M Citronensäure (damit pH 3 erreicht wurde) sowie die internen Standards [¹⁸O]₃-PPE₁ und [¹⁸O]₃-PPF₁ zugegeben. Aus dieser Lösung wurden die Fettsäuren 3x mit je 7 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer abrotiert (60°C Wasserbad-Temperatur).

Der interne Standard für die Bestimmung der dPPJ₁, [¹⁸O]₂-dPPJ₁, wurde erst nach der vollständigen Entfernung des Lösungsmittels zugegeben.

Bei der Bestimmung von PPA₁ und PPB₁ wurden nach der Hydrolyse bei pH 3 zunächst mit Hexan der Großteil der lipophilen Verbindungen ausgeschüttelt, bevor die internen Standards PGA₁ und PGB₁ zugegeben und die Phytostane mit Ethylacetat extrahiert wurden (siehe IV.1.5.2).

III.2.2 Alkalische Hydrolyse

Bis zu 100 mg Lipid wurden versetzt mit:

- 2 ml 1M NaOH 95 % ethanolisch

Um Autoxidationsvorgänge während der Hydrolyse zu vermeiden, wurde durch den Hydrolyseansatz 1 min Argon geleitet.

Zur Hydrolyse wurde der Ansatz 1 Stunde bei 80°C inkubiert.

Danach wurden 1 Plättchen Triphenylphosphin, 5 ml Wasser, + 300µl 6M HCl + 200µl 1 M (damit pH 3 erreicht wurde) sowie der interne Standard [¹⁸O]₃-PPF₁ zugegeben. Aus dieser Lösung wurden die Fettsäuren 3x mit je 3 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und abrotiert (80°C Wasserbad-Temperatur).

III.3 Derivatisierungsmethoden

Für die Auftrennung der Proben im GC und die anschließende Bestimmung im Massenspektrometer (EI sowie CI bzw. NCI) war eine Derivatisierung der Analyten erforderlich. Dabei wurden die Verbindungen in stabile, flüchtige sowie in dem jeweiligen Ionisationsmodus gut und spezifisch nachweisbare Derivate überführt.

III.3.1 Methylierung von Carbonsäuren

Die Methylierung der Phytohormone, Fettsäuren und anderer Verbindungen wurde mit Diazomethan durchgeführt. Diazomethan selbst ist ein leichtflüchtiges, explosives und hochreaktives Gas, das krebserregend ist. Deshalb wird heutzutage mit einem flüssigen Diazomethan-Derivat, dem Trimethylsilyl-Diazomethan (TMS-Diazomethan) gearbeitet. Dieses ist bei Raumtemperatur stabil, nicht ganz so reaktiv und auch nicht so extrem gesundheitsschädlich wie Diazomethan selbst. Zur Methylierung wurde die Probe in 200 µl Diethylether und 100 µl Methanol aufgenommen und 25 µl frisch vorbereitetes Methylierungs-Reagenz (= TMS-Diazomethan-Lösung 1:20 in MeOH) hinzugegeben. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl Eisessig gestoppt und die Reagenzien wurden bei 40°C unter einem Stickstoffstrom ausgetrieben.

III.3.2 Herstellung von Pentafluorbenzylestern

Eine sehr empfindliche Detektionsmethode ist die Massenspektrometrie im Negativ-Chemischen-Ionisationsmodus (NCI). Dafür müssen die Verbindungen mit einer Gruppe derivatisiert werden, welche einen hohen Elektroneneinfangsquerschnitt besitzt. Dabei hat sich für Carbonsäuren die Derivatisierung zu Pentafluorbenzylestern etabliert.

Für diese Reaktion wurden die Analyten in 200 µl Chloroform gelöst und mit 10 µl N,N-Diisopropylethylamin (DIEPA), welches als alkalischer Katalysator dient, und 10 µl 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid (PFB-Br) versetzt. Nach 45 min Inkubation bei 40°C wurde der Reaktionsansatz unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Allerdings müssen nach der Derivatisierung die Reste von Bromidionen und quartären Ammoniumverbindungen (aus dem basischen Katalysator) sorgfältig abgetrennt werden, da diese sonst die GC-Säule schädigen würden. Dieses kann entweder über SPE oder über VPE erfolgen.

III.3.3 Herstellung von Trimethylsilylethern

Um Phytostane und andere Hydroxyfettsäuren über Gaschromatographie auftrennen zu können, muss man neben der Carboxylgruppe auch noch ihre Hydroxylgruppe derivatisieren, da die Moleküle sonst nicht flüchtig sind. Für diesen Zweck bildet man gerne den Trimethyl-

silylether, da er mit den geeigneten Reagenzien bereits bei niedriger Temperatur synthetisiert werden kann und diese leicht durch Verdampfen entfernt werden können.

Zu der Reaktion wurden die mit PFB-veresterten Phytoprostane in 200 µl Chloroform gelöst und mit 50 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) versetzt und 45 min bei 40°C inkubiert. Danach wurde die Probe unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt.

III.3.4 Methoximierung von Ketogruppen

Bei der im Injektor des Gaschromatographen vorherrschenden Temperatur von 300°C tritt bei PPA₁ über eine Keto-Enol-Tautomerie eine Umlagerung zu PPB₁ auf. Um diese Isomerisierung zu verhindern, wurde die Ketogruppe zum Methoxim umgesetzt. Dazu wurde die Probe mit 50 µl Methoxyamin-HCl-Reagenz (50 mg/ml in Dimethylformamid) versetzt und eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bis zur Trockene eingeeengt, in 2 ml Wasser aufgenommen und 2 mal mit je 2 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

III.3.5 Hydrierung von Doppelbindungen

Doppelbindungen wurden mit Adams-Katalysator (Platin^(IV)oxid-Hydrat) und Wasserstoff zu Einfachbindungen hydriert. Dabei wurde die Probe in 1 ml Methanol gelöst, 50 mg Adams-Katalysator hinzugegeben und 10 min Wasserstoff durch die Suspension geleitet. Danach wurde der Katalysator über einen Membranfilter abgetrennt und die Lösung unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

III.4 Bestimmung von Kreatinin

Zur Bestimmung von Kreatinins in Urinproben wurde der Kreatinin-Bestimmungs-Kit von Sigma (Prozedur-Nr. 555) verwendet. Dieser stellt im Wesentlichen eine kolorimetrische Bestimmung des Kreatinins mit Hilfe der Jaffé-Reaktion dar.

300 mg Probelösung bzw. 300 µl Kreatinin-Standard-Lösung (3 mg/dl) wurden versetzt mit:

- 1 ml Farbreagenz (= Pikrinsäure-Lösung in 1N NaOH 1:5, frisch bereitet)

Nach gründlichem Mischen wurde 8-12 min bei RT inkubiert.

Danach wurde die Lichtabsorption bei der Wellenlänge 500 nm gemessen. Dieser Wert entspricht dem Initialwert.

Sofort nach dem Ablesen wurde Säure zugegeben, um den gebildeten Meisenheimer-Komplex wieder zu zerstören:

- 100µl Säurereagenz (verdünnte Schwefelsäure und Essigsäure)

Nach gründlichem Mischen wurde 5 min bei RT inkubiert.

Danach wurde erneut die Absorption bei der Wellenlänge 500 nm gemessen. Dieser Wert entspricht dem Finalwert.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel: $\text{Kreatinin [mg/dl]} = \frac{\text{Initial}_{\text{Test}} - \text{Final}_{\text{Test}}}{\text{Initial}_{\text{Stand}} - \text{Final}_{\text{Stand}}} \times 3$

Zuvor wurde mittels einer Kalibriergeraden der lineare Bereich des Tests ermittelt sowie die Reproduzierbarkeit und die Plausibilität des Testergebnisses überprüft.

III.5 Chromatographische Methoden

III.5.1 Festphasenextraktion

Zur Probenvorbereitung wurde in der Regel die Festphasenextraktion verwendet, da es sich hierbei um eine relativ kostengünstige und schnelle Reinigungsmethode handelt. Dazu wurden Glassäulen (LiChrolut®) mit jeweils 500 mg des Adsorptionsmaterials (NH₂ oder SiOH) befüllt. Die Chromatographie erfolgte unter Schwerkraftbedingungen mit einem Extraktionsgerät, wo mehrere Proben parallel aufgearbeitet werden konnten. Vor Beginn der Probenaufreinigung wurden die Säulen mit 6 ml Methanol und 3 ml Diethylether gewaschen und danach mit dem Lösungsmittel, in dem die Probe aufgetragen werden sollte, äquilibriert. Bei Verwendung von NH₂-SPE-Material wurde dessen Basizität zu Beginn mit 6 ml 5 % Triethylamin in Methanol regeneriert, welche anschließend wieder 6 ml Methanol von der Säule gewaschen wurden. Während sich die Probe auf der Säule befand, durfte diese nicht trocken laufen, da es sonst zu Veränderungen im Elutionsprofil kommen kann.

III.5.2 Analytische HPLC

Bestimmung von dPPJ₁:

HPLC-Anlage: Merck Hitachi
Säule: RP-18e LiChrospher®-100, 250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5µm (Knauer)
Fließmittel: A: Wasser, mit Phosphorsäure auf pH 2 eingestellt
B: Methanol
C: Acetonitril

Gradient:

Zeit	Flussrate [ml/min]	%A	%B	%C
0	1.5	42.0	29.0	29.0
20.0	1.5	42.0	29.0	29.0
20.1	1.5	23.0	61.0	16.0
30.0	1.5	23.0	61.0	16.0

UV-Detektor: Wellenlänge 309.0 nm

Retentionszeit: dPPJ₁-I: 16 min; dPPJ₁-II: 18 min; dPGJ₁: 25 min

Bestimmung von PPB₁:

HPLC-Anlage: Merck Hitachi

Säule: RP-18e LiChrospher®-100, 250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm (Knauer)

Fließmittel: A: Wasser, mit Phosphorsäure auf pH 2 eingestellt

B: Methanol

C: Acetonitril

Gradient:

Zeit	Flussrate [ml/min]	%A	%B	%C
0	1.00	57.0	23.0	20.0
25.0	1.00	57.0	23.0	20.0
25.1	1.00	35.0	35.0	30.0
42.0	1.00	35.0	35.0	30.0

UV-Detektor: Wellenlänge 278.0 nm

Retentionszeit: PPB₁-I: 24 min; PPB₁-II: 27 min; PGB₂: 36 min

Bestimmung von PPA₁:

Die Bestimmung von PPA₁ bei seinem Absorptionsmaximum (217 nm) ist problematisch, da hier Interferenzen mit weiteren Verbindungen aus der Matrix auftreten. Deshalb wurde PPA₁ für die HPLC-Analyse zu PPB₁ isomerisiert und als PPB₁ vermessen.

Bestimmung von Salicylsäure:

HPLC-Anlage: Waters

Säule: Eurospher-Säule 250 x 4 mm C18

Fließmittel: A: Wasser, mit Phosphorsäure auf pH 2 eingestellt

B: Acetonitril (+ 0,01 % Essigsäure)

Gradient:

Zeit	Flussrate [ml/min]	%A	%B
0	1.00	90.0	10.0
5.0	1.00	90.0	10.0
15.0	1.00	70.0	30.0
25.0	1.00	45.0	55.0
30.0	1.00	45.0	55.0

Retentionszeit: ortho-Anisinsäure: 21 min; Salicylsäure: 24 min
PDA: Wellenlängen 200.0 bis 400.0 nm
Fluoreszenzdetektor: Anregungswellenlänge: 305 nm; Emissionswellenlänge: 365 nm
nach 24.0 Minuten: Emissionswellenlänge 405 nm

III.5.3 Präparative HPLC

Präparative Trennung von PPA₁ und PPB₁

HPLC-Anlage: Merck Hitachi
Säule: RP-18e LiChrospher®-100, 250 mm x 8 mm, Partikelgröße 5µm (Knauer)
Fließmittel: A: Wasser, mit Phosphorsäure auf pH 2 eingestellt
B: Methanol
C: Acetonitril

Gradient:

Zeit	Flussrate [ml/min]	%A	%B	%C
0	1.00	57.0	23.0	20.0
25.0	1.00	57.0	23.0	20.0
45.0	1.00	45.0	25.0	30.0

UV-Detektor: Wellenlänge 278.0 nm bzw. 309 nm
Retentionszeit: PPB₁-I: 33 min; PPB₁-II: 35 min;
PPA₁: mehrere Peaks im Bereich von 37 bis 44 min

III.5.4 GC/MS

Die Proben wurden zuerst an einem GC (Varian 3400 oder Agilent 6890) aufgetrennt und danach in einen Massenspektrometer (SSQ 700 oder JMS GCMate II) überführt und dort vermessen. An beiden Geräten war eine Detektion im Elektronenstoßionisationsmodus (EI) sowie im positiven und negativen chemischen Ionisationsmodus (CI bzw. NCI) möglich.

Nachdem beide GC/MS-Systeme in etwa das gleiche Leistungsspektrum aufweisen, wurden beide Systeme gleichermaßen für die hier beschriebenen Analysemethoden eingesetzt.

III.5.4.1 GC/MS-Systeme

System 1 (SSQ 700):

Gaschromatograph: Varian 3400
 Injektor: Inlet-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
 Split: Öffnung nach 1 min
 Vorsäule: methyldeaktivierte Säule: 10 m x 0,25 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
 Säule: Zebron ZB-5 (5 % Phenyl-, 95 % Dimethylpolysiloxan): 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke (Phenomenex)
 Trägergas: Helium, Fließgeschwindigkeit 23 cm/s
 Detektor: SSQ 700 Massenspektrometer mit Quadrupol (Finnigan MAT)
 Ionenquelle: 150°C; 2,0-2,5 x 10⁻⁵ Torr
 Reaktandgas: Isobutan
 Elektronenenergie: EI: 70 eV; CI: 200 eV

System 2 (JMS-GCMateII):

Gaschromatograph: Agilent 6890
 Injektor: Inlet-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
 Split: splitless
 Vorsäule: methyldeaktivierte Säule: 10 m x 0,25 mm (Phenomenex)
 Säule: Zebron ZB-5: 30 m x 0,25 mm (Phenomenex)
 Trägergas: Helium, Fließgeschwindigkeit 1 ml/min
 Detektor: JMS-GCMate II mit Sektorfeld (Jeol)
 Ionenquelle: 200°C; 2,4 x 10⁻² Pa
 Reaktandgas: Methan
 Elektronenenergie: EI: 70 eV; CI: 200 eV

III.5.4.2 Temperaturgradient zur GC-Trennung von Phytoprostanen

Gesamtzeit [min]	Heizrate [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	175
0.5	-	175
4.2	30	285
10.2	2.5	300
15.2	-	300

III.5.4.3 Temperaturgradient zur GC-Analytik von Jasmonsäure und OPDA

Gesamtzeit [min]	Heizrate [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	100
0.5	-	100
3.5	30	190
11.0	5	225
12.0	31	280
16.0	5	300
26.0	-	300

IV Ergebnisse

IV.1 Bestimmung von Phytoprostanen

IV.1.1 Extraktion von Phytoprostanen

Um die Phytoprostane aus Blättern, wässrigen Lösungen, Urin oder Blut bestimmen zu können, müssen diese zunächst aus der Matrix extrahiert werden. Da Phytoprostane relativ unpolare Verbindungen darstellen, sind hierfür organische Lösungsmittel wie Methanol, Diethylether, Ethylacetat oder Chloroform am besten geeignet. Hexan und Petrolether sind hierfür bereits zu unpolar. Beim Ausschütteln aus wässrigen Lösungen wurden diese mit Citronensäure o.ä. auf pH 3 angesäuert, damit die Carboxylgruppe der Phytoprostane vollständig protoniert vorlag und die Moleküle damit einen unpolaren Charakter bekamen. Weiterhin wurde tert-Butyl-Hydroxytoluol (BHT) zugesetzt (Endkonzentration 0,002 % BHT), welches als Radikalfänger fungiert und somit eine Autoxidation des Probenmaterials verhindert. In der Probe bereits vorhandene Peroxide wurden mit 50 mg Triphenylphosphin (TPP) reduziert.

IV.1.2 Festphasenextraktion an Aminopropyl- und Silika-Material

Als Probenvorbereitung für die Analyse von Phytoprostanen ist die Festphasenextraktion eine geeignete Aufreinigungsmethode. Dabei können sämtliche Phytoprostan-Klassen nacheinander selektiv von der Säule eluiert werden, ohne sich gegenseitig zu überlappen. Auch der Großteil der unpolaren Begleitstoffe bis hin zur Linolensäure kann abgetrennt werden, ohne das unpolarste Phytoprostan dPPJ₁ zu verlieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits bestehende Festphasenextraktionsmethoden zusammengefasst und die Lösungsmittel optimiert, um noch schärfer abgetrennte Fraktionen zu bekommen.

Wasch und Elutionsschritte an NH₂-Material:

Die Probe wird in wenig Diethylether auf eine mit 500 mg Aminopropylmaterial gefüllte Säule aufgegeben und einsickern gelassen. Danach kann die Säule zunächst mit 3 ml Chloroform / Isopropanol-Gemisch (2:1, v/v) gewaschen werden. Anschließend erfolgt die Elution von Fettsäuren und der unpolarsten Phytoprostan-Klasse dPPJ₁ mit 6 ml Hexan / Ethylacetat / Essigsäure (75:25:2, v/v). Danach werden PPA₁ und PPB₁ als gemeinsame Fraktion mit 6 ml

Ether / Essigsäure (98:2, v/v) eluiert. Anschließend werden PPE₁ und PPF₁ zusammen mit 9 ml Ether / Methanol / Essigsäure (80:20:2, v/v) eluiert.

Wasch- und Elutionsschritte an SiOH-Material:

Die Probe wird in wenig Chloroform auf eine mit 500 mg Aminopropylmaterial gefüllte Säule aufgegeben und einsickern gelassen. Durch nachfolgendes Waschen mit 3 ml Hexan / Diethylether / Essigsäure (95:5:1, v/v) können Fettsäuren und andere unpolare Begleitstoffe abgetrennt werden. Anschließend werden dPPJ₁ mit 9 ml Hexan / Ethylacetat / Essigsäure (75:25:1, v/v) eluiert. Danach kann nochmals mit 6 ml Hexan / Ether / Essigsäure (66:33:1, v/v) gewaschen werden. Als nächstes werden PPA₁ und PPB₁ mit 6 ml Ether / Essigsäure (98:2, v/v) eluiert. Schließlich erfolgt die Elution von PPE₁ und PPF₁ mit 9 ml Ether / Methanol / Essigsäure (90:10:2, v/v).

PPD₁ werden üblicherweise als dPPJ₁ bestimmt und bereits vor der SPE isomerisiert (siehe V.1.2). Allerdings können auch PPD₁ mittels SiOH-SPE isoliert und dabei klar von dPPJ₁ abgetrennt werden: PPD₁ sind etwas polarer als dPPJ₁ und werden mit Hexan / Ethylacetat / Essigsäure (30:70:1, v/v) von der SiOH-SPE eluiert. Allerdings können mittels Festphasenextraktion PPA₁ nicht von PPB₁ abgetrennt werden, obwohl PPA₁ etwas polarer ist als PPB₁. Im Gegensatz zu früher beschriebenen Methoden ist die Elution von PPA₁ von der SiOH-SPE mit Hexan / Ether / Essigsäure (33:66:1, v/v) nicht vollständig und in der nachfolgenden Waschfraktion finden sich noch ca. 30 % des PPA₁-Gehalts der Probe. Deshalb werden im Folgenden PPA₁ und PPB₁ gemeinsam mit Ether / Essigsäure (98:2, v/v) eluiert.

Zur Bestimmung von verschiedenen Phytoprostanen in einer Probe können aus dem gleichen Extrakt sämtliche Phytoprostanklassen nacheinander über das oben angeführte Schema isoliert werden. Anschließend muss eine weitere Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen entsprechend der zu untersuchenden Phytoprostanklasse durchgeführt werden. Nachfolgend werden die jeweiligen Besonderheiten aufgeführt, die für die einzelnen Phytoprostanklassen gelten.

IV.1.3 Bestimmung der einzelnen Phytoprostanklassen

IV.1.3.1 Phytoprostane D₁ und deoxy-J₁

Zur Bestimmung der Phytoprostane J₁ können die Proben direkt nach der Festphasenextraktion ohne weitere Aufreinigungs- oder Derivatisierungsschritte vermessen werden. Phytoprostane D₁ jedoch sind instabil. Da sie während der Aufarbeitung spontan zu deoxy-J₁ dehydratisieren können, sollten sie bereits vor der Aufarbeitung zu dPPJ₁ konvertiert und dann zusammen mit dPPJ₁ bestimmt werden. Durch Differenzmessungen kann man dann den Gehalt der Probe an PPD₁ und dPPJ₁ berechnen. Zur Dehydratisierung von PPD₁ wurden 100 mg

der trockenen Probe mit 400µl Trifluoressigsäure versetzt und 15 min bei 40°C inkubiert. Danach wurde überschüssige Trifluoressigsäure bei 40°C am Rotationsverdampfer abgezogen. So erhaltenes dPPJ₁ konnte wie endogenes dPPJ₁ über Festphasenextraktion (V.1.1) aufgereinigt werden.

Die Quantifizierung von dPPJ₁ über GC/MS erwies sich als problematisch, da hier nach Hydrierung und Derivatisierung mit PFB-Br eine zu geringe Empfindlichkeit erreicht wurde. Auch eine vorausgehende Methoximierung brachte keine Verbesserung. In beiden Fällen lag die Bestimmungsgrenze bei 50 ng bis 100 ng dPPJ₁. Aus diesem Grunde wurde zur Bestimmung von dPPJ₁ eine LC/MS-Methode entwickelt, mit welcher die Nachweisgrenze auf 100 pg gesenkt werden konnte. Als interner Standard wurde hier [¹⁸O]₂-dPPJ₁ verwendet, welches enzymatisch (Methoden siehe IV.2) hergestellt worden war. Die Quantifizierung erfolgte durch die Integration der Peakflächen aus den jeweiligen MS/MS-Spektren von Analyt und Standard.

LC/MS-Bedingungen:

HPLC-Anlage: Surveyor
 Säule: Purospher®-Star LichroCART® RP18e: 125 x 2 mm, 5µm I.D.
 Fließmittel: A: 2 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 8
 B: Methanol
 C: Acetonitril

Gradient:

Zeit	Flussrate [µl/min]	%A	%B	%C
0	250	70.0	20.0	10.0
25.0	250	40.0	20.0	40.0
27.0	250	0.0	50.0	50.0
31.0	250	0.0	50.0	50.0

Retentionszeit: 17 min
 PDA: Wellenlängen (A) 214.0 nm, (B) 280.0 nm und (C) 309.0 nm
 Direct Valve: 0.00-11.59 min in den Abfall; 12.00-38.00 min in die Ionenquelle
 Ionisation: Elektrospray, Kapillare 300°C, 1,2 kV
 MS: MS mit Ionenfalle von Thermo-Finnigan
 MS Run Time: 38.00 min
 Scan Events:
 1: MS: positive Ionen, full scan
 → gescannter Ionenbereich 80.0-300.0 Da
 2: MS/MS: positive Ionen, Parent Ion: 291.0 Da,
 Isolationsweite 1.0 Da, Kollisionsenergie 40 % Time 30.000 ms
 → gescannter Ionenbereich 80.0-300.0 Da
 3: MS/MS: positive Ionen, Parent Ion: 295.0 Da,
 Isolationsweite 1.0 Da, Kollisionsenergie 40 % Time 30.000 ms
 → gescannter Ionenbereich 80.0-300.0 Da

IV.1.3.2 Phytoprostane A₁ und B₁

Für die Bestimmung der Phytoprostane A₁ und B₁ erwies sich die vorhandene GC/MS-Methode als besser geeignet als getestete HPLC/MS-Methoden. Bei Anwendung der üblichen Derivatisierungsweise mit Pentafluorbenzylbromid und BSTFA können jedoch PPA₁ und PPB₁ nur gemeinsam erfasst werden, da im GC-Injektor aufgrund der hohen Temperatur (300°C) PPA₁ zu PPB₁ isomerisieren. Dieses Problem kann durch eine geeignete Derivatisierung der Ketogruppe des α,β -ungesättigten Ketons umgangen werden, da so die Isomerisierung notwendige Keto-Enol-Tautomerie unterbunden wird. Für diesen Zweck wurde zunächst mittels Methoxyamin-HCl das PPA₁/PPB₁-Methoxim (Abb. 16) gebildet (Thoma et al., 2003). Erst dann erfolgte die Derivatisierung mit PFB-Br (III.3.2) und BSTFA (III.3.3). Nach Abtrennung der Reagenzien-Reste über SiOH-SPE (aufgeben in Hexan, Elution mit 9 ml Ether / Hexan (2:1, v/v)) erfolgte die Analyse mittels GC/MS (III.5.3). Dabei lag die Methoximierungsrate für PPA₁ bei 80-90 % und für PPB₁ bei 60-70%. So erhaltene Derivate von PPA₁ und PPB₁ trennen sich außer in die Regioisomere zusätzlich noch in syn- und anti-Isomere des Methoxims auf. Dabei unterscheiden sich Peaks von PPA₁ in ihrer Retentionszeit deutlich von denen von PPB₁.

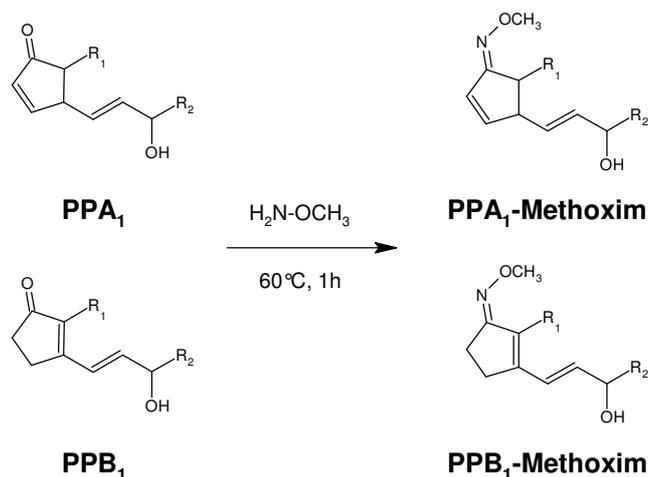


Abb. 15: Methoximierung von PPA₁ und PPB₁ mit Methoxyamin-HCl-Reagenz. Typ I: R₁ = C₇H₁₄COOH, R₂ = C₂H₅; Typ II: R₁ = C₂H₅, R₂ = C₇H₁₄COOH.

Bei Thoma et al. (2003) wurde für die gemeinsame Quantifizierung von PPA₁ und PPB₁ [¹⁸O]-PPB₁ als Standard verwendet, welches durch Autoxidation hergestellt und damit in der Ketogruppe des Cyclopentanrings sowie in der Hydroxylgruppe der Seitenkette markiert war. Allerdings geht bei der Methoximierung ein Teil der Markierung des [¹⁸O]-Standards verloren, d.h., [¹⁸O] wird gegen [¹⁶O] rückgetauscht. Deshalb wird bei Thoma in einer zweiten Probe das Verhältnis PPA₁ : PPB₁ bestimmt und anschließend daraus die beiden Absolutmengen berechnet. Praktischer ist jedoch das Arbeiten mit einer stabilen Verbindung als internem Standard, über welche die beiden Analyten direkt quantifiziert werden können. Deshalb wurden in dieser Arbeit die entsprechenden Prostaglandine, PGA₁ und PGB₁, als interne Standards verwendet. Um sicherzustellen, dass die Derivatisierung für Prostaglandine und Phytoprostane in gleichem Ausmaß stattfindet, wurden PPA₁ und PPB₁ gegen PGA₁ und PGB₁ sowohl mittels HPLC (UV-Detektion) als auch derivatisiert zum Methoxim mittels GC/MS

quantifiziert. Beide Quantifizierungsvarianten wurden jeweils 3-mal durchgeführt. Dabei wurde mit beiden Systemen das gleiche Ergebnis gefunden. Das bedeutet, dass bei der Derivatisierung keine Diskriminierung zwischen Phytoprostanen und Prostaglandinen auftritt.

IV.1.3.3 Phytoprostane E₁

Die direkte Bestimmung der PPE₁ im GC/MS ist praktisch nicht durchführbar, da sich diese Verbindung aus 32 Isomeren (16 Stereoisomere pro Regioisomer) zusammensetzt. Diese würden im GC/MS-Chromatogramm eine unübersichtliche und breit gestreute Schar von Peaks ergeben. Allerdings kann dieses Problem durch eine Dehydratisierung umgangen werden: Nach ihrer Konvertierung zu PPB₁ besitzen beide Typen nur noch jeweils ein chirales Kohlenstoffatom (Abb. 17) und zeigen im Chromatogramm zwei deutlich getrennte Peaks (Parchmann und Mueller, 1998).

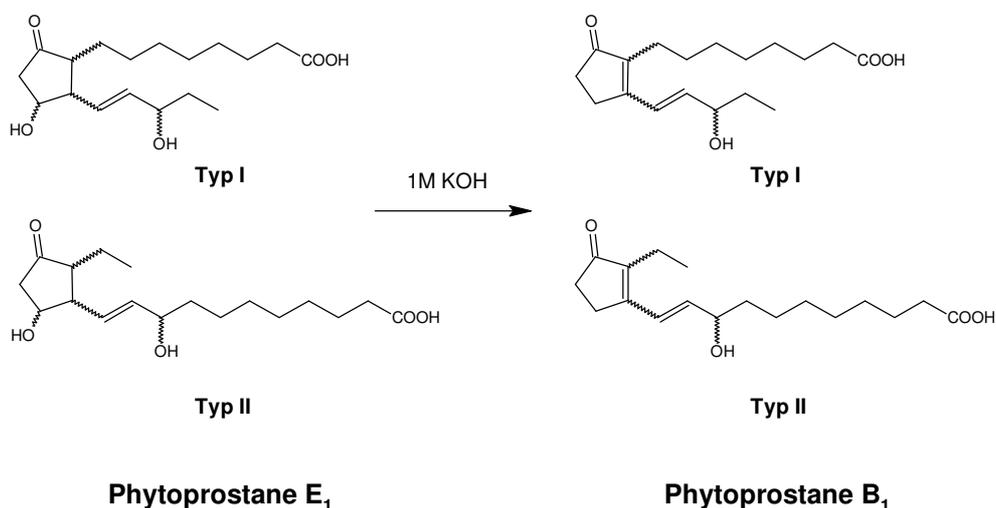


Abb. 16: Basenkatalysierte Dehydratisierung (1M KOH, 10 min, RT) von PPE₁ zu PPB₁.

Aus diesem Grunde wurde nach der Festphasenextraktion die Fraktion, welche PPE₁ und PPF₁ enthielt, einer basenkatalysierten Dehydratisierung unterworfen. Dazu wurde sie in 100µl Methanol aufgenommen und 70µl 1M KOH hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 40°C wurde mit 3 ml Wasser verdünnt und die Reaktion mit 100µl 1M Citronensäure gestoppt. Aus dieser Lösung wurden die Phytoprostane 2-mal mit Diethylether extrahiert.

Im Alkalischen isomerisieren nur PPE₁; PPF₁ sind unter diesen Bedingungen stabil. Anschließend können die gebildeten PPB₁ mittels Festphasenextraktion von PPF₁ abgetrennt werden. Dazu wurde die Probe in Chloroform auf eine SiOH-SPE aufgegeben und PPB₁ mit 6 ml Ether / Essigsäure (98:2, v/v) eluiert und anschließend PPF₁ mit 9 ml Ether / Methanol / Essigsäure (90:10:2, v/v) von der Säule eluiert.

Danach wurden die PPB₁ mit PFB-Br (III.3.2) und BSTFA (III.3.3) derivatisiert und per GC/MS analysiert. Nach Abtrennung der Reagenzien-Reste über SiOH-SPE (aufgeben in Hexan, Elution mit 9 ml Ether / Hexan (2:1, v/v)) erfolgte die Analyse mittels GC/MS (III.5.4).

Auch hier wurde als interner Standard [^{18}O]-markiertes PPE₁ verwendet, das durch Autoxidation in einer [^{18}O]₂-Atmosphäre synthetisiert worden war (Parchmann et al., 1998).

IV.1.3.4 Phytoprostane F₁

Bei der Bestimmung der Phytoprostane F₁ erwies sich ebenfalls eine Bestimmung mit GC/MS der Bestimmung mit LC/MS überlegen, da hier eine höhere Nachweisgrenze erreicht werden kann. Als interner Standard konnte hier wiederum [^{18}O]₃-PPF₁ verwendet werden, welches von R. Imbusch durch Autoxidation von Linolensäure in einer ^{18}O -Atmosphäre hergestellt worden war. Allerdings traten bei früheren Untersuchungen von PPF₁ in Pflanzenmaterial im GC/MS-Chromatogramm mehrere Peaks mit dem gleichen Molekulargewicht wie PPF₁ auf, welche kurz vor oder zusammen mit den PPF₁ von der GC-Säule eluierten (Imbusch und Mueller, 2000a). Bei den ähnlichen Verbindungen handelt es sich vermutlich um acyclische trihydroxylierte Fettsäuren, welche aus der Autoxidation bzw. Photo-Oxidation von Linolensäure stammen oder in Pflanzen durch Peroxygenasen oder Alkoholepoxydsynthasen enzymatisch aus dieser gebildet werden (Abb. 18). Diese können auch in anderen Probenmaterialien neben PPF₁ vorkommen.

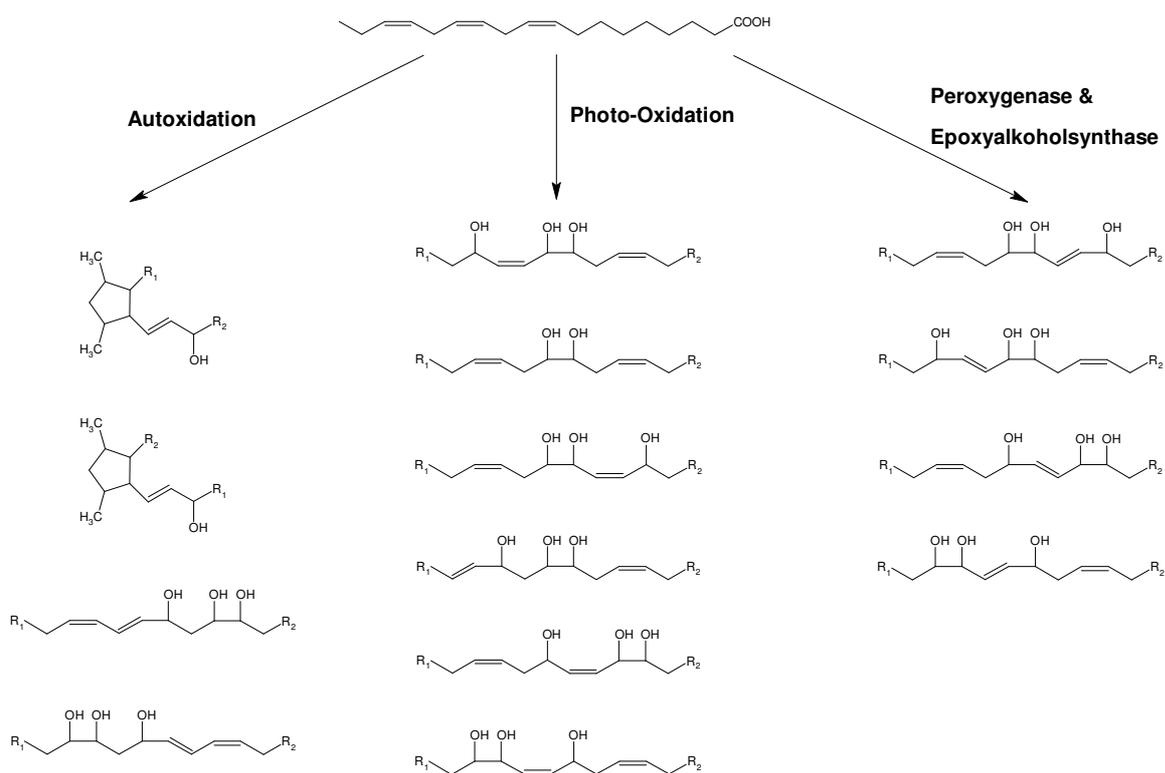


Abb. 17: Bildung von cyclischen und acyclischen trihydroxylierten Linolensäurederivaten mittels Autoxidation, Photo-Oxidation oder enzymatisch. Die Reste R₁ und R₂ stehen für CH₃ und (CH₂)₆COOH.

Um eine exakte Quantifizierung von PPF₁ zu ermöglichen, müssen diese zu ihrer eindeutigen Detektion mit Adams-Katalysator und Wasserstoff hydriert werden. Da die anderen Oxylipine im Gegensatz zu PPF₁ zwei Doppelbindungen besitzen, sind sie nach der Hydrierung vier Dalton, PPF₁ zwei Dalton und [¹⁸O]₃-PPF₁ sechs Dalton schwerer. Somit können sie die Analyse von PPF₁ nicht mehr beeinträchtigen. Außerdem verbessert die Hydrierung die GC-Trennung und Quantifizierung (Imbusch und Mueller, 2000b). Die Isomere von PPF₁ geben im GC/MS ein charakteristisches Peakmuster mit 4 unterschiedlich großen Peaks (siehe Abb. 19).

Dementsprechend wurden PPF₁ mit Adams-Katalysator und Wasserstoff hydriert (III.3.5). Danach folgte die Derivatisierung zum Pentafluorbenzylester (III.3.2). Anschließend wurden Reagenzien-Reste abgetrennt, indem die Probe in Chloroform auf eine SiOH-SPE aufgegeben, mit 3 ml Diethylether gewaschen und mit 9 ml Ether / Methanol 9:1 (v/v) eluiert wurde. Nach der Derivatisierung zum Silylether (III.3.3) wurde die Probe am GC/MS (III.5.4) vermessen.

IV.1.4 Bestimmung von Phytoprostanen in Blütenpollen

In Blütenpollen enthaltene Phytoprostane könnten mit an der Auslösung von Allergien beteiligt sein. Möglicherweise sind sie einige der Lipidmediatoren, welche Chemotaxis und Migration von Granulozyten induzieren (Traidl-Hoffmann et al., 2002). Aus diesem Grund wurde der absolute Gehalt von Phytoprostanen in Pollen bereits 2000 von R. Imbusch (Imbusch und Mueller, 2000) untersucht. Dazu extrahierten sie Birkenpollen der Spezies *Betula pendula* / *pubescens* mit Diethylether, um so sämtliche enthaltenen Phytoprostane quantitativ zu bestimmen. Dabei wurden in den Pollen an freien PPF₁ 84,7 nmol / g Trockengewicht sowie an veresterten PPF₁ 7,3 nmol / g Trockengewicht gefunden.

Physiologisch relevant sind jedoch nur die Phytoprostanmengen, welche auch durch die Körperflüssigkeiten des Menschen aus den Blütenpollen herausgelöst werden können. Wenn Blütenpollen mit der wässrigen Oberfläche der Bronchien in Berührung kommen, setzen sie zeit-, temperatur-, und pH-abhängig ein Exsudat frei, welches Proteine und Lipide enthält. Darunter sind größere Mengen an Substanzen, welche mit Antikörpern gegen PGE₂ und LTB₄ kreuzreagieren und ein Signal im ELISA-Assay hervorrufen (Behrendt et al., 2001). Allerdings ist bekannt, dass Blütenpollen keine Arachidonsäure und damit keine Prostaglandine enthalten (Mueller, 1998). Dafür enthalten sie aber mit 87 µg/g Frischgewicht substantielle Mengen an Linolensäure (Traidl-Hoffmann et al., 2002), was vermuten lässt, dass sich in den wässrigen Extrakten der Blütenpollen erhebliche Mengen an Phytoprostanen befinden. Die Löslichkeit von Prostaglandinen in wässriger Lösung ist bei 37°C eine Funktion des pH-Werts (Stehle, 1982). Bei physiologischem pH-Wert sind PGE und PGF in Wasser relativ gut löslich: Für PGE₂ beträgt sie bei 25°C bei pH 4,5 ca. 5 mg/ml und steigt dann bei pH 5,3 bis auf 70 mg/ml an. Im Gegensatz dazu steigt die Löslichkeit von PGE₁ erst ab pH 6,8. PGF_{2α} ist etwa eineinhalbmal so gut löslich wie PGE₂. Diese Eigenschaften stellten den Anlass zu den Untersuchungen dar, ob mit einem wässrigen Puffer biologisch relevante Mengen an Phytoprostanen aus Blütenpollen extrahiert werden können. Exemplarisch wurden hier Birkenpollen von *Betula alba* und *Betula verrucosa* untersucht.

Als möglichst körperähnliche Flüssigkeit wurde RPMI-1640-Medium (pH 7,4) verwendet. Die Blütenpollen (30 mg/ml) wurden 30 min in 37°C warmem RPMI-1640-Medium inkubiert, anschließend zentrifugiert (20 min 3,345 g) und sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm). Dieser Extrakt wurde von Dr. Traidl-Hoffmann (Zentrum für Allergie und Umwelt der TU München) hergestellt.

Zu 10 ml dieser Lösung wurden 10 ml gesättigte NaCl-Lösung, 50 µl 1M Citronensäure, 200 µl 0,05 %-ige methanolische Butylhydroxytoluol-Lösung, 20 mg Triphenylphosphin und 100 ng [¹⁸O]-PPE₁ sowie 500 ng [¹⁸O]-PPF₁ gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand (Etherphase) abgenommen. Danach wurde noch 2x mit Diethylether nachextrahiert. Anschließend wurden die vereinigten Etherphasen unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Bestimmung von PPE₁ und PPF₁ wurde der Rückstand über Festphasenextraktion wie folgt aufgearbeitet: Er wurde in Diethylether gelöst und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 6 ml Ether/Essigsäure (98:2, v/v) gewaschen und PPE₁ und PPF₁ mit 9 ml Ether/Methanol/Essigsäure (80:20:2, v/v) gemeinsam eluiert. Diese Fraktion wurde unter Stickstoff getrocknet. Anschließend wurden PPE₁ wie unter IV.1.3.3 beschrieben zu PPB₁ isomerisiert. Um die gebildeten PPB₁ von den PPF₁ abzutrennen, wurde erneut eine Festphasenextraktion auf einer SiOH-SPE-Säule durchgeführt.

Danach wurde die PPB₁-Fraktion unmittelbar zu PFB-TMS-Derivaten umgesetzt. PPF₁ wurden zuerst hydriert, bevor auch sie mit Pentafluorbenzylbromid und BSTFA derivatisiert wurden. Überschüssiges PFB-Br wurde über SiOH-SPE abgetrennt, indem die Proben in Hexan aufgegeben und die Phytoprostane sofort wieder mit Ether/Hexan (2:1, v/v) heruntergespült wurden. Schließlich wurden die Proben per GC/MS im NCI-Modus analysiert (Chromatogramme siehe Abb. 19).

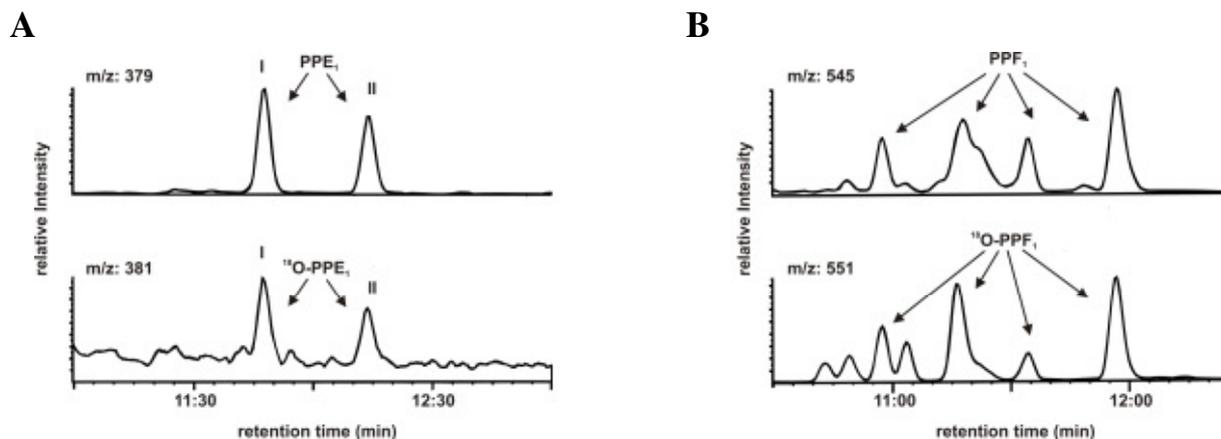


Abb. 18: NCI-GC-MS-Chromatiogramme zur Bestimmung von Phytoprostanen in Birkenpollen (Fa. Allergon).

(A): Bestimmung von PPE₁ nach Konvertierung zu PPB₁ und Überführung zum PFB- und TMS-Derivat; als interner Standard diente [¹⁸O]-PPE₁. (B): Bestimmung von PPF₁ nach Hydrierung und Überführung zum PFB- und TMS-Derivat; als interner Standard wurde [¹⁸O]₃-PPF₁ verwendet. Die jeweils obere Massenspur stellt die endogenen Phytoprostane dar, die untere Massenspur zeigt den internen Standard.

Die erhaltenen Peakflächen wurden jeweils gegen die des internen Standards quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die wässrigen Pollenextrakte erhebliche Mengen an Phytoprostanen enthielten, welche sich im Bereich von mehreren 100 ng pro ml Extrakt bewegten. Die Ergebnisse wurden auf nmol /g Pollen umgerechnet und sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Phytoprostangehalt von wässrigen Extrakten aus Birkenpollen.

	Pollen von <i>Betula alba</i> (Allergon)	Pollen von <i>Betula verrucosa</i> (Sigma)
PPE₁ [nmol/g]	54,30 ± 4,10	64,05 ± 4,99
PPF₁ [nmol/g]	6,85 ± 0,31	14,18 ± 0,31

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD einer Dreifachbestimmung.

Bei diesen beiden Pollenchargen verschiedener Hersteller sind sich nicht nur die Verhältnisse, sondern auch die absoluten Mengen sehr ähnlich. PPE₁ sind hier die häufigsten Phytoprostane und 8-mal häufiger vorhanden als PPF₁. In weiteren Pollen von *Betula alba* dieser Charge wurde von I. Thoma die Summe aus PPA₁ und PPB₁ bestimmt, welche mit 2,40 nmol/g im Vergleich zu den hier gemessenen PPF₁ nur etwa ein Drittel ausmacht (Traidl-Hoffmann et al., 2005). In einem früheren Versuch von I. Thoma (unveröffentlicht) wurden in Pollen von *Betula pendula* (Wildsammlung) nach Extraktion mit Diethylether ~ 483,1 nmol/g PPA₁/B₁, ~ 43 nmol/g PPE₁ und ~ 98 nmol/g PPF₁ gefunden. Hier spiegelt sich die große Schwankungsbreite wieder, die sowohl zwischen einzelnen Bäumen als auch zwischen verschiedenen Arten vorherrscht. Diese bedingt Abweichungen des Phytoprostangehalts der analysierten Pollen um das 16-fache (Traidl-Hoffmann et al., 2005).

IV.1.5 Bestimmung von Phytoprostanen in Speiseölen

IV.1.5.1 Vorkommen von Oxylipinen in Nahrungsmitteln

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind anfällig gegenüber Autoxidation. Auch in Lebensmitteln, die sensorisch noch vollkommen unauffällig sind, finden sich bereits geringe Mengen oxidierter Fettsäuren. Hydroxyfettsäuren sind in den meisten Keimölen und Speisefetten in Konzentrationen von 1-10 µM enthalten (Wilson et al., 2002). Auch im Fleisch verschiedener zubereiteter Burger kamen Hydroperoxide im Bereich von 2-9 nmol/g und Isoprostane F_{2α} im Bereich von 0,2-0,5 pmol/g vor (Gopaul et al.; 2000a).

Daher ist anzunehmen, dass sich unter den in den Nahrungsmitteln gebildeten Oxylipinen auch Phytoprostane befinden. Phytoprostane sind vor allem in pflanzlichen Lebensmitteln zu erwarten, da hauptsächlich diese reich an α-Linolensäure sind. In Blättern verschiedenster Arten konnten bereits geringe Mengen an Phytoprostanen nachgewiesen werden, wo sie vermutlich zum größten Teil in den Membranen der Chloroplasten lokalisiert sind. Beim Trocknen steigen diese Mengen stark an. Phytoprostane werden also im Salat mitverzehrt oder im Tee getrunken, wo sie beim Aufkochen aus den getrockneten Blättern extrahiert werden. Wesentlich mehr Linolensäure als in Blättern ist jedoch in pflanzlichen Speicherfetten aus Frucht und Samen enthalten (Benatti et al., 2004). Diese werden entweder direkt mit den Früchten

oder Samen oder über deren Verwendung als Rohstoff für Speiseöle über Margarine und Pflanzenölen konsumiert. Darin könnten Phytoprostane bereits in der Pflanze und auch später bei der Herstellung oder während der Lagerung gebildet werden. Die Fettsäurezusammensetzung der Pflanzenöle ist artspezifisch. Als linolensäurereiche Speiseöle gelten Leinöl, Sojaöl, Rapsöl und Walnussöl. Leinöl besitzt unter allen Pflanzenölen den höchsten Anteil an Linolensäure: In dessen Fettsäurespektrum sind mehr als 50 Gew.-% Linolensäure (bezogen auf die Gesamtfettsäuren) enthalten. Leinöl ist bekannt für seine hohe Oxidationsanfälligkeit und seine kurze Lagerstabilität (Lukaszewicz et al., 2004). In der Küche darf es deswegen nur als Salatöl und nicht zum Braten benutzt werden. Die Industrie macht sich diese Reaktionsfähigkeit zu Nutze, indem sie Leinöl als Grundlage verschiedener Farben oder diverser Polymere einsetzt.

IV.1.5.2 Bestimmung von Phytoprostanen in Speiseölen

Für diese Untersuchung wurden gezielt Ölsorten ausgewählt, welche einen größeren Anteil an Linolensäure besitzen. Dazu gehört vor allem Leinöl mit einem Linolensäuregehalt von mehr als Gew.-50% (Anteil an den Gesamtfettsäuren), aber auch Sojaöl, Rapsöl und Walnussöl mit Linolensäuregehalten von ca. 10 % gelten als linolensäurereich. Olivenöl (max. 1 % Linolensäure), wurde aufgrund seines besonderen Stellenwerts in der mediterranen Diät sowie seiner herausragenden gesundheitsfördernden Eigenschaften (siehe V.1.4) mit in die Untersuchung aufgenommen.

In dieser Versuchsreihe wurden kaltgepresste (Bio) sowie raffinierte Öle untersucht. Die Bio-Speiseöle sind kaltgepresste Öle, welche nach ihrer Pressung lediglich abfiltriert oder abdekantiert werden dürfen (EG-Verordnung über Speiseöle). Alle anderen Speiseöle werden warm (40°C) gepresst oder extrahiert. Bei der nachfolgenden Raffination werden Lecithin, Schleim und freie Fettsäuren abgetrennt sowie unerwünschte Farbstoffe (v.a. Chlorophyll und Carotinoide) und flüchtige Verbindungen wie Aromastoffe entfernt. Zum Schutz des Verbrauchers vor ranzigem Fett gibt es im deutschen Lebensmittelrecht für Speiseöle eine Obergrenze an freien Fettsäuren (Maß für den mikrobiellen Verderb). Auch die Peroxide, die zur Bestimmung des autoxidativen Verderbs sowie zur Bestimmung der Lagerstabilität herangezogen werden, dürfen einen bestimmten Grenzwert nicht überschreiten.

Außer in der Küche als Salatöl oder zum Kochen, Braten, Frittieren und Backen, werden Öle auch zur parenteralen Ernährung verwendet. Patienten mit Trauma oder nach schweren operativen Eingriffen können Stoffwechselstörungen entwickeln, wobei sie Fette besser metabolisieren können als Glucose (Schmitt, 2000). Dabei werden Erwachsenen üblicherweise pro Tag 1-2 g Fett / kg Körpergewicht infundiert. 1961 wurde von Wretling eine sichere, gut verträgliche intravenöse Fettemulsion (Intralipid®) entwickelt, welche für eine breite klinische Anwendung geeignet ist. Das in dieser Arbeit verwendete Intralipid® besteht aus einer 30 %igen (w/v) Emulsion aus Sojaöl, welche mit Phosphatidylcholin stabilisiert und mit Glycerin auf Blutisotonie eingestellt wird. Vertrieben wird das Medizinprodukt weltweit von der Firma Fresenius-Kabi.

Die Speiseöle, die Margarine sowie das Intralipid wurden auf ihren Gehalt an freien und gesamten Phytoprostanen hin untersucht. Dabei waren die Phytoprostane PPD₁, PPE₁ und PPF₁ sowie die Cyclopentenone PPA₁, PPB₁ und dPPJ₁ von Interesse. Nachfolgend sind die dabei angewandten Methoden zur Bestimmung von freien und veresterten Phytoprostanen sowie der Analytik der einzelnen Phytoprostanenklassen aufgeführt.

Zur Bestimmung von freien Phytoprostanen wurden ca. 200 mg der Öle den trockenen internen Standards zugemischt und mit 300 μ l Diethylether verdünnt direkt auf eine NH_2 -SPE-Säule (Elutionsschritte siehe IV.1.1) aufgegeben. Die weitere Aufarbeitung und Quantifizierung erfolgte wie in den Kapiteln IV.1.2 bis IV.1.4 angegeben.

Im Falle des Intralipids und der Soja-Margarine (Sojola) wurden die Lipide vorher mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und von der wässrigen Phase abgetrennt. Dafür wurden 660 μ l Intralipid bzw. 200 mg Sojola mit 3 ml Wasser, einer Spatelspitze TPP und 400 μ l BHT 5 % (w/v) in Methanol versetzt und mit 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Nach Zugabe der internen Standards wurden die Phytoprostane dreimal mit jeweils 3 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt, und der Extrakt zur Trockene gebracht. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über NH_2 -SPE (s.o.).

Veresterte Phytoprostane wurden enzymatisch mit einer Lipase (III.2.1) hydrolysiert. Zur Kontrolle auf Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse wurden zusätzlich noch die gesamten PPF_1 nach alkalischer Hydrolyse (III.2.2) bestimmt. Die Bestimmung anderer Phytoprostanklassen nach alkalischer Hydrolyse ist nicht möglich, da diese im Alkalischen instabil sind: PPD_1 und dPPJ_1 werden zersetzt und PPA_1 und PPE_1 isomerisieren zu PPB_1 . Zur Bestimmung von PPD_1 , dPPJ_1 , PPE_1 und PPF_1 wurden die Proben direkt nach der Hydrolyse auf eine SiOH -SPE (IV.1.1) aufgegeben.

Ein repräsentatives LC/MS-Chromatogramm zur Bestimmung von dPPJ_1 bzw. PPD_1 ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Die Isolierung von freien dPPJ_1 und PPD_1 aus den Speiseölen lieferte relativ saubere Extrakte und ermöglichte eine sichere Quantifizierung. Die Bestimmung veresteter dPPJ_1 und PPD_1 hingegen war in diesen Proben nur sehr schwer möglich, da die hierbei angewandte Festphasenextraktion eine Fraktion lieferte, welche immer noch leicht ölig war. Diese Unsauberkeit spiegelte sich auch in den LC/MS-Chromatogrammen wieder, die oft keine klar abgetrennten Peaks lieferten. Aus diesem Grund konnten die veresterten dPPJ_1 und PPD_1 nicht quantifiziert werden. In den nachfolgenden Tabellen ist jeweils die Quantifizierungsgrenze angegeben, d.h. die endogenen Gehalte an dPPJ_1 liegen darunter.

Eine ähnliche Schwierigkeit stellte sich bei der Aufreinigung von PPA_1 und PPB_1 ein. Dieses Problem konnte jedoch gelöst werden, indem der Großteil der vorhandenen unpolaren Verbindungen bei pH 3 mit Hexan ausgeschüttelt wurde. Dazu wurde der Lipaseansatz nach dem Ansäuern zunächst mit 15 ml Hexan extrahiert. Die Hexanphase, in der sich u.a. sämtliche öligen sowie alle farbigen Inhaltsstoffe befanden, wurde verworfen. Danach wurden der Wasserphase die internen Standards PGA_1 bzw. PGB_1 hinzugegeben und die Phytoprostane (und Prostaglandine) mit 15 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde getrocknet und über eine SiOH -SPE aufgereinigt. Der sich hierbei ergebende Rückstand enthielt keine optisch sichtbaren öligen Komponenten mehr. Die $\text{PPA}_1/\text{PPB}_1$ enthaltende Fraktion wurde methoximiert und anschließend mit Pentafluorbenzylbromid und BSTFA verestert (III.2). Die so hergestellte Probelösung erwies sich auch in der anschließenden GC/MS-Analytik als relativ sauber.

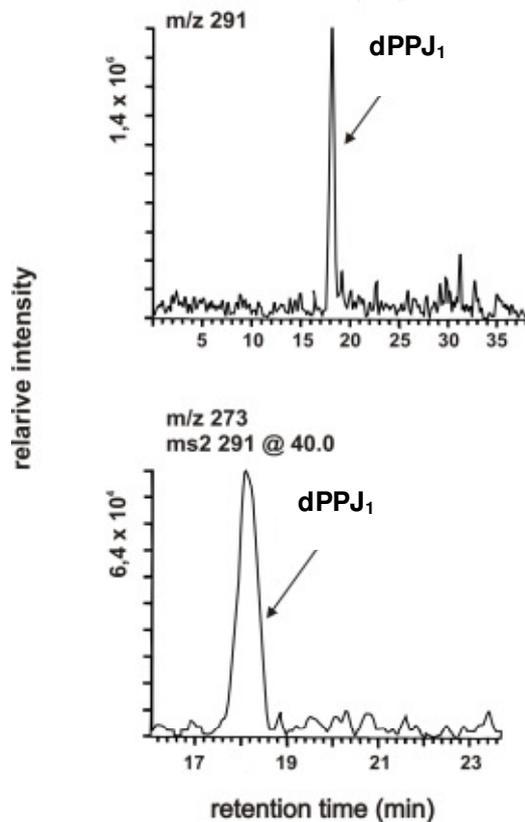
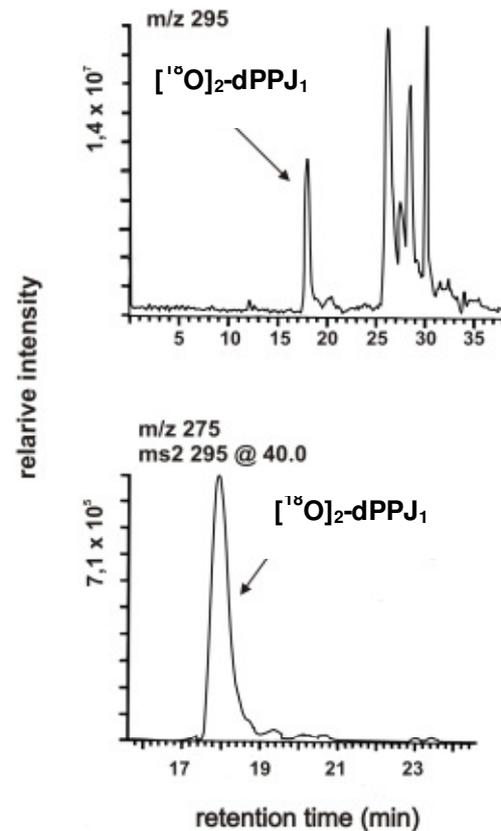
A**B**

Abb. 19: Freie dPPJ₁ in Bio-Sojaöl. Das obere Chromatogramm zeigt jeweils das normale MS¹-Ionen-Chromatogramm von dPPJ₁ bzw. [¹⁸O]₂-dPPJ₁. Unten ist das Chromatogramm dargestellt, welches durch MS/MS der isolierten Verbindungen mit den Massen der jeweiligen Analyten (m/z 291 für dPPJ₁ und m/z 295 für [¹⁸O]₂-dPPJ₁) erhalten wurde.

(A): Peaks von endogenem dPPJ₁. (B): Peaks vom internen Standard [¹⁸O]₂-dPPJ₁.

In einem separaten Versuch wurde die Extraktion von PGB₁ im Vergleich zu PPB₁ mit Hexan überprüft. Dazu wurden 6 ml Wasser mit Citronensäure auf pH 3 angesäuert und 500 ng PPB₁ bzw. PGB₁ hinzugegeben. Diese Lösung wurde mit 3 ml Hexan und anschließend mit 3 ml Ethylacetat extrahiert. Beiden Extrakten wurde jeweils 500 ng PGB₁ bzw. PPB₁ hinzugefügt. Diese Mischungen wurden derivatisiert und die Prostaglandine bzw. Phytoprostane der einzelnen Extraktionsphasen quantifiziert. Die ganze Prozedur wurde 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass beide Verbindungen, obwohl sie sich nur in der Länge der Seitenkette um 2 Methylengruppen unterscheiden, eine stark unterschiedliche Tendenz aufweisen, in Hexan extrahiert zu werden. PGB₁ geht unter den angewandten Bedingungen zu durchschnittlich $45,7 \pm 3,5$ % in Hexan, wohingegen PPB₁ nur zu durchschnittlich $6,8 \pm 1,4$ % extrahiert wird. Deshalb wurde in der beschriebenen Methode der Standard erst nach der Extraktion mit Hexan zugesetzt. Der durch die Hexan-Extraktion auftretende Verlust an Phytoprostanen ist so gering, dass er vernachlässigt werden kann.

Für PPE₁ und PPF₁ wurde mit der in Abschnitt IV.2.1 beschriebenen Methode eine gute Reinigung erzielt und die Proben konnten problemlos ins GC/MS injiziert werden. Repräsentative GC/MS-Chromatogramme zur Bestimmung von PPA₁, PPB₁, PPE₁ und PPF₁ aus Leinöl sind in der Abbildung 20 dargestellt.

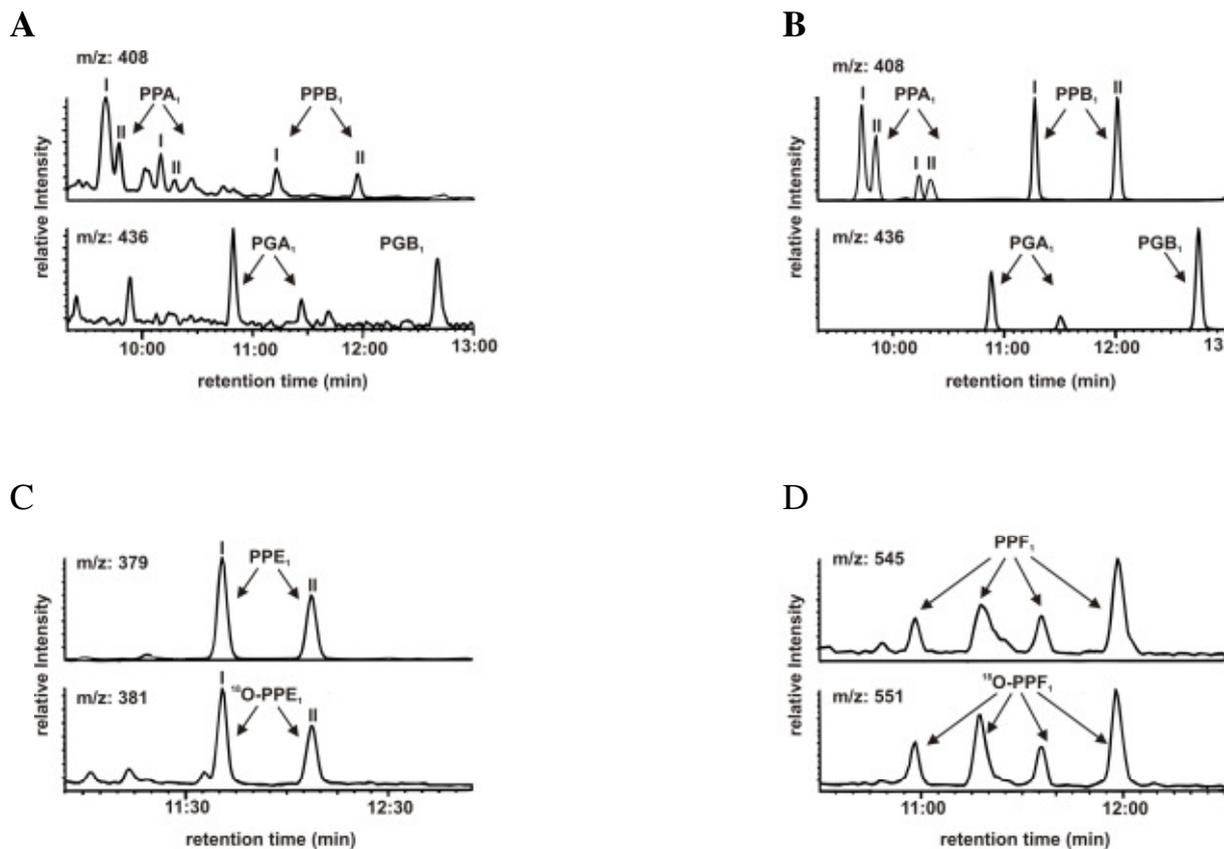


Abb. 20: GC-NCI-MS-Chromatogramme zur Bestimmung der Phytoprostane in Leinöl. In allen Chromatogrammen zeigt die obere Massenspur die Analyten und die untere die dazugehörigen internen Standards. Die Bezeichnung über den Peaks gibt den jeweiligen Regioisomeren-Typ (I oder II) an.
A: PPA₁/PPB₁ wurden zur Bestimmung in die Methoxime sowie in die PFB- und TMS-Derivate überführt; als interne Standards wurden PGA₁ und PGB₁ verwendet. **B:** Peakmuster derivatisierter Referenzsubstanzen von PPA₁, PPB₁, PGA₁ und PGB₁ bei Detektion im GC/MS. **C:** Bestimmung von PPE₁ nach Konvertierung zu PPB₁ und Überführung zum PFB- und TMS-Derivat; als interner Standard diente [¹⁸O]-PPE₁. **D:** Bestimmung von PPF₁ nach Hydrierung und Überführung zum PFB- und TMS-Derivat; als interner Standard wurde [¹⁸O]₃-PPF₁ verwendet.

Wie in Abbildung 20 ersichtlich, ermöglichten die jeweils angewandten Methoden eine gute Abtrennung der Phytoprostane von den übrigen Begleitstoffen aus den Ölen. Dabei wurden GC/MS-Chromatogramme erhalten, in denen sich die Phytoprostane gut integrieren und quantifizieren ließen. Wie zu erwarten, kamen bei den A₁-, B₁- und E₁-Phytoprostanen die beiden Regioisomere Typ I und II in gleicher Häufigkeit vor. Ebenso war das Peakmuster der einzelnen PPF₁-Isomere bei den Peaks der PPF₁ aus autoxidierter freier Linolensäure ([¹⁸O]-markierter Standard) und bei den Peaks der veresterten PPF₁ aus dem Leinöl identisch.

IV.1.5.3 Phytoprostan-Gehalt verschiedener Speiseöle

Im Folgenden werden die gefundenen Phytoprostane für jedes Öl einzeln dargestellt. Dabei sind alle Ergebnisse Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung. Phytoprostangehalte, welche unterhalb der Quantifizierungsgrenze lagen, wurden mit „<“ gekennzeichnet.

Leinöl

Leinöl enthält durchschnittlich 51-56 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 1613-1771 mmol/l entspricht.

Tab. 5: Phytoprostangehalt von rohem Leinöl

	PPD ₁ [μmol/l]	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPA ₁ [μmol/l]	PPB ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
frei	1,00 \pm 0,46	< 0,03	2,72 \pm 0,42	0,76 \pm 0,16	4,60 \pm 0,88	16,84 \pm 3,11
gesamt ^a	0,03 \pm 0,00	< 0,03	21,91 \pm 0,42	7,76 \pm 1,85	13,57 \pm 0,66	33,50 \pm 5,08
gesamt ^b	–	–	–	–	–	42,03 \pm 3,02

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm SD.

Das untersuchte Leinöl war nicht nur das Öl mit dem höchsten Linolensäure-Gehalt, sondern es enthielt auch die meisten Phytoprostane. Insgesamt war ca. 0,005 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden.

Sojaöl raffiniert

Sojaöl enthält durchschnittlich 5,0-9,5 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 156-297 mmol/l entspricht.

Tab. 6: Phytoprostangehalt von raffiniertem Sojaöl

	PPD ₁ [μmol/l]	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPA ₁ [μmol/l]	PPB ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
frei	0,05 \pm 0,02	< 0,03	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	1,07 \pm 0,77	0,44 \pm 0,44
gesamt ^a	–	< 1,38	2,28 \pm 0,70	0,53 \pm 0,18	66,42 \pm 0,6	11,84 \pm 0,01
gesamt ^b	–	–	–	–	–	12,17 \pm 2,49

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm SD.

Insgesamt war ca. 0,040 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Obwohl Sojaöl nur ein Viertel des Linolensäure-Gehalts von Leinöl enthält, befanden sich darin wesentlich mehr PPE₁ als im Leinöl. Bemerkenswerterweise war das Verhältnis von PPE₁ zu PPF₁ im Lein- und Sojaöl umgekehrt: Im Leinöl überwogen die PPF₁; Sojaöl hingegen enthielt mehr PPE₁ als PPF₁.

Bio-Sojaöl Fa. Vitaquell

Das hier untersuchte Bio-Sojaöl der Firma Vitaquell enthielt gemäß der Angabe auf der Verpackung 8,0 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 250 mmol/l entspricht.

Tab. 7: Phytoprostangehalt von Bio-Sojaöl der Firma Vitaquell

	PPD ₁ [µmol/l]	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPA ₁ [µmol/l]	PPB ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
frei	0,28 ± 0,15	0,19 ± 0,06	0,42 ± 0,04	0,15 ± 0,02	6,84 ± 0,35	5,50 ± 0,26
gesamt ^a	–	0,25	4,09 ± 1,47	1,97 ± 0,72	11,55 ± 1,10	5,66 ± 0,40
gesamt ^b	–	–	–	–	–	8,87 ± 0,12

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war ca. 0,010 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Die im Bio-Sojaöl gebildeten PPE₁ und PPF₁ lagen überraschenderweise fast alle frei vor. Dies galt allerdings nicht für PPA₁ und PPB₁, welche zum größten Teil verestert vorkamen.

Bio-Sojaöl Fa. Noel

Das zweite getestete Bio-Sojaöl (Firma Noel) enthielt gemäß der Angabe auf der Verpackung 7,5-8,5 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 235-266 mmol/l entspricht.

Tab. 8: Phytoprostangehalt von Bio-Sojaöl der Firma Noel

	PPD ₁ [µmol/l]	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPA ₁ [µmol/l]	PPB ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
frei	–	–	–	–	1,33 ± 0,21	3,25 ± 0,18
gesamt ^a	–	–	–	–	5,38 ± 0,28	3,57 ± 0,34
gesamt ^b	–	–	–	–	–	4,03 ± 0,28

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war mind. 0,004 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Dieses Bio-Sojaöl lag im Verhältnis der Werte für PPE₁ und PPF₁ ähnlich wie das erste, wobei jedoch der Gesamtgehalt an PPE₁ und PPF₁ beim Bio-Sojaöl der Firma Vitaquell doppelt so hoch wie in dem der Firma Noel war. Allerdings enthielt letzteres wesentlich weniger freie PPE₁.

Intralipid

Intralipid ist eine Emulsion von 30g hochgereinigtem Sojaöl in 100 ml Wasser. In seinem Fettanteil befinden sich ca. 8,0 g Linolensäure pro 100g, das heißt die Linolensäurekonzentration des gesamten Produkts beträgt ~ 82 mmol/l.

Tab. 9: Phytoprostangehalt von Intralipid

	PPD ₁ [µmol/l]	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPA ₁ [µmol/l]	PPB ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
frei	0,13 ± 0,02	< 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,75 ± 0,22	< 0,12
gesamt^a	< 0,15	< 0,39	0,80 ± 0,16	0,28 ± 0,10	1,51 ± 0,20	0,32 ± 0,05
gesamt^b	–	–	–	–	–	0,71 ± 0,03

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war ca. 0,004 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Die hier angegebenen Werte beziehen sich auf das gesamte Volumen der Emulsion. Absolut gesehen befanden sich im Intralipid sich weniger Phytoprostane als im normalen Sojaöl.

Soja-Margarine “Sojola“

Bei einer Margarine handelt es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion, wobei die wässrige Phase mit Citronensäure angesäuert ist. Diese Sojamargarine enthält gehärtetes und nichtgehartetes Sojaöl in unbekanntem Anteilen. Deshalb kann hier auch keine Aussage über den Linolensäuregehalt gemacht werden.

Tab. 10: Phytoprostangehalt von Sojola

	PPD ₁ [µmol/kg]	dPPJ ₁ [µmol/kg]	PPA ₁ [µmol/kg]	PPB ₁ [µmol/kg]	PPE ₁ [µmol/kg]	PPF ₁ [µmol/kg]
frei	–	–	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,01	4,81 ± 1,58	0,44 ± 0,30
gesamt^a	–	–	3,70 ± 0,64	3,20 ± 0,07	8,18 ± 0,41	0,67 ± 0,24
gesamt^b	–	–	–	–	–	3,96 ± 1,00

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Auch die Margarine enthielt mit durchschnittlich einigen $\mu\text{mol/kg}$ eine beachtliche Menge an Phytoprostanen. Interessanterweise waren darunter relativ viele A₁- und B₁-Phytoprostane.

Rapsöl

Rapsöl enthält durchschnittlich 51-56 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 1671-1773 mmol/l entspricht.

Tab. 11: Phytoprostangehalt von raffiniertem Rapsöl

	PPD ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	dPPJ ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPA ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPB ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPE ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPF ₁ [$\mu\text{mol/l}$]
frei	–	< 0,03	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	< 0,56	0,15 ± 0,01
gesamt ^a	–	–	0,29 ± 0,09	0,07 ± 0,05	4,44 ± 1,74	0,45 ± 0,04
gesamt ^b	–	–	–	–	–	0,46 ± 0,01

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war ca. 0,002 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Damit enthielt das untersuchte Rapsöl zwar ebenso viel Linolensäure wie das Sojaöl, überraschenderweise aber kaum Phytoprostane.

Bio-Rapsöl

Das hier untersuchte Bio-Rapsöl enthielt gemäß der Angabe auf der Verpackung 9,0 g Linolensäure pro 100g, was einer Linolensäure-Konzentration von 282 mmol/l entspricht.

Tab. 12: Phytoprostangehalt von Bio-Rapsöl

	PPD ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	dPPJ ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPA ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPB ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPE ₁ [$\mu\text{mol/l}$]	PPF ₁ [$\mu\text{mol/l}$]
frei	–	< 0,02	0,21 ± 0,06	0,03 ± 0,01	0,52 ± 0,07	0,94 ± 0,18
gesamt ^a	–	–	1,14 ± 0,44	0,32 ± 0,09	2,58 ± 0,39	1,06 ± 0,19
gesamt ^b	–	–	–	–	–	1,19 ± 0,03

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war im Bio-Rapsöl ca. 0,002 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Auch hier war wie beim Sojaöl die Tendenz zu beobachten, dass das nichtraffinierte Öl verhältnismäßig mehr freie E₁- und F₁-Phytoprostane enthält als das raffinierte Öl.

Walnussöl

Walnussöl enthält durchschnittlich 9,0-15,0 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 282-469 mmol/l entspricht. Walnussöl enthält damit also etwa gleich viel Linolensäure wie Soja- und Rapsöl.

Tab. 13: Phytoprostangehalt von raffiniertem Walnussöl

	PPD ₁ [µmol/l]	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPA ₁ [µmol/l]	PPB ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
frei	–	< 0,02	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,03	< 0,06	0,18 ± 0,07
gesamt ^a	–	–	0,88 ± 0,36	0,25 ± 0,02	12,51 ± 1,35	1,80 ± 0,08
gesamt ^b	–	–	–	–	–	1,87 ± 0,11

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war ca. 0,005 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Im Phytoprostangehalt lag es dementsprechend zwischen dem hier untersuchten Soja- und Rapsöl. Dabei fiel das Walnussöl vor allem durch seinen relativ hohen Anteil an PPE₁ auf, welches hier auch mit Abstand das häufigste Phytoprostan war.

Natives Olivenöl Fa. Brändle

Olivenöl enthält durchschnittlich 0,05-0,9 g Linolensäure pro 100g, was einer Linolensäure-Konzentration von 2-28 mmol/l entspricht.

Tab. 14: Phytoprostangehalt von nativem Olivenöl der Firma Brändle

	PPD ₁ [µmol/l]	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPA ₁ [µmol/l]	PPB ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
frei	< 0,01	< 0,02	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,74 ± 0,28	2,46 ± 0,22
gesamt ^a	–	< 0,18	0,27 ± 0,10	0,12 ± 0,05	3,41 ± 1,88	3,51 ± 0,82
gesamt ^b	–	–	–	–	–	7,72 ± 0,58

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war ca. 0,055 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Obwohl Olivenöl nur max. 1 % Linolensäure enthält, wurden in ihm relativ viele E₁- und F₁-Phytoprostane gefunden. Dafür konnten nur geringe Mengen PPA₁ oder PPB₁ detektiert werden.

Natives Olivenöl Fa. Lesieur

Bei diesem Olivenöl ist mit den gleichen Linolensäure-Gehalten zu rechnen wie beim vorherigen Olivenöl.

Tab. 15: Phytoprostangehalt von nativem Olivenöl der Firma Lesieur

	PPD ₁ [μmol/l]	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPA ₁ [μmol/l]	PPB ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
frei	–	–	–	–	0,34 ± 0,18	10,22 ± 1,49
gesamt ^a	–	–	–	–	1,53 ± 0,09	10,33 ± 1,29
gesamt ^b	–	–	–	–	–	14,75 ± 1,31

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Hier war insgesamt mind. 0,089 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Dennoch unterschied sich dieses Olivenöl deutlich von dem Produkt des anderen Herstellers, da es im Vergleich doppelt so viele PPF₁ aber nur die Hälfte der PPE₁ enthielt. Mit seinem großen Gehalt an PPF₁ steht es an zweiter Stelle der getesteten Öle.

Traubenkernöl

Traubenkernöl enthält durchschnittlich 0,05-1,0 g Linolensäure pro 100 g, was einer Linolensäure-Konzentration von 2-31 mmol/l entspricht. Damit liegt es in der gleichen Größenordnung wie Olivenöl.

Tab. 16: Phytoprostangehalt von raffiniertem Traubenkernöl

	PPD ₁ [μmol/l]	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPA ₁ [μmol/l]	PPB ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
frei	–	–	–	–	< 0,14	< 0,07
gesamt ^a	–	–	–	–	0,74 ± 0,40	0,30 ± 0,08
gesamt ^b	–	–	–	–	–	0,27 ± 0,03

Aufgeführt sind die freien Phytoprostane, die gesamten Phytoprostane nach Hydrolyse mit Lipase (gesamt^a) sowie die gesamten PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse (gesamt^b). Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war mind. 0,007 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Vom absoluten Phytoprostan-Gehalt her entsprach das Traubenkernöl folglich den Erwartungen: Es enthält nur Spuren von Linolensäure (<1 %), dementsprechend wurden auch nur sehr geringe Mengen an Phytoprostanen gefunden.

„Natürliche Linolensäure“

Zum Vergleich wurden auch die Werte von PPE₁ und PPF₁ in technischer Linolensäure bestimmt. Dazu wurde eine Chemikalie der Firma Sigma verwendet, welche als „natürliche Linolensäure“ bezeichnet wurde und zu 70 % aus Linolensäure, ~ 25 % aus Linolsäure und ~ 3 % aus Ölsäure bestand. Die Linolensäure-Konzentration betrug hier folglich ~ 2176 mmol/l.

Tab. 17: Phytoprostangehalt von natürlicher Linolensäure

	PPD ₁ [μmol/l]	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPA ₁ [μmol/l]	PPB ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
frei	–	–	–	–	10,31 ± 0,69	74,20 ± 11,86

Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Insgesamt war mind. 0,004 % der Linolensäure zu Phytoprostanen oxidiert worden. Erwartungsgemäß hatten sich deutlich mehr F₁-Phytoprostane als E₁-Phytoprostane gebildet.

Die untersuchten Speiseöle enthielten relativ hohe Mengen an PPF₁ und PPE₁, welche sich im Bereich von 0,3 bis 66 μmol/l befanden. Auch Phytoprostane A₁ und B₁ waren in den Pflanzenölen vorhanden, mit Gehalten von 0,07 bis 23 μmol/l jedoch in wesentlich geringeren Mengen als PPE₁ und PPF₁. Wie zu erwarten, kamen die beiden Regioisomere (Typ I und II) in annähernd gleichen Mengen vor (Abb. 20). PPD₁ und dPPJ₁ konnten häufig gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen in den Ölen detektiert werden. Freie PPD₁ konnten in Leinöl, Sojaöl, Olivenöl und Intralipid nachgewiesen werden, wobei Leinöl mit ~ 1 μmol/l den größten Gehalt aufwies. Freie dPPJ₁ hingegen wurden nur im Bio-Sojaöl der Firma Vitaquell gefunden, in welchem der Gehalt an freien dPPJ₁ 0,19 μmol/l betrug. Die Gesamtmengen an PPD₁ und dPPJ₁ waren wie oben erwähnt nicht quantifizierbar, jedoch kann man sagen, dass sie äußerst gering sind und in keinem der untersuchten Öle eine Konzentration von 1,5 μmol/l überschreiten.

Die äußerst geringen Mengen an dPPJ₁ in den Ölen könnten mit der geringen Stabilität dieser Phytoprostanklasse zusammenhängen. In einem Versuch wurde die Stabilität von dPPJ₁ überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass dPPJ₁ bei Raumtemperatur und Licht relativ instabil sind. Wurde in Acetonitril gelöster dPPJ₁-Standard 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert, waren am Ende dieser Zeit nur noch ~ 38 % der Ausgangsmenge vorhanden. Eine noch drastischere Situation ergibt sich bei Anwesenheit von Licht und wässrigen Lösungsmitteln: Nach 8 Stunden Inkubation in einer Mischung aus 52 % Wasser, 17 % Methanol, 21 % Acetonitril, 5 % Tetrahydrofuran sowie 0,01 % Essigsäure bei diffusem Tageslicht, konnte hinterher nur noch ~ 44 % der ursprünglichen Ausgangsmenge an dPPJ₁ wiedergefunden werden. Es ist also gut möglich, dass PPD₁ und dPPJ₁ in den Ölen gebildet wurden, aber aufgrund ihrer geringen Stabilität gleich wieder weiterreagierten. Auch eine Zersetzung der PPD₁ und dPPJ₁ beim Lipaseansatz kann trotz Lichtabschluss nicht ausgeschlossen werden.

Effektivität der Hydrolyse veresterter Phytoprostane durch Lipase

Die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse kann durch einen Vergleich mit den Ergebnissen aus der alkalischen Hydrolyse abgeschätzt werden. Die alkalische Hydrolyse sollte unter den hier angewandten Bedingungen quantitativ verlaufen und deshalb sollten die damit gefundenen Mengen an PPF₁ im Öl in etwa den tatsächlich enthaltenen Mengen entsprechen. Um die Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse zu erhalten, wurde das Öl sowohl enzymatisch als auch in einem separaten Versuch alkalisch hydrolysiert. Danach wurden die gesamten PPF₁ quantifiziert und die jeweils gemessenen Mengen an gesamten PPF₁ miteinander verglichen. In Tabelle 16 ist das Verhältnis der PPF₁-Mengen des enzymatischen Ansatzes zu dem des alkalischen Ansatzes in Prozent angegeben.

Tab. 18: Effektivität der enzymatischen Hydrolyse veresterter PPF₁

	% gesamte PPF₁ erhalten durch enzymatische Hydrolyse
Leinöl	79,7
Sojaöl	97,3
Bio-Sojaöl (Vitaquell)	63,9
Sojaöl (Emile Noel)	88,7
Intralipid	44,4
Sojola	16,9
Rapsöl	97,2
Bio-Rapsöl	89,8
Olivenöl (Brändle vita)	45,4
Olivenöl (Lesieur)	70,0
Walnussöl	95,9
Traubenkernöl	109,3
Mittelwert	80,1

Angegeben ist der Anteil an enzymatisch hydrolysierbaren veresterten PPF₁ als Prozentwert von den durch alkalische Hydrolyse des Öls erhaltenen gesamten PPF₁ (= 100 %).

Durch die Schweinepankreaslipase wurden innerhalb einer Stunde im Vergleich zur alkalischen Hydrolyse durchschnittlich 80 % der PPF₁ hydrolysiert. Dabei fällt auf, dass die raffinierten Öle (Sojaöl, Rapsöl und Traubenkernöl) zu fast 100 % durch das Enzym hydrolysiert werden, wohingegen die Lipide der naturbelassenen Öle lediglich zu 45-90 % freigesetzt werden. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass die Pankreas-Lipase in erster Linie Triacylglyceride hydrolysiert. In natürlichem Öl sind zusätzlich noch geringe Mengen an Phospho- und Glykolipiden enthalten, welche bei der Raffination der Rohöle abgetrennt werden. Intralipid und die Soja-Margarine hingegen enthalten zugesetzte Phospholipide (z.B. Soja-Lecithin) als Emulgatoren, die auf alkalischem Wege vermutlich quantitativ hydrolysiert werden.

Zusammenhang zwischen Linolensäuregehalt, Vitamin E-Gehalt und Phytoprostanbildung

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 18) sind die Linolensäure- und Vitamin E (α -Tocopherol)-Gehalte im Vergleich zu den insgesamt gefundenen Phytoprostanen (Summe aus freien und veresterten PPA₁, PPB₁, PPE₁, PPF₁) der einzelnen Öle aufgeführt.

Tab. 19: Gehalt an Linolensäure, α -Tocopherol und Phytoprostanen (Summe der Klassen A, B, E und F) in Speiseölen.

	Linolensäure [g / 100g]	Vitamin E [mg / 100g]	Phytoprostane [μ g/g Öl]	zu Phytoprostanen oxidierte Linolensäure Gew.-[%]
Linolensäure (Sigma)	70 ^V	—	101,17 \pm 15,03	0,004
Leinöl	56,0 - 51,0 ^L	11 - 28 ¹	26,43 \pm 2,78	0,005
Sojaöl (Brändle vita)	5,0 - 9,5 ^L	15 ^V	28,73 \pm 0,36	0,040
Bio-Sojaöl (Vitaquell)	8 ^V	9 - 18 ¹	8,15 \pm 1,27	0,010
Sojaöl (Emile Noel)	7,5 - 8,5 ^V	10 - 15 ^V	3,19 \pm 0,22	0,004
Intralipid	8 ²	36 ³	3,10 \pm 0,54 *	0,004
Sojola		30 ^V	4,02 \pm 0,35 **	
Rapsöl (Brändle vita)	6,4 - 14,1 ^L	20 ^V	1,86 \pm 0,68	0,002
Bio-Rapsöl (Biovit)	9 ^V	20 ^V	1,79 \pm 0,39	0,002
Walnussöl	9,0 - 15,0 ^L	10 ^V	5,46 \pm 0,63	0,005
Olivenöl (Brändle vita)	\leq 0,05 - 0,9 ^L	12 ^V	2,59 \pm 1,01	0,055
Olivenöl (Lesieur)	\leq 0,05 - 0,9 ^L	3 - 8 ¹	4,23 \pm 0,49	0,089
Traubenkernöl	\leq 0,05 - 1,0 ^L	4 - 31 ⁴	0,37 \pm 0,17	0,007
* bez. auf 1g reines Öl in der Emulsion				
** bez. auf 1g reines Öl (= 80 % des fertiges Produkts)				

Die Werte für Linolensäure und Vitamin E sind entweder auf der Verpackung deklariert (V) oder geben Durchschnittswerte der frischen Öle wieder, wie sie in der Literatur (1-4) zu finden sind. 1 = Margarine Institut, 2 = Wanten et. al., 2000; 3 = Wanten et al., 2002; 4 = Beveridge et. al., 2005. Die Werte für den Linolensäuregehalt entstammen großenteils der Tabelle mit Durchschnittswerten, die im dt. Lebensmittelrecht in den Leitsätzen für Speisefette und Speiseöle aufgeführt ist (L).

Allerdings korreliert der Linolensäure-Gehalt nur wenig mit dem Phytoprostangehalt. Bezüglich der Gesamtmenge an Phytoprostanen liegt Leinöl (> 50 %) gleichauf mit Sojaöl (< 10 %). Im Gegensatz dazu enthielt das Rapsöl (6-14 %) nicht mal ein Zehntel der Phytoprostanmengen des Sojaöls. In Olivenöl konnten trotz des geringen Linolensäuregehalts (\leq 1 %) erhebliche Mengen an Phytoprostanen gefunden werden, ~welche doppelt so hoch wie im Rapsöl lagen. Traubenkernöl (\leq 1 %) besitzt erwartungsgemäß fast keine Phytoprostane. Der Anteil an zu Phytoprostanen oxidierte Linolensäure schwankt in der Regel zwischen 0,002 und 0,007 Gew.-%. Lediglich die beiden Olivenöle stellen mit 0,055 bzw. 0,089 Gew.-% eine Ausnahme dar, bei der ein deutlich größerer Anteil an Linolensäure zu Phytoprostanen umgesetzt wurde.

Auch mit der Menge an im Öl vorhandenem Vitamin E kann keine Korrelation hergestellt werden. Dies zeigt sich vor allem bei den starken Unterschieden von raffiniertem Sojaöl und Bio-Sojaöl, welche zwar gleichen Gehalt an Linolensäure und Vitamin E besitzen, aber sich in einer Vielzahl an anderen Substanzen unterscheiden, die im raffinierten Öl entfernt wurden. Hier wird deutlich, dass neben Vitamin E noch andere Pro- und Antioxidantien eine wichtige Rolle bei der Autoxidation spielen. Anhand der beiden Olivenöle kann man erkennen, dass es dabei nicht nur auf die Zusammensetzung allein ankommt. Diese beiden Öle sind nicht nur in der Menge an Phytoprostanen stark unterschiedlich, sondern zeigen auch beide ein völlig anderes Verhältnis der einzelnen Phytoprostanklassen zueinander. Dies macht deutlich, dass vor allem der Herstellungsprozess und die Lagerungsbedingungen einen Einfluss auf die Autoxidation haben.

Verhältnis von freien zu veresterten Phytoprostanen

Weiterhin ist bemerkenswert, dass die in den Bio-Speiseölen gefundenen PPE₁ und PPF₁ zum großen Teil als freie Phytoprostane vorlagen. Dies steht in keinem Verhältnis zu den im Öl enthaltenen freien Fettsäuren, denn diese sollten weniger als 2 % betragen. Im deutschen Lebensmittelrecht gibt es Grenzwerte, welche die in Speiseölen enthaltenen freien Fettsäuren limitieren. Über die erlaubte Säurezahl (SZ), eine chemische Kennzahl aus der Fettanalytik, ist der jeweils zulässige Anteil an freien Fettsäuren festgelegt.

Nach deutschem Lebensmittelrecht erlaubte Höchstgehalte an freien Fettsäuren in Speiseölen:

raffinierte Pflanzenöle:	SZ erlaubt bis zu 0,6 (d.h. $\leq 0,3$ % freie Fettsäuren)
	SZ normalerweise $< 0,2$ (d.h. $\leq 0,1$ % freie Fettsäuren)
native Pflanzenöle:	SZ erlaubt bis zu 4,0 (d.h. $\leq 2,0$ % freie Fettsäuren)
rohe Pflanzenöle:	SZ 1 bis 10 (d.h. 0,5 bis 4,9 % freie Fettsäuren)

Damit kann man sagen, dass in den Ölen bedeutend mehr freie Phytoprostane gefunden wurden, als frei vorliegende Linolensäure vorhanden war. Dies bedeutet, dass entweder freie Fettsäuren in den Ölen schneller oxidieren oder oxidierte Lipide bei der Gewinnung oder Lagerung oxidiert werden.

Gebildete Phytoprostanklassen

In Abbildung 22 sind die Verhältnisse der gebildeten Phytoprostanklassen abgebildet. Im Bezug auf die gebildeten Phytoprostanklassen kann man sagen, dass bei manchen Ölen PPF₁ (Leinöl und Olivenöle) und bei anderen PPE₁ (Sojaöle, Rapsöle, Traubenkernöl) die am häufigsten vorkommenden Phytoprostane waren. Auch zwischen PPE₁, PPA₁ und PPB₁, welche bedingt durch ihre Bildung voneinander abhängig sein sollten, konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

Normalerweise werden in unpolaren Medien, wie es hier im Öl der Fall ist, vorzugsweise PPF₁ gebildet (Imbusch und Mueller, 2001). Allerdings spielt auch noch die Anwesenheit von reduzierend wirkenden Substanzen eine Rolle: Sind nicht ausreichend Reduktionsmittel vor-

handen, werden vermehrt Substanzen mit einem E-Ring-System anstelle der F-Ring-Verbindungen gebildet (Morrow et al., 1998). Die weiteren Zusammenhänge sind in Kapitel V.1.4 dargestellt.

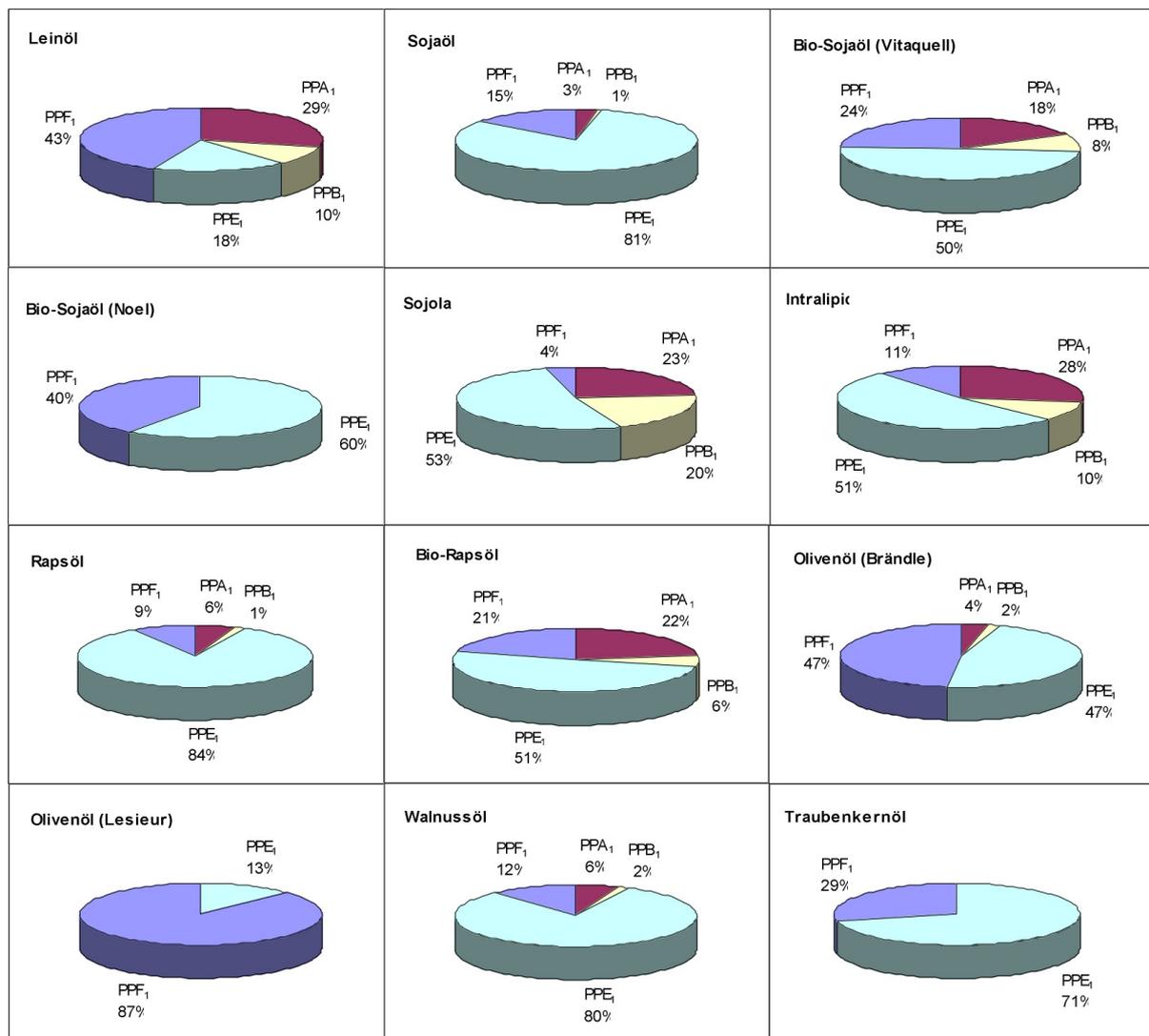


Abb. 21: Verteilung der verschiedenen Phytoprostanklassen in den einzelnen Ringsystemen. Die Grafik bezieht sich jeweils auf die Gesamtsumme (bestimmt nach enzymatischer Hydrolyse) der Phytoprostane. Die verschiedenen Phytoprostanklassen PPA₁, PPB₁, PPE₁ und PPF₁ sind in ihrem prozentualen Verhältnis zueinander wiedergegeben wobei die Summe aller Phytoprostane 100 % beträgt.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass Phytoprostane in frischen Speiseölen in Mengen von mehreren µg pro g Öl vorkommen. E₁, F₁-, A₁- sowie B₁-Phytoprostane sind demnach für die menschliche Ernährung durchaus von Bedeutung, da täglich mehrere Nanomol von ihnen verzehrt werden. In diesem Abschnitt wurden die Phytoprostane in frischen Ölen untersucht. Im Haushalt allerdings werden die Öle geöffnet und erst über einen längeren Zeitraum hinweg verbraucht, wobei sie teilweise an Licht und bei Raumtemperatur gelagert werden. Während dieser Lagerung kann eine zusätzliche Autoxidation statt finden, bei der sich weitere Phytoprostane bilden könnten. Deshalb soll im nächsten Abschnitt untersucht werden, wie sich die Konzentration von Phytoprostanen in den Ölen während der Lagerung verändern.

IV.1.6 Phytoprostan-Gehalt von autoxydierten Speiseölen

Es ist allseits bekannt, dass Speiseöle während der Lagerung zu einer Autoxydation neigen und dabei ranzig werden können. Deshalb soll hier auch der Frage nachgegangen werden, wie viele Phytoprostane sich in angebrochenen und längere Zeit gelagerten Flaschen befinden und in welchen Mengen sie in gebratenem oder frittiertem Öl zu finden sind. Aus diesem Grund wurden einige Modellversuche zur Autoxydation durchgeführt und in diesen Ölen der Phytoprostangehalt bestimmt. Bei den nachfolgend aufgeführten Tabellen ist zur Orientierung jeweils der in Abschnitt IV.1.5 gefundene Gehalt von Phytoprostanen im unbehandelten Öl mit angegeben.

IV.1.6.1 Autoxydation bei 50°C

Zur Bestimmung der Oxidationsanfälligkeit bzw. der Lagerstabilität eines Öles wird häufig ein Modellversuch durchgeführt, bei dem das Öl auf 50°C temperiert und die entstehenden Peroxide im zeitlichen Verlauf gemessen werden. Dieses Modell sollte auch darüber Aufschluss geben, wie viele Phytoprostane sich bei längerer Lagerung im Haushalt bilden könnten. In dem hier durchgeführten Versuch wurden ca. 50 ml raffiniertes Sojaöl in ein weites Becherglas (Durchmesser 6,5 cm) gefüllt, um eine relativ große Kontaktfläche des Öls mit der Luft zu bekommen. Das Becherglas wurde in einen auf 50°C temperierten, belüfteten Trockenschrank gestellt und unberührt stehen gelassen. In den Trockenschrank drang diffuses Tageslicht. Nach 18 Tagen wurde der Versuch beendet und das autoxydierte Öl auf freie und veresterte dPPJ₁, PPE₁ und PPF₁ hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 abgebildet.

Tab. 20: Phytoprostangehalt von raffiniertem Sojaöl vor und nach 18 Tagen Lagerung bei 50°C.

	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
freie Phytoprostane			
<i>Öl frisch</i>	< 0,04	1,26 ± 0,91	0,52 ± 0,52
<i>Öl gelagert</i>	< 0,19	0,41 ± 0,30	10,75 ± 1,55
Gesamte Phytoprostane			
<i>Öl frisch</i>	–	78,47 ± 0,18	13,98 ± 0,01
<i>Öl gelagert</i>	–	33,36 ± 0,55	74,77 ± 4,70

Die Gesamtmenge der Phytoprostane wurde nach Hydrolyse des Öls mit Pankreas-Lipase bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung ± SD.

Die Ergebnisse fielen für die verschiedenen Phytoprostanklassen sehr unterschiedlich aus. Eine Bildung von dPPJ₁ fand im Rahmen der Messgenauigkeit nicht statt. Erstaunlicher-

weise ging die Konzentration der PPE₁ auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes zurück. Lediglich die PPF₁ stiegen während der Lagerung stark an und zwar auf das 5-fache. Dabei bildeten sich signifikant mehr freie PPF₁ als veresterte. Diese Bedingungen führten also entgegen den Erwartungen lediglich zu einem Anstieg von PPF₁. Die Ursache liegt vermutlich darin, dass PPF₁ sehr stabile Phytoprostane sind, welche selbst Temperaturen von 80°C überstehen können. PPE₁ und besonders dPPJ₁ sind hingegen als chemisch weniger stabil bekannt. Demzufolge scheinen PPE₁ bei längerer Inkubation bei 50°C bereits merklich zu degradieren. Nachdem sich dieser Modellversuch für die Bildung von PPE₁ wegen seiner Instabilität bei erhöhten Temperaturen nicht anwenden lässt, wurden für die nachfolgenden Versuche andere Bedingungen gewählt. Demzufolge wurde das Modell den Lagerungsbedingungen im Haushalt angepasst und die Bildung von Phytoprostanen bei Raumtemperatur untersucht. Um die Autoxidation dennoch zu beschleunigen, wurde Wasser hinzugegeben.

IV.1.6.2 Autoxidation bei Raumtemperatur

In nächsten Versuch sollte exemplarisch überprüft werden, ob eine schnelle Autoxidation zu Phytoprostanen bei Raumtemperatur überhaupt stattfindet. Dafür wurden 200 mg Leinöl oder Sojaöl zusammen mit 200 µl Wasser in ein Eppendorf-Cup gefüllt und kurz auf dem Vortex gemischt. Danach wurde die Probe 7 Tage bei Raumtemperatur (24°C) unter Luftkontakt am Tageslicht stehen gelassen. Danach wurden die freien dPPJ₁, PPE₁ und PPF₁ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 21 zu finden.

Tab. 21: Gehalt an freien Phytoprostanen in Leinöl und Sojaöl im frischen Zustand und nach 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur unter Zugabe von Wasser.

	dPPJ ₁ [µmol/l]	PPE ₁ [µmol/l]	PPF ₁ [µmol/l]
Leinöl			
<i>frisch</i>	< 0,04	5,32 ± 1,03	19,68 ± 3,67
<i>gelagert</i>	0,19	21,21	26,09
Sojaöl			
<i>frisch</i>	–	1,25 ± 0,90	0,52 ± 0,52
<i>gelagert</i>	–	7,59	5,83

Während der Lagerung herrschte Tageslicht und die Probe stand in Kontakt zur Raumluft. Die Werte für das frische Öl sind Dreifachbestimmungen, wohingegen die Werte für das gelagerte Öl Einfachbestimmungen darstellen.

Bei allen gemessenen Phytoprostanen waren deutliche Zunahmen zu verzeichnen. Unter diesen Bedingungen bildete sich im Leinöl eine geringe Menge an dPPJ₁. Die PPE₁ stiegen im Leinöl auf das 4-fache an und im Sojaöl auf das 3-fache. In der Zunahme von PPF₁ unterschieden sich beide Öle jedoch: Im Leinöl nahmen die PPF₁ nur um ca. 50 % zu; im Sojaöl jedoch stiegen die Konzentrationen von PPF₁ auf das 10-fache. Dieser Versuch zeigt neben der generellen Bildung von Phytoprostanen bei der Lagerung bei Raumtemperatur weiterhin,

dass die Reaktionsbedingungen in den verschiedenen Ölen relativ unterschiedlich sind und dabei verschiedene Produkte gebildet werden.

Nachdem bekannt war, dass sich bei normaler Lagerung von Ölen Phytoprostane bilden können, sollten auch andere haushaltsübliche Situationen getestet werden. Im nächsten Versuch wurde die Bildung von Phytoprostanen in einem Öl getestet, welches vorher zum Braten verwendet worden war.

IV.1.6.3 Autoxidation nach Bratvorgang

Öle werden in der Küche für Salat, aber auch zum Kochen, Backen, Braten und Frittieren verwendet. Deshalb wurde die Autoxidation von Ölen getestet, welche zunächst thermisch belastet danach an der Luft stehen gelassen wurden. Dies entspricht einem Öl, das nach dem Bratvorgang gelagert wird. Durch die hohe Temperatur beim Bratvorgang werden nicht nur die Phytoprostane, sondern auch viele Antioxidanzien zerstört. Deshalb sollte dieses thermisch belastete Öl wesentlich schneller autoxidieren als frisches Speiseöl. Zusätzlich könnten aus dem Material der Pfanne (Edelstahl, Gusseisen), Metallionen freigesetzt werden, welche ebenfalls die Autoxidation fördern. In diesem Versuch wurden 50 ml Bio-Sojaöl (Fa. Vitaquell) zusammen mit 50 g Fleisch in einer Pfanne ca. 20 min lang bis zum Rauchpunkt erhitzt. Danach wurde die Pfanne 5h offen bei diffusem Licht stehen gelassen. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: Phytoprostangehalt von natürlichem Sojaöl (Vitaquell) unbehandelt sowie durch Autoxidation bei der Lagerung nach Bratvorgang.

	dPPJ ₁ [μmol/l]	PPE ₁ [μmol/l]	PPF ₁ [μmol/l]
Freie Phytoprostane:			
<i>Öl frisch</i>	0,23 ± 0,08	8,08 ± 0,41	6,50 ± 0,31
<i>Öl 5h nach Braten</i>	0,37	1,40 ± 0,42	4,16 ± 1,30
Gesamte Phytoprostane:			
<i>Öl frisch</i>	< 0,30	13,65 ± 1,31	6,69 ± 0,47
<i>Öl 5h nach Braten</i>	< 0,37	13,11 ± 3,32	7,67 ± 0,15

Die Gesamtmenge der Phytoprostane wurde nach Hydrolyse des Öls mit Pankreas-Lipase bestimmt. Die Werte sind Dreifachbestimmungen ± S.D.

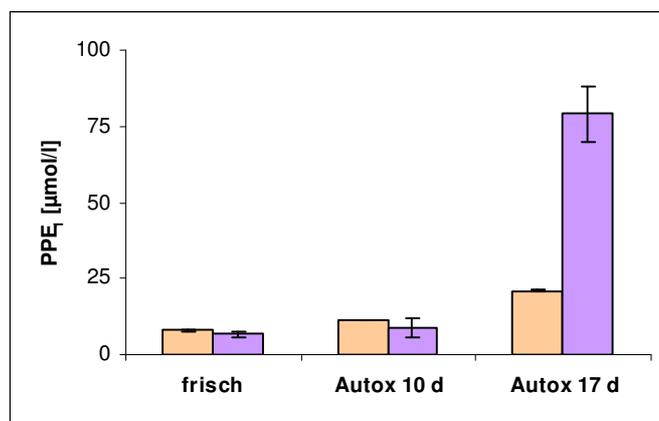
Bei diesen Versuchsbedingungen fand im Rahmen der Messungenauigkeit keine signifikante Zunahme der totalen Phytoprostan-Gehalte statt. Da die Vorgänge beim Braten komplex sind, können die Ergebnisse nicht weiter interpretiert werden.

Um einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Autoxidation von Ölen durchzuführen, wurde abschließend noch ein weiterer Modellversuch unternommen, bei dem die Autoxidation freier und veresterter Fettsäuren miteinander verglichen werden sollte.

IV.1.6.4 Modellversuch: Autoxidation freier und veresterter Linolensäure

In einem weiteren Versuch sollte bestimmt werden, ob eventuell freie oder veresterte Linolensäure bevorzugt zu Phytoprostanen autoxydiert wird. Dafür wurden 1000 μl Leinöl und 500 μl „natürliche Linolensäure“ (Firma Sigma) zu einem Modell-Öl vermisch, in welchem freie und veresterte Linolensäure im Verhältnis 1:1 vorliegen sollten. Dieses Öl wurde dann zur Autoxidation mit 1000 μl Wasser versetzt, in einen 25ml-Rundkolben gefüllt und unter kräftigem Rühren (starke Luftzufuhr) bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss belassen. Nach 10 bzw. 17 Tagen wurde jeweils ein Aliquot zur Bestimmung der freien sowie zur Gesamtmenge an Phytoprostanen entnommen. Dabei wurden die freien PPE_1 und PPF_1 und die durch Lipase hydrolysierbaren veresterten PPE_1 und PPF_1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 wiedergegeben.

A



B

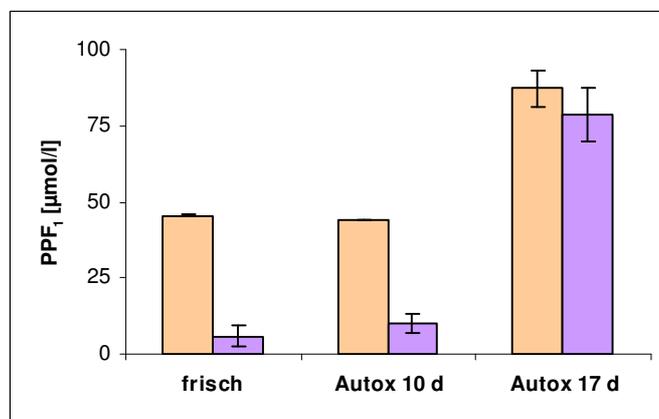


Abb. 22: Bildung und Abbau von Phytoprostanen während der Autoxidation in Gegenwart von Wasser bei Raumtemperatur. Die Gesamtmenge der Phytoprostane wurde nach Hydrolyse des Öls mit Pankreas-Lipase bestimmt. Der linke Balken zeigt jeweils die Menge der freien Phytoprostane und der rechte Balken zeigt die Menge der veresterten Phytoprostane an. Die Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung \pm SD. **(A):** Bildung von PPE_1 . **(B):** Bildung von PPF_1 .

In diesem Modell nahmen innerhalb von 17 Tagen sowohl die Konzentrationen von PPE_1 als auch von PPF_1 deutlich zu. Allerdings stiegen in beiden Fällen die veresterten Phytoprostane

wesentlich stärker an als die freien Phytoprostane: Die veresterten PPE₁ erreichten etwa das 4-fache ihres Ausgangswertes, wohingegen die freien PPE₁ lediglich auf doppelte ihres Ausgangswertes zunahmen. Die veresterten PPF₁ stiegen sogar auf das 8-fache, während die freien PPF₁ knapp den 2-fachen Wert erreichten.

IV.1.6.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Lagerung von Ölen unter Luftzutritt dPPJ₁, PPE₁ und PPF₁ gebildet werden können. Bei erhöhter Temperatur scheint allerdings eine Degradation von dPPJ₁ und PPE₁ aufzutreten. In einem getesteten Modell-Öl aus Leinöl und Linolensäure nahmen die veresterten Phytoprostane E₁ und F₁ bei der Autoxidation stärker zu als die frei vorliegenden.

In den nachfolgenden Kapiteln soll untersucht werden, wie sich die Phytoprostane aus der Nahrung nach deren Verzehr im menschlichen Körper verhalten. Dabei soll zunächst geklärt werden, ob sie im Verdauungstrakt stabil oder ob Isomerisierungen oder Abbaureaktionen stattfinden.

IV.1.7 Dehydratisierung von PPD₁ und PPE₁ in künstlichem Magensaft

Um im Menschen systemische Wirkungen erzielen zu können, müssen Phytoprostane aus der Nahrung zunächst den Verdauungstrakt passieren, bevor sie im Dünndarm resorbiert werden können. Deshalb wurde überprüft, ob Phytoprostane diese physiologischen Bedingungen unversehrt überstehen oder ob sie dabei chemisch um- oder abgebaut werden könnten. Im Mund sollten Phytoprostane stabil sein, denn dort herrscht pH 7 und die dort vorkommenden Enzyme sollten die Phytoprostane nicht beeinflussen. Im Magen allerdings, wo die Speiseöle durchaus einige Stunden verweilen können, sind sie aufgrund der Magensäure relativ niedrigen pH-Werten von 1-2 ausgesetzt. Hier ist es vorstellbar, dass säurekatalysierte Dehydratisierungen stattfinden. Nach Passierung des Magens gelangen die Öle in den Zwölffingerdarm, wo ein pH-Wert von 6,5 bis 7,8 vorliegt. In diesem pH-Bereich sollten alle Phytoprostane stabil sein und nicht isomerisiert oder zersetzt werden.

Um eine mögliche Dehydratisierung von PPE₁ zu PPA₁ sowie von PPD₁ zu dPPJ₁ im Magen zu überprüfen, wurde ein Stabilitätstest in künstlichem Magensaft durchgeführt. Als künstlicher Magensaft wurde gemäß dem Europäischen Arzneibuch aus dem Jahr 2000 (Ph.Eur. 2000) eine 0,1M Salzsäure verwendet. Diese besitzt den pH-Wert 1. Da keine PPD₁ zur Verfügung standen, wurde dieser Versuch mit gekauftem PGD₁ durchgeführt. Dafür wurden die Testsubstanzen PPE₁ und PGD₁ zunächst mittels SiOH-SPE (IV.1.1) von möglicherweise enthaltenen endogenen Dehydratisierungsprodukten befreit. Zur Isomerisierung wurden 10µg PPE₁ bzw. PGD₁ in 100µl Methanol gelöst und mit 3 ml 0,1M HCl im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Nach 3h wurden die Ansätze dreimal mit Diethylether extrahiert. Die Etherphasen

wurden jeweils vereinigt und danach Edukt und gebildete Produkte jeweils durch eine Festphasenextraktion an einer SiOH-SPE (s. IV.1.1) getrennt.

PGD₁ wurde mit Trifluoressigsäure (s. IV.1.2) zu dPGJ₁ isomerisiert und wie die dPGJ₁-Fraktion am LC/MS über Direkteinspritzung quantifiziert. Die PPE₁-Fraktion und die PPA₁-Fraktion wurden jeweils zu PPB₁ isomerisiert (s. III.1.3) und an der HPLC mittels UV-Absorption bestimmt. Die Quantifizierung von PGD₁ und gebildetem dPGJ₁ erfolgte extern über mit Trifluoressigsäure dehydratisiertes PGD₁. Für die Quantifizierung von PPE₁ und PPA₁ wurde vor der Festphasenextraktion den vereinigten Etherphasen des PPE₁-Ansatzes 5µg PGE₁ und 5µg PGB₁ als interne Standards zugegeben. Die HPLC-Chromatogramme zur Bestimmung von PPE₁ und PPB₁ sind in Abb. 23 dargestellt.

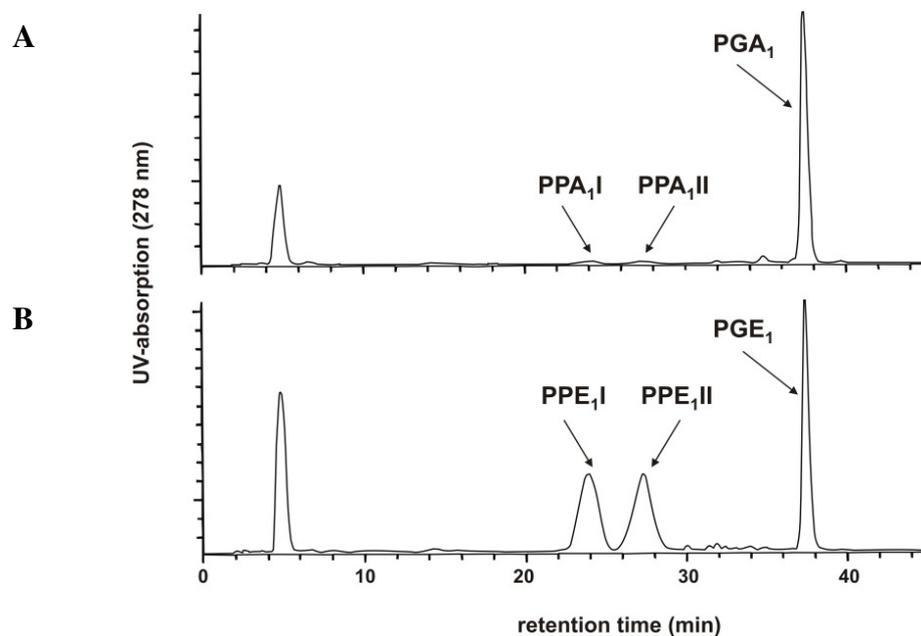


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm der Messung von PPE₁ und gebildeten PPA₁ jeweils als PPB₁. A: Im Dehydratisierungsversuch gebildete PPA₁, welche nach der Reinigung über SiOH-SPE zu PPB₁ isomerisiert als PPB₁ mittels HPLC vermessen wurden. B: Im Dehydratisierungsversuch nichtumgesetzte PPE₁, welche nach der Reinigung über SiOH-SPE zu PPB₁ isomerisiert und in der HPLC als PPB₁ vermessen wurden. Die Quantifizierung erfolgte über die zugesetzten Prostaglandine PGA₁ und PGE₁ (jeweils gemessen als PGB₁).

Von den eingesetzten PPE₁ waren nach der Inkubation noch ~ 97 % vorhanden. Für PPE₁ wurde eine moderate Isomerisierung von $2,8 \pm 0,9$ % (Dreifachversuch) gefunden. PGD₁ hingegen zeigten eine hohe Isomerisierungsrate von ~ 19 % (Einfachversuch).

Nachdem gezeigt wurde, dass Phytoprostane generell in Speiseölen vorkommen und die Stabilität der Phytoprostane bei physiologischen pH-Werten gegeben zu sein scheint, gewinnt die Bioverfügbarkeit von Phytoprostanen aus der Nahrung an zunehmender Bedeutung. Im nächsten Abschnitt soll die Resorption der Phytoprostane aus den Speiseölen und spätere ihre Ausscheidung im Urin beurteilt werden.

IV.1.8 Resorption und Exkretion von Phytoprostanen

IV.1.8.1 Wissensstand vor Beginn der Studie

Neben dem prinzipiellen Vorkommen von Phytoprostanen in Lebensmitteln sollte untersucht werden, ob die in den Pflanzenölen enthaltenen Phytoprostane auch durch die menschlichen Verdauungsenzyme umgesetzt und ob Phytoprostane frei oder verestert resorbiert werden können. In den Versuchen in Abschnitt IV.1.6 wurde gezeigt, dass die Schweine-Pankreaslipase *in vitro* veresterte Phytoprostane aus Triacylglyceriden freisetzen kann. *In vivo* werden bei der Verdauung Triglyceride natürlicher Fettsäuren in 2-Monoacylglyceride und freie Fettsäuren gespalten, welche beide gut resorbierbar sind. Ob und in welchem Ausmaß freie sowie als Monoacylglycerid vorliegende Phytoprostane durch die Darmenterozyten resorbiert werden können, sollte mit dieser Studie untersucht werden. In der Effizienz der Resorption gibt es Unterschiede zwischen normalen Fettsäuren und Hydroxy- sowie Hydroperoxyfettsäuren. Márquez-Riuz und Dobarganes zeigten 1995, dass die aus Linolsäure durch thermische Oxidation gebildeten Monomere (nichtflüchtige Produkte mit mindestens einer Hydroperoxy-, Hydroxy-, Epoxy- oder Keto-Gruppe) noch zu 91 % resorbiert werden können. Weitere Untersuchungen (Wilson et al., 2002) ergaben, dass Hydroxyfettsäuren zu ~ 21,0 % resorbiert werden, wohingegen Dihydroxyfettsäuren nur zu 4,5 % resorbiert werden. Außerdem wird oxidierte Linolsäure ebenso wie natürliche Linolensäure nach Resorption in den Mikrosomen mit Lysophosphatidylcholin verestert (Penumetcha et al., 2000). Danach scheinen Peroxide und Hydroxyfettsäuren tatsächlich in Chylomikronen von Menschen (Staprans et al., 1994) und VLDL von Ratten (Staprans et al., 1996) eingebaut zu werden.

Bei Untersuchungen über die Resorption von Prostaglandinen zeigte sich, dass freie Prostaglandine sowie der Methylester von Menschen und Tieren relativ schnell resorbiert werden (Bygdeman et al., 2003). PGE₂ wurde mit einer Halbwertszeit von 37 min und einer Ausbeute von 2-3 % aus dem Lumen des Dünndarms der Ratte resorbiert (Magee et al., 1972). Dabei wurde es jedoch stark metabolisiert: An intaktem PGE₂ konnten nur noch 0,04-0,08 % im Blut wiedergefunden werden. Das polarere PGF_{2α} wurde langsamer resorbiert und zwar mit einer Halbwertszeit von 60-70 min und einer Ausbeute von 2 %. Einen ähnlichen Versuch machten Robert et. al. 1972 mit Hunden. Hier fanden sich nach Gabe von 9-[³H]-PGF_{2α} oder dessen Methylester nach 60 min ganze 8-18 % der ursprünglichen Menge Radioaktivität im Blut (Vene) wieder. Abermals trat eine extreme Metabolisierung auf, und vom ursprünglich verabreichtem PGF_{2α} konnten im Blut nur 0,3 % als intaktes PGF_{2α} wiedergefunden werden, wohingegen nach Gabe des Methylesters 1,7 % wiedergefunden wurden. Ob Phytoprostane ebenso schnell wie Prostaglandine metabolisiert werden, ist noch unklar.

IV.1.8.2 Studiendesign

Die Resorption und Exkretion von Phytoprostanen wurde im Rahmen der Studie „Etude Biophyto 1“ untersucht. Geplant und durchgeführt wurde die Etude Biophyto 1 von Prof. Dr.

Jean-Luc Cracowski, Universität Grenoble / Frankreich im Grenobler Universitätskrankenhaus. Dabei handelt es sich um eine offene Pilotstudie, welche randomisiert und mit parallelen Gruppen durchgeführt wurde. Die Teilnehmer der Studie waren 12 gesunde Männer, welche zwischen 18 und 35 Jahre alt und schlank waren (Body Mass Index zwischen 20 und 29 kg/m²). Außerdem waren die Freiwilligen keine Vegetarier und hatten in den vorangegangenen 6 Monaten keinen Tabak konsumiert. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Die Versuchspersonen mussten einmalig 100 ml Pflanzenöl oral zu sich nehmen, welches in Kartoffelbrei eingerührt worden war, um den Verzehr zu erleichtern. Dabei erhielt eine Gruppe kaltgepresstes Sojaöl (Fa. Noel), die zweite Gruppe natives Olivenöl (Fa. Lesieur) und die dritte Gruppe Traubenkernöl (Fa. Lesieur). Diese Öle waren unmittelbar vorher im örtlichen Supermarkt gekauft worden. Darüber hinaus wurden die Probanden angewiesen, 3 Tage vor Beginn und bis zum Ende der Studie den Verzehr von Pflanzenölen zu reduzieren.

Im Folgenden wurden den Probanden zu den Zeitpunkten 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 und 24 Stunden nach der Einnahme jeweils 10 ml Blut abgenommen, welches sofort mit Heparin versetzt und 5 min mit 1900 g bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Urinproben wurden in den Zeiträumen 0 - 4 h, 4 - 8h und 8-24 h nach der Verabreichung des Öls gesammelt.

Zur Auswertung dieser Studie sollten die Phytostanolgehalte im Öl (s. IV.1.5), im Blutplasma sowie im Urin bestimmt werden. Dabei wurde die Entscheidung getroffen, lediglich PPF₁ zu bestimmen, da dieses stabiler als andere Phytostanoklassen ist und durch alkalische Hydrolyse unbeschadet aus Lipoproteinen freigesetzt werden kann. Darüber hinaus ist PPF₁ in den meisten Fällen die mengenmäßig dominierende Verbindung unter den verschiedenen Phytostanoklassen.

IV.1.8.3 Bestimmung von F₁-Phytostanolen im Blutplasma

Die Resorption der Öle wurde anhand der Fettsäurekonzentrationen im Blutplasma verfolgt. Dabei wurde jeweils der prozentuale Anteil der Hauptfettsäure (Ölsäure im Olivenöl bzw. Linolsäure im Soja- und Traubenkernöl) zu den Zeitpunkten 0 (nüchtern), 2 h und 24 h nach dem Ölkonsum verglichen. Dabei zeigten sich nach 2 h um durchschnittlich 30 % erhöhte Spiegel der Hauptfettsäuren, welche auch nach 24 h noch leicht erhöht (ca. 7 %) waren (Messungen von Prof. J.-L. Cracowski, unveröffentlicht). Das bedeutet also, dass die Resorption der Öle nach 2 h noch in vollem Gange und auch nach 24h noch nicht ganz abgeschlossen ist. Der Anteil von Linolensäure an den Plasmafettsäuren wurde durch den Verzehr der Pflanzenöle nur leicht erhöht (ca. 15 % nach 2 h).

In der Regel spaltet die Lipase in vivo Triglyceride nicht wie in vitro vollständig, sondern hydrolysiert nur die Fettsäuren in den Positionen 1 und 3 und lässt damit ein 2-Monoacylglycerid übrig. Phytostane aus den oxidierten Triglyceriden könnten nach der Lipolyse also prinzipiell als freie Fettsäuren oder als Monoacylglyceride resorbiert werden. Im Falle freier Phytostane wäre eine schnelle Resorption zu erwarten. Gewöhnliche Fettsäuren werden nach der Resorption zu Triacylglyceriden resynthetisiert und in Chylomikronen eingebaut. Allerdings ist noch kein Enzym bekannt, welches Prostanole in Lipoproteine oder komplexe Lipide einbaut. Deshalb findet in vivo vermutlich keine Esterifizierung freier Phytostane statt. Im Gegensatz dazu würde die Resorption von Phytostan-Monoacylglyceriden im Blut zu veresterten Phytostanen führen. Prinzipiell können lipophile Substanzen wie Phytostane im Blut an Albumin gekoppelt transportiert werden.

Jedoch ist damit zu rechnen, dass freie Phytoprostane ebenso wie freie Prostaglandine im Blut rasch metabolisiert werden. Folglich wurden die Blutplasmaproben auf freie und veresterte Phytoprostane hin untersucht. Da die PPF₁-Gehalte in den vorliegenden 2ml-Blutproben unterhalb der Nachweisgrenze von 100 pg/ml lagen, wurden sämtliche Plasmaproben einer Testperson vereinigt und auf freie und veresterte PPF₁ hin untersucht.

Zur Bestimmung der frei vorliegenden PPF₁ wurden die Blutproben aufgetaut und vereinigt. Dazu wurden 15 ml Blutplasma 1 Plättchen Triphenylphosphin sowie 200 µl Butylhydroxytoluol 5 % (m/v) in Ethylacetat gegeben, mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung aufgefüllt und mit ca. 2000 µl 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Nach Zugabe von 50 ng [¹⁸O]₃-PPF₁ als internem Standard wurden die Phytoprostane zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert (zur Phasentrennung 10 min Zentrifugation 4000 rpm, 4°C). Die Etherphasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Im Anschluss daran folgte die Aufreinigung der Probe an Aminopropylmaterial (IV.1.1) und die weitere Aufarbeitung wie für die Phytoprostane F₁ beschrieben (IV.1.5).

Um die veresterten PPF₁ bestimmen zu können, wurden die kompletten Plasmaproben ohne vorhergehende Extraktion der Lipide einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Dazu wurden die 15 ml Plasma mit einem Plättchen Triphenylphosphin, 200µl Butylhydroxytoluol 5 % (m/v) in Ethylacetat sowie 15 ml Methanol versetzt und 1,5 g Kaliumhydroxid hinzugegeben. Zur Vermeidung von Autoxidationsreaktionen während der Hydrolyse wurde der Ansatz 1 min mit Argon begast und anschließend 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurde das Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen und die Probelösung mit 2000µl HCl_{conc} und ca. 5000µl 1M Citronensäure auf pH 3 eingestellt. Anschließend wurde der interne Standard (50 ng [¹⁸O]₃-PPF₁) hinzugegeben und die Phytoprostane zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert (zur Phasentrennung 10 min Zentrifugation 4000 rpm, 4°C). Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt, zur Trockene eingedampft und über eine SiOH-SPE-Säule aufgereinigt (V.1.1). Danach erfolgte die Hydrierung sowie die Derivatisierung mit PFB-Br und BSTFA und die Messung der Probe am GC/MS. Ein typisches GC/MS-Chromatogramm ist in Abb. 25 aufgezeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zu finden.

Tab. 23: PPF₁ im Serum nach Konsum von Oliven- und Sojaöl.

	freie PPF ₁ nmol/l	ges. PPF ₁ nmol/l			freie PPF ₁ nmol/l	ges. PPF ₁ nmol/l
Olivenöl				Sojaöl		
Pat.3 0-24h	n.d.	1,34		Pat.2 0-24h	n.d.	0,97
Pat.10 0-24h	n.d.	0,96		Pat.8 0-24h	n.d.	n.d.
Pat.13 0-24h	0,83	1,37		Pat.9 0-24h	n.d.	n.d.

Die Gesamtmenge der Phytoprostane wurde nach Hydrolyse des Öls mit Pankreas-Lipase bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen sind Einfachbestimmungen. n.d. = < 0,2 nmol/l.

Dabei enthielt das Blut der drei Olivenöl-Konsumenten durchschnittlich $1,22 \pm 0,23$ nmol/l PPF₁, freie PPF₁ konnten allerdings lediglich bei einem davon gefunden werden. In der Gruppe der Sojaöl-Konsumenten konnten nur bei einem veresterte PPF₁ gemessen werden, im Blut aller drei Traubenkernöl-Konsumenten dagegen konnten keine freien oder veresterten PPF₁ detektiert werden (Tab. 23). Dies korreliert gut mit den in den Ölen enthaltenen Phytoprostanmengen, denn wie in Abschnitt IV.1.5 bereits aufgeführt, enthält das für diese Studie verwendete Olivenöl $17,43 \pm 1,55$ µmol PPF₁/l, das Sojaöl $4,76 \pm 0,33$ µmol PPF₁/l und das

Traubenkernöl nur $0,32 \pm 0,04 \mu\text{mol PPF}_1/\text{l}$. Diese Daten geben Anlass zu der Vermutung, dass Phytoprostane tatsächlich resorbiert und Chylomikronen eingebaut werden.

In den Triglyceriden von Pflanzenölen ist Linolensäure hauptsächlich auf der mittleren Position (sn-2) der Triglyceride angeordnet (Martinez-Force et al., 2004). Die Pankreas-Lipase hat allerdings eine Präferenz für die sn-1 und die sn-3 Position und die sn-2-Position wird nur nach einer längeren Inkubationszeit hydrolysiert. Deshalb sind in vivo die Hauptprodukte der Hydrolyse eine Mischung aus 2-Monoacylglyceriden (2-Monophytoprostanglyceriden) und freien Fettsäuren (Phytoprostanen), die zusammen mit Gallensalzen Mizellen bilden. Deshalb sollten Phytoprostane vor allem als 2-Monoacylglyceride resorbiert werden. Danach scheinen sie mit anderen Fettsäuren zu Chylomikronen resynthetisiert zu werden und gelangen so verestert in den Blutkreislauf.

Als nächstes sollte untersucht werden, wie schnell das mit den Ölen aufgenommene im Blut zirkulierende PPF_1 wieder ausgeschieden wird. Dazu wurden die PPF_1 im Urin der Probanden bestimmt.

IV.1.8.4 Bestimmung von F_1 -Phytoprostanen in Urin

Freies Isoprostan $\text{F}_{2\alpha}$ wird im Menschen schnell metabolisiert und aus dem Blutkreislauf entfernt (Roberts et al., 1996). Nach dem Konsum von Ölen liegt der Großteil der Phytoprostane im Blut jedoch verestert vor. In den Lipoproteinen sollten die Phytoprostane vor enzymatischem Abbau geschützt sein. Um von Enzymen umgesetzt oder mit dem Urin ausgeschieden werden zu können, bedarf es demnach zuerst einer Freisetzung der Phytoprostane aus den Lipoproteinen.

Für die Bestimmung der Phytoprostane in Urin wurden die Urinproben (10 ml) mit 200 μl Butylhydroxytoluol 5 % (m/v) in Ethylacetat und einem Plättchen Triphenylphosphin versetzt und mit ca. 300 μl 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Nach Zugabe des internen Standards (50 ng $[\text{O}^{18}]_3\text{-PPF}_1$) wurden die Phytoprostane zweimal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und mittels Festphasenextraktion über eine $\text{NH}_2\text{-SPE}$ aufgereinigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie für die Phytoprostane F_1 beschrieben (IV.1.3). Die aus den Urinproben isolierten PPF_1 waren gut detektierbar (Abb. 33). Die gefundenen Mengen an PPF_1 wurden anschließend auf nmol pro mmol Kreatinin umgerechnet, um das Ergebnis auf die Nierenleistung (glomeruläre Filtrationsrate) zu normieren (Abb. 24). Dafür wurde der Kreatiningehalt der Urinproben mit dem Kreatinin-Testkit der Firma Sigma (siehe III.4) in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

In den Urinproben der Konsumenten von Olivenöl oder Sojaöl konnten nach 0-4 h durchschnittlich $2,02 \pm 1,39$ bzw. $0,43 \pm 0,31$ nmol PPF_1/mmol Kreatinin und nach 4-8 h $1,39 \pm 0,56$ bzw. $0,68 \pm 0,42$ nmol PPF_1/mmol Kreatinin gefunden werden. Zwischen 8 und 24 h nach der Einnahme wurden nur noch sehr geringe Mengen PPF_1 ($0,17 \pm 0,10$ bzw. $0,11 \pm 0,03$ nmol PPF_1/mmol Kreatinin) ausgeschieden. Insgesamt enthielten die Urinproben der Olivenöl-Konsumenten also mehr Phytoprostane F_1 als die Urinproben der Sojaöl-Konsumenten; allerdings waren die Ergebnisse der einzelnen Testpersonen sehr unterschiedlich. Der Konsum von Traubenkernöl hingegen führte in den untersuchten Zeiträumen zu keinen detektierbaren PPF_1 -Mengen im Urin. Das bedeutet, dass die Grundspiegel an PPF_1 im Urin sowie die Werte, die sich nach Verzehr von Speiseölen mit niedrigem Phytoprostangehalt einstellen, unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 nmol/l Urin (0,01 nmol/mmol Kreatinin) liegen.

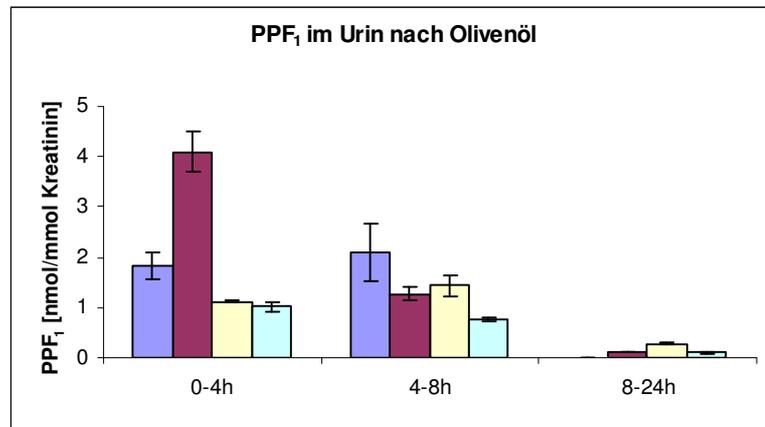
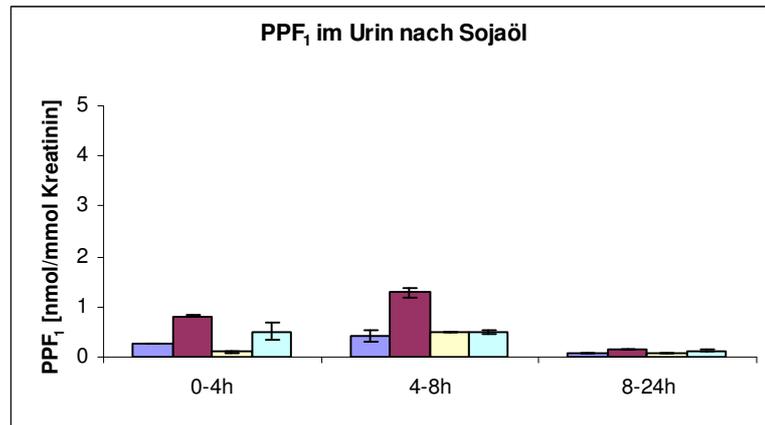
A**B**

Abb. 24: PPF₁ im Urin nach Konsum von Olivenöl (A) oder Sojaöl. Unterschiedliche Farben stellen die Ergebnisse für unterschiedliche Patienten dar. Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung \pm SD.

Die Tatsache, dass sich nach 4-8 Stunden substantielle Mengen von PPF₁ im Urin finden lassen und dass selbst nach 8-24 h im Urin noch PPF₁ nachweisbar sind, deutet darauf hin, dass PPF₁ im Blut in veresterter Form zirkulieren und erst nach Hydrolyse im Urin ausgeschieden werden. In konjugierter Form werden Isoprostane nicht metabolisiert und/oder ausgeschieden und besitzen so eine lange Halbwertszeit (Milne et al., 2005). Typische Chromatogramme für die Bestimmung von PPF₁ aus Blut- und Urinproben sind in Abb. 25 dargestellt. In den Proben war jeweils das für PPF₁ typische Peakmuster zu erkennen. Das Peakmuster der aus den Plasma- und Urinproben isolierten PPF₁-Isomere war identisch mit dem Peakmuster der PPF₁-Isomere des [¹⁸O]-markierten Standards, welcher durch Autoxidation von Linolensäure in vitro hergestellt worden war. Offensichtlich findet während der Passage durch den Körper kein extensiver Metabolismus von PPF₁ statt, der zu einem veränderten Peakmuster der PPF₁-Isomere führen würde.

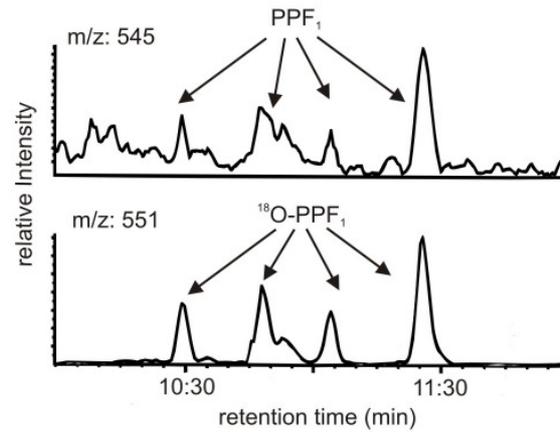
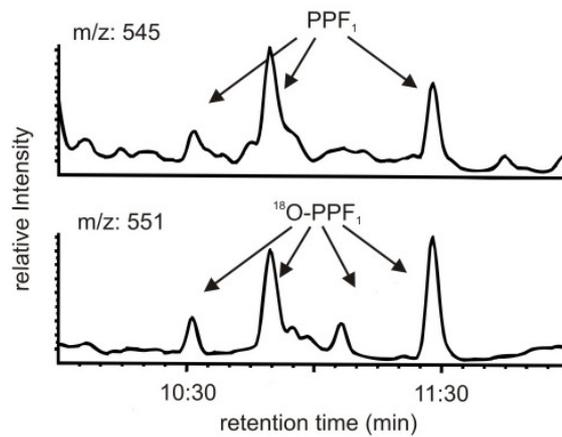
A**B**

Abb. 25: Bestimmung von PPF₁ in Blutplasma (A) und Urin (B) nach Konsum von Olivenöl mittels GC-NCI-MS Analyse. Endogene PPF₁ (Massenspur bei m/z 545) wurden als hydrierte PFB- und TMS-Derivate gemessen. Als interner Standard wurde [¹⁸O]₃-PPF₁ (Massenspur bei m/z 545) verwendet. (A): Freie und veresterte PPF₁ wurden aus vereinigten Blutproben (0-24 h nach oraler Verabreichung) nach alkalischer Hydrolyse bestimmt. (B): Freie endogene PPF₁ wurden aus einer gesammelten Urinfraktion (4-8 h nach oraler Verabreichung) ohne Hydrolyse bestimmt.

IV.2 Herstellung [¹⁸O]-markierter Standards

Interne Standards sind für eine sichere Quantifizierung notwendig. Gut geeignet sind interne Standards, die vergleichbare physikalischen und chemische Eigenschaften besitzen wie der zu quantifizierende Analyt. Dies erreicht man am besten durch den Einsatz von Verbindungen, welche mit einem oder mehreren stabilen Isotopen markiert sind. Als stabile Isotope werden hierfür häufig D, ¹³C, ¹⁸O oder ¹⁵N eingesetzt. Falls die entsprechenden internen Standards nicht käuflich erhältlich sind, müssen diese Verbindungen oft durch aufwändige Synthesen hergestellt werden. Allerdings gibt es bei vielen Substanzen auch die Möglichkeit, Wasserstoff- oder Sauerstoffatome durch schwere Isotope auszutauschen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, mit denen interne Standards von Carbonsäuren synthetisiert werden können, welche für die GC/MS-Analyse einsetzbar sind. Dazu wurden bekannte Verfahren optimiert und neue Methoden entwickelt, um bei sauren Analyten die Sauerstoffatome der Carboxyl- und Ketogruppen stabil gegen ¹⁸O auszutauschen.

Enzyme (Mechanismus siehe Abb. 26) und starke Säuren (Mechanismus siehe Abb. 27) katalysieren den Austausch von ¹⁶O gegen ¹⁸O bis zur Einstellung eines Gleichgewichts. Dieses hängt wesentlich vom [¹⁸O]-Gehalt des verwendeten Wassers ab. Der theoretische Einbau an Atom-% [¹⁸O] in die Carboxylgruppe der zu markierenden Verbindungen kann mit den folgenden Formeln berechnet werden, wenn x dem [¹⁸O]-Gehalt des verwendeten Wassers in Atom-% entspricht.

unmarkierte Verbindung: $RC^{16}O^{16}O^- (\%) = (100-x)^2/100$
einfach markierte Verbindung: $RC^{18}O^{16}O^- (\%) = 2*x*(100-x)/100$
doppelt markierte Verbindung: $RC^{18}O^{18}O^- (\%) = x^2/100$

Bei der Markierung von Verbindungen mit einer Carboxylgruppe in [¹⁸O]-Wasser mit 95 Atom-% ¹⁸O verbleiben unter Gleichgewichtsbedingungen 0,25 % der Ausgangssubstanz unmarkiert, 4,75 % werden einfach markiert und 90,25 % doppelt markiert.

Falls die zu markierende Verbindung neben einer Carboxylgruppe auch eine Ketogruppe besitzt, kann auch diese markiert werden. Bei der enzymkatalysierten Markierung tritt ein Austausch des Sauerstoffs der Ketogruppe nur bei sehr langen Inkubationszeiten auf, bei der säurekatalysierten [¹⁸O]-Markierung wird dieser jedoch noch vor den Sauerstoffatomen der Carboxylgruppe ausgetauscht. Bei Verwendung von [¹⁸O]-Wasser mit 95 Atom-% ¹⁸O verbleiben bei Auftreten einer Dreifachmarkierung 0,01 % der Ausgangssubstanz unmarkiert, 0,71 % werden einfach markiert, 13,54 % doppelt markiert und 85,74 % werden dreifach markiert. Folglich enthalten so hergestellte interne Standards noch eine kleine Menge nichtmarkierte Ausgangsverbindung als Rest. Dessen Konzentration ist aber im Vergleich zu der doppelt markierten Substanz häufig vernachlässigbar bzw. kann berechnet werden. Das tatsächlich erzielte Markierungsverhältnis kann massenspektrometrisch bestimmt werden. Beispiele hierfür sind in Abbildung 18 gezeigt. Zur Quantifizierung der [¹⁸O]-markierten Standards mittels GC/MS vergleicht man die Peakfläche der doppelt markierte Komponente mit der Peakfläche einer bekannten Menge der unmarkierten Ausgangssubstanz, wobei nichtumgesetzte Anteile der markierten Verbindung in die Berechnung mit einbezogen werden müssen.

In den nachfolgenden Kapiteln sind das Prinzip und die Arbeitsvorschriften für den enzymkatalysierten und den säurekatalysierten Austausch der Carboxylgruppen-Sauerstoffatome gegen ¹⁸O beschrieben.

IV.2.1 Enzymkatalysierter Austausch

Der Austausch der Carboxyl-Sauerstoffatome kann durch Enzyme katalysiert werden (Pickett und Murphy, 1980). Als Enzyme kommen hierfür Serinhydrolasen wie beispielsweise Esterasen, Lipasen und Amidasen in Frage. Serinhydrolasen katalysieren die Hydrolyse von Estern und Amiden mit einem Mechanismus, der die Transesterifikation der Säuregruppe an einen Serinrest im Enzymmolekül beinhaltet. Dieses kovalente Intermediat wird sofort durch Wasser hydrolysiert. Dabei hat das Enzym nicht nur zum Ester bzw. Amid, sondern auch zur freien Säure eine gewisse Affinität und kann auch diese kovalent binden, bis sie wieder mit Wasser hydrolysiert wird. In Gegenwart von [^{18}O]-Wasser werden so beide Sauerstoffatome der Carboxylgruppe gegen [^{18}O] ausgetauscht (Abb. 26).

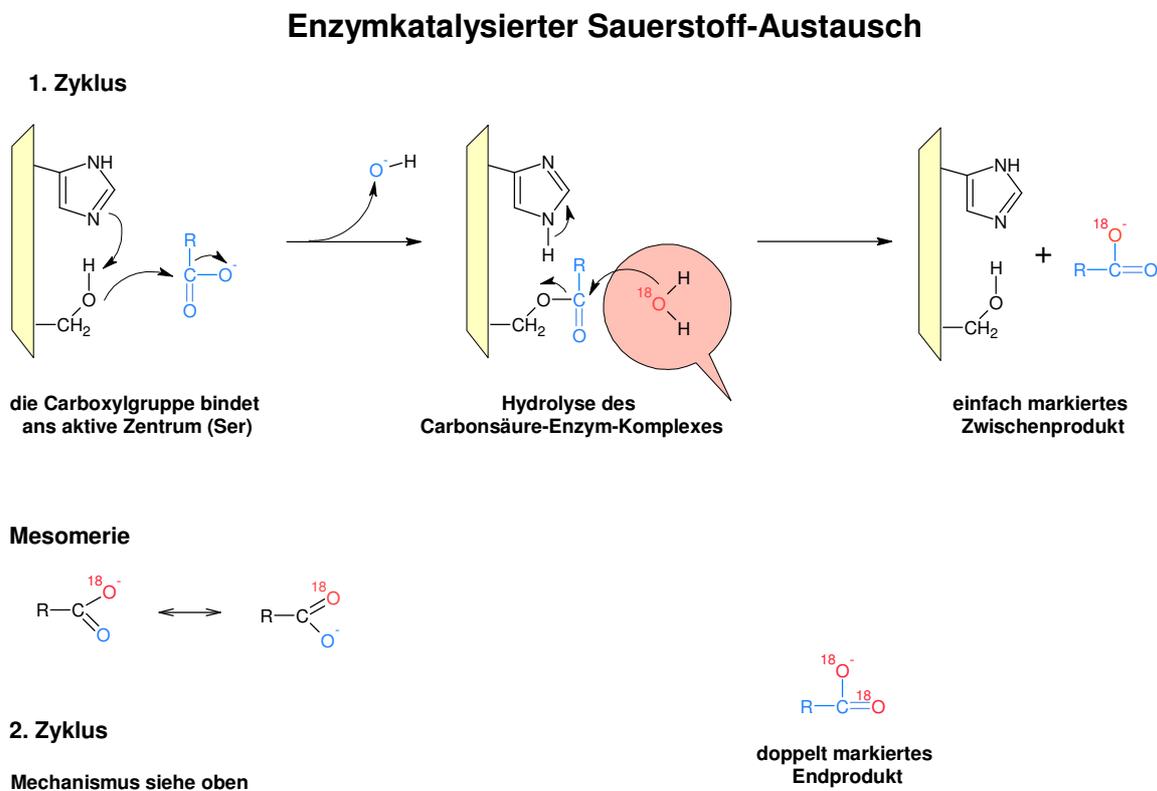


Abb. 26: Mechanismus des enzymkatalysierten Austausches des Carboxylgruppen-Sauerstoffs.

Die Umsetzung von lipophilen Substanzen kann entweder in einem [^{18}O]H₂O/MeOH-Gemisch oder in Ethylenglykol durchgeführt werden. Die Reaktionszeit hängt dabei im Wesentlichen von der Affinität des verwendeten Enzyms zum jeweiligen Substrat ab. Ein Austausch der Ketogruppe wurde nur bei sehr langer Inkubation beobachtet. Zur Beendigung der Reaktion kann das Enzym durch Zugabe von Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Endkonzentration 5 mM) irreversibel inaktiviert werden. Nachfolgend sind die dazugehörigen Arbeitsvorschriften wiedergegeben.

Enzymatischer ¹⁸O-Austausch in [¹⁸O]H₂O und Methanol

In der ursprünglichen Methode von Pickett und Murphy muss eine große Menge an teurem [¹⁸O]H₂O eingesetzt werden, um die zu markierende Substanz in Lösung zu bringen (1 µl [¹⁸O]H₂O für 50 ng PGF_{2α}). Deshalb wurde versucht, einen Teil des Wassers durch Methanol zu ersetzen. Wie sich herausstellte, können sowohl Esterasen als auch Lipasen noch in 20 %-igen methanolischen Lösungen arbeiten, allerdings ist die Reaktion so wesentlich langsamer. Die Schweineleber-Esterase kann sogar noch in 30 %-igen methanolischen Lösungen eingesetzt werden, wohingegen die Schweinepankreas-Lipase nur bei Methankonzentrationen bis 15 % eine ausreichende katalytische Aktivität besitzt. Auch der Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) verbessert die Löslichkeit der lipophilen Stoffe in Wasser. Deshalb wurde im Folgenden dem Wasser 10 mg BSA zugegeben. Der optimale pH-Wert für beide Enzyme beträgt 8,0. Aus diesem Grund wurde in gepufferten Lösungen gearbeitet. Bei der Optimierung der Methode wurde folgendes Protokoll entwickelt:

2,5 mg Schweineleber-Esterase wurden in 100 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gelöst und in der Speedvac bei 38°C zur Trockene gebracht. Danach wurde der Ansatz in 80 µl [¹⁸O]H₂O (95 Atom-% ¹⁸O) aufgenommen und 10 mg BSA (getrocknet) sowie 500 µg Substanz, gelöst in 20 µl Methanol p.a., hinzugegeben. Nach 10-minütiger Behandlung im Ultraschallbad erfolgte eine 12-stündige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym mit 5 µl 100 mM PMSF-Lösung in Isopropanol (10 min) inaktiviert und der Ansatz mit 26 µl 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Nach Zugabe von 100 µl Wasser wurden die organischen Verbindungen 3-mal mit jeweils 500 µl Diethylether ausgeschüttelt, zur Trockene gebracht und für die Lagerung in Acetonitril rekonstituiert.

Mit dieser Methode wurden bisher [¹⁸O]₂-OPDA, [¹⁸O]₂-IAA, [¹⁸O]₂-PPA₁ und [¹⁸O]₂-dPPJ₁ im präparativen Maßstab hergestellt. Allerdings wird bei der Umsetzung von PPA₁ durch das zugegebene BSA ein kleiner Teil zu PPB₁ isomerisiert. Gebildetes PPB₁ wurde über präparative HPLC (III.5.3) abgetrennt. Für die Synthese von [¹⁸O]₂-OPDA wurde eine Ausbeute von ~ 70 % sowie ein Markierungsgrad von < 0,9 % unmarkiert, 16,7 % 1-fach markiert und 82,4 % 2-fach markiert erzielt.

Enzymatischer ¹⁸O-Austausch in Ethylenglykol

Für Lipophile Substanzen ist aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in Wasser eine Umsetzung in organischem Medium sinnvoll, welches nur Spuren von [¹⁸O]Wasser enthält. Tatsächlich können Lipasen und viele andere Enzyme auch in organischen Lösungsmitteln eine Reihe von Reaktionen durchführen und besitzen dabei annähernd die gleiche katalytische Aktivität wie in Wasser (Zaks und Klivanov, 1985). Nach etlichen Experimenten in verschiedenen organischen Lösungsmitteln zeigte sich, dass für die hier gewünschte Austauschreaktion mit [¹⁸O]H₂O Ethylenglykol das geeignetste Lösungsmittel darstellt.

In einem Screening-Versuch wurde die Ausbeute der [¹⁸O]-Markierung mit verschiedenen Enzympräparationen durchgetestet. Untersucht wurde der Einbau von [¹⁸O] in die Carboxylgruppe von verschiedenen Phytohormonen, Phytoprostanen und Linolsäure (exemplarisch für alle langkettigen Fettsäuren) mit Schweinepankreas-Lipase, Schweineleber-Esterase oder pulverisiertem Pferdeleberextrakt in [¹⁸O]-H₂O unter standardisierten Bedingungen. Dabei wurde nach folgender Arbeitsvorschrift vorgegangen: 5 µg der auszutauschenden Substanz

wurden mit 2,5 µg Enzym und 5 µl [¹⁸O]H₂O versetzt und 30 min im Ultraschallbad inkubiert. Daraufhin wurden 100µl wasserfreies Ethylenglykol hinzugegeben und der Ansatz zur Dispergierung des Enzyms 15 min mit Ultraschall behandelt. Danach folgte die Inkubation der Probe über Nacht bei 37°C im Eppendorf-Schüttler mit 1400 rpm. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym mit 5µl 100 mM PMSF-Lösung in Isopropanol inaktiviert (10 min) und der Reaktionsansatz mit 2 µl 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert und 500 µl Wasser zugegeben. Die organischen Verbindungen wurden 3-mal mit jeweils 500 µl Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Für den Vorversuch wurde [¹⁸O]-markiertes Wasser mit einem Markierungsgrad von 86 Atom-% verwendet, da zu 86 % markiertes Wasser billiger als zu 95 % markiertes Wasser ist. Unter Gleichgewichtsbedingungen sollten für Verbindungen mit einer Carboxylgruppe 2,0 % der unmarkierten, 24,0 % der einfach markierten und 74,0 % der doppelt markierten Substanz erhalten werden. Die erzielten Ergebnisse sind in Tab. 24 gezeigt.

Tab. 24: Umsatz bei der [¹⁸O]-Markierung verschiedener Substanzen mit Schweinepankreaslipase, Schweineleberesterase oder pulverisiertem Pferdeleberextrakt unter Standardbedingungen (14h 37°C).

	Lipase			Esterase			Leberextrakt		
	unmark %	1-fach %	doppelt %	unmark %	1-fach %	doppelt %	unmark %	1-fach %	doppelt %
ABA	94,9	4,1	1,0	91,4	7,7	0,8	94,5	4,5	1,0
IAA	90,4	7,4	2,2	16,1	44,5	39,3	92,7	7,1	0,2
JA	87,6	11,7	0,7	57,1	34,5	8,4	74,0	22,9	3,0
Linolsre	23,5	35,8	40,7	8,4	36,0	55,5	34,4	36,9	28,7
OPDA	2,9	34,1	63,0	17,0	31,8	51,2	37,1	34,9	28,0
PPA₁	6,5	25,5	68,0	69,6	19,6	10,8	50,7	33,5	15,8
PPB₁	8,0	37,3	54,6	6,5	38,4	55,1	11,8	36,8	51,4
PPE₁	85,2	16,0	4,5	87,4	9,1	3,5	82,0	11,5	6,5
PPF₁	18,6	34,1	42,7	24,5	37,9	37,6	15,7	39,3	45,0
dPPJ₁	8,2	37,6	53,1	13,3	36,6	50,1	36,3	32,5	31,3
SA	99,8	0,2	0,0	89,4	10,6	0,0	97,7	2,3	0,0
berechnet	2,0	24,0	74,0	2,0	24,0	74,0	2,0	24,0	74,0

5 µg der Testsubstanz wurden mit 2,5 µg Enzym und 5 µl [¹⁸O]H₂O (86 Atom-% ¹⁸O) versetzt, 30 min im Ultraschallbad inkubiert, 100 µl wasserfreies Ethylenglykol hinzugegeben und nochmals 15 min im Ultraschallbad dispergiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Eppendorf-Schüttler bei 1400 rpm inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde das Enzym mit 5µl 100 mM PMSF-Lösung in Isopropanol inaktiviert (10 min). Der Reaktionsansatz wurde mit 2 µl 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert, 500 µl Wasser zugegeben und organische Verbindungen 3-mal mit jeweils 500 µl Diethylether ausgeschüttelt. Angegeben sind die Prozentanteile der einzelnen Markierungsgrade. In der letzten Zeile sind die Werte bei optimaler Umsetzung wiedergegeben.

An den erzielten Ergebnissen kann man erkennen, dass die Methode noch keine optimalen Ergebnisse bringt. Der Anteil an unmarkierter Ausgangssubstanz ist noch in allen Ansätzen zu hoch. Dabei zeigt sich deutlich die unterschiedliche Affinität der einzelnen Enzyme zu den verschiedenen Substraten. Tatsächlich stellte sich OPDA als das beste Substrat für die Lipase

heraus, wohingegen von der Esterase PPB₁ und dPPJ₁ bevorzugt werden. ABA, JA und SA scheinen durch keines der verwendeten Enzyme (auch nicht von den im Leberextrakt enthaltenen) kovalent gebunden zu werden. IAA ließ sich nur mit der Esterase umsetzen. Alle Substanzen, die in diesem Vorversuch zu mehr als 30 – 40 % markiert wurden, können prinzipiell mit einer optimierten Methode zu internen Standards (< 2 % unmarkiert) umgesetzt werden. Unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen konnte nur für OPDA ein genügend großer Markierungsgrad erzielt werden, der für die Herstellung von internen Standards ausreichen würde. Allerdings ist bei der Markierung von JA, Fettsäuren, PPA₁, PPB₁, PPF₁ und dPPJ₁ sowie IAA durch eine Verlängerung der Reaktionszeit vermutlich eine Verbesserung der Ausbeute möglich. Im Falle von ABA, PPE₁ und SA ist es vermutlich nicht möglich, interne Standards mit den ausgewählten Enzymen herzustellen.

Im präparativen Maßstab wurden die besten Ergebnisse für die enzymkatalysierte Markierung von OPDA mit folgender Arbeitsvorschrift erzielt: Zunächst wurde eine Enzym-Stocklösung bereitet, indem 20 mg Schweinepankreaslipase in 1 ml wasserfreies Ethylenglykol gegeben und die Mischung für eine Minute im Ultraschallbad dispergiert wurde. Weiterhin wurden wasserfreie Puffersalze (2 µl getrocknete 150 mM CaCl₂-Lösung in 1M Tris-HCl-Puffer pH 7,4) präpariert, zu welchen 100 µg in Methanol gelöste OPDA hinzugefügt wurden. Die Probe wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und 50 µl Enzymstocklösung sowie 25 µl [¹⁸O]H₂O (95 Atom-% ¹⁸O) hinzugegeben. Daraufhin wurde der Ansatz 12 Stunden bei 40°C inkubiert. Die Austauschreaktion erreicht nach 4 Stunden schon fast den Gleichgewichtszustand und ist nach 8 bis 12 Stunden beendet. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Probe mit 1 ml Hexan / Diethylether / Essigsäure (66:33:1, v/v) extrahiert und die organische Phase unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Für die Synthese von [¹⁸O]₂-OPDA wurde eine Substanzausbeute von ~ 58 % sowie ein Markierungsgrad von 1,6 % unmarkiert, 21,9 % 1-fach markiert und 76,5 % 2-fach markiert erzielt.

Der Vorteil der enzymatisch katalysierten [¹⁸O]-Markierung ist zum einen, dass die Umsetzung unter neutralen und milden Bedingungen durchgeführt werden kann. Außerdem werden dadurch nur die Sauerstoffatome der Carboxylgruppe ausgetauscht. Nachteilig ist, dass die einsetzbaren Enzyme nur ein begrenztes Spektrum an Substraten besitzen und deswegen nicht alle Substanzen umsetzen. Deswegen wurde eine chemische Methode entwickelt, die über saure Katalyse verläuft. Diese ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

IV.2.2 Säurekatalysierter Austausch

Die Sauerstoffatome verschiedener funktioneller Gruppen können gut mit starken Säuren wie Salz- oder Schwefelsäure ausgetauscht werden (Murphy und Clay, 1979). Dabei hängt die Austauschgeschwindigkeit von der funktionellen Gruppe ab. Dabei gilt die Reihenfolge:



Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass die Anwesenheit von Lewis-Säuren (Zink, Eisen, Kupfer) für die Austauschreaktion nicht erforderlich ist und diese allein auch keinen Austausch bewirken können. Allerdings muss das hier verwendete

te Lösungsmittel sorgfältig ausgewählt werden: Es darf kein Alkohol (z.B. Methanol) sein, da sonst eine Veresterung abläuft. Weiterhin darf es nicht selbst Carbonyl-Sauerstoffatome (z.B. Aceton) enthalten, da diese sonst ebenfalls gegen $[^{18}\text{O}]$ ausgetauscht werden. Selbst die Sauerstoffatome der Schwefelsäure können nach längerer Inkubation austauschen. Da das Lösungsmittel trotz allem noch ausreichend polar sein sollte, um Substanzen wie Salicylsäure und Aminosäuren zu lösen, bieten sich hier Tetrahydrofuran oder Dioxan an. Als Säuren eignen sich hierfür in erster Linie Halogenwasserstoffe. Auch mit Acetylchlorid oder wasserfreier Schwefelsäure konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Allerdings braucht man für starke Säuren wie die Salicylsäure längere Inkubationszeiten und höhere Temperaturen (90°C), um den Gleichgewichtszustand herzustellen. Die Reaktion kann entweder einige Tage bei Raumtemperatur oder 2 bis 24h bei $40 - 90^\circ\text{C}$ durchgeführt werden. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 27 gezeigt.

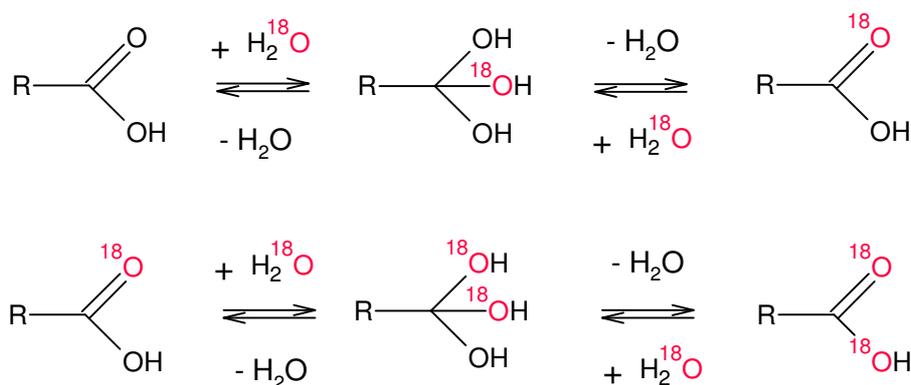


Abb. 27: Mechanismus des säurekatalysierten Sauerstoff--Austausches in $[^{18}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$. Die Sauerstoffatome der Carboxylgruppe können in Gegenwart einer starken Säure wie wasserfreie HCl ausgetauscht werden.

Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, dass der Sauerstoffaustausch nicht substanzspezifisch verläuft und damit prinzipiell jede Verbindung mit einer Carboxyl- oder Ketogruppe markiert werden kann. Außerdem können mehrere Substanzen zusammen im gleichen Ansatz umgesetzt werden. Dabei können auch die Methylester der Verbindungen umgesetzt werden, denn unter diesen Bedingungen werden Ester schnell und quantitativ hydrolysiert. Nachteilig ist, dass säurelabile Verbindungen (z.B. ABA, Phytoprostane, Hydroxyfettsäuren) unter diesen Bedingungen dehydratisiert und hydrolysiert werden. Zusätzlich werden bei der säurekatalysierten Markierungsreaktion auch Sauerstoffatome von Ketogruppen mit ausgetauscht. Die Markierung der Ketogruppe ist allerdings bereits unter schwach sauren Bedingungen instabil. Deshalb muss sie rückgetauscht werden, bevor die markierte Verbindung als interner Standard zur Analyse eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund ist im nachfolgenden Kapitel eine Arbeitsanleitung wiedergegeben, mit der man die Markierung der Ketogruppe rücktauschen kann.

Mit der säurekatalysierten Markierungsreaktion wurden bislang interne Standards für Phytohormone (JA, OPDA, IAA, SA), Fettsäuren (Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure) und Aminosäuren (Alanin, Phenylalanin, Leucin) präparativ hergestellt.

Vorschrift zur Markierung der Phytohormone und Fettsäuren

Zur Markierung von Phytohormonen und Fettsäuren wurden 500 µg der zu markierenden Substanz in 50 µl 4M HCl in Dioxan gelöst und 25 µl [¹⁸O]-Wasser (95 Atom-% ¹⁸O) hinzugegeben. Danach erfolgte die Inkubation der Probe für 2 Stunden bei 70°C oder 20 Stunden bei 40°C. Diese Bedingungen reichen für Fettsäuren aus, um die theoretische Menge an ¹⁸O einzubauen. Für Jasmonsäure wird das Gleichgewicht nach 2 Stunden Inkubation bei 90°C annähernd erreicht. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Probe in der Speedvac getrocknet und anschließend in Acetonitril aufgenommen und gelagert.

Der typische Markierungsgrad bei Verwendung von 95 %-ig markiertem Wasser betrug für Fettsäuren 0,9 % unmarkiert, 17,2 % einfach markiert und 81,9 % doppelt markiert. Die Substanzausbeute lag bei 94%.

Vorschrift zur Markierung der Salicylsäure

Zur Markierung von Salicylsäure müssen drastischere Bedingungen angewandt werden, da es sich hier um eine starke Säure handelt. Dazu wurden 500 µg wasserfreie SA in 50 µl 4 M HCl in Dioxan gelöst und 25 µl [¹⁸O]-Wasser (95 Atom-% ¹⁸O) hinzugegeben. Nach 12 h Inkubation bei 90°C wurde der Ansatz unter Vakuum zur Trockene eingedampft (Speedvac) und anschließend in Acetonitril aufgenommen und gelagert. Dabei blieben noch ca. 1 % der Salicylsäure unmarkiert. Um ein Produkt mit weniger als 0,2 % unmarkierter Komponente zu erhalten, musste die Mischung getrocknet und Prozedur wiederholt werden.

Vorschrift zur Markierung von Aminosäuren

500 µg Aminosäure wurden gelöst in 20 µl [¹⁸O]-Wasser (95 Atom-% ¹⁸O) und 20 µl 4 M HCl in Dioxan (Ultraschallbad). Nach 125 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz unter Vakuum zur Trockene eingedampft (Speedvac) und anschließend in Acetonitril aufgenommen und gelagert.

Der typische Markierungsgrad bei Verwendung von 95 %-ig markiertem Wasser betrug für die Aminosäuren 0,6 % unmarkiert, 14,7 % einfach markiert und 84,6 % doppelt markiert.

Als Beispiele für $[^{18}\text{O}]$ -markierte Standards, welche auf enzymatischem und säurekatalysiertem Wege hergestellt wurden, sind in Abb. 28 die Massenspektren von enzymatisch hergestelltem $[^{18}\text{O}]_2$ -OPDA, durch Säurekatalyse $[^{18}\text{O}]_2$ -SA, durch Säurekatalyse synthetisierte $[^{18}\text{O}]_3$ -JA sowie daraus durch alkalischen Rücktausch hergestellte $[^{18}\text{O}]_2$ -JA dargestellt.

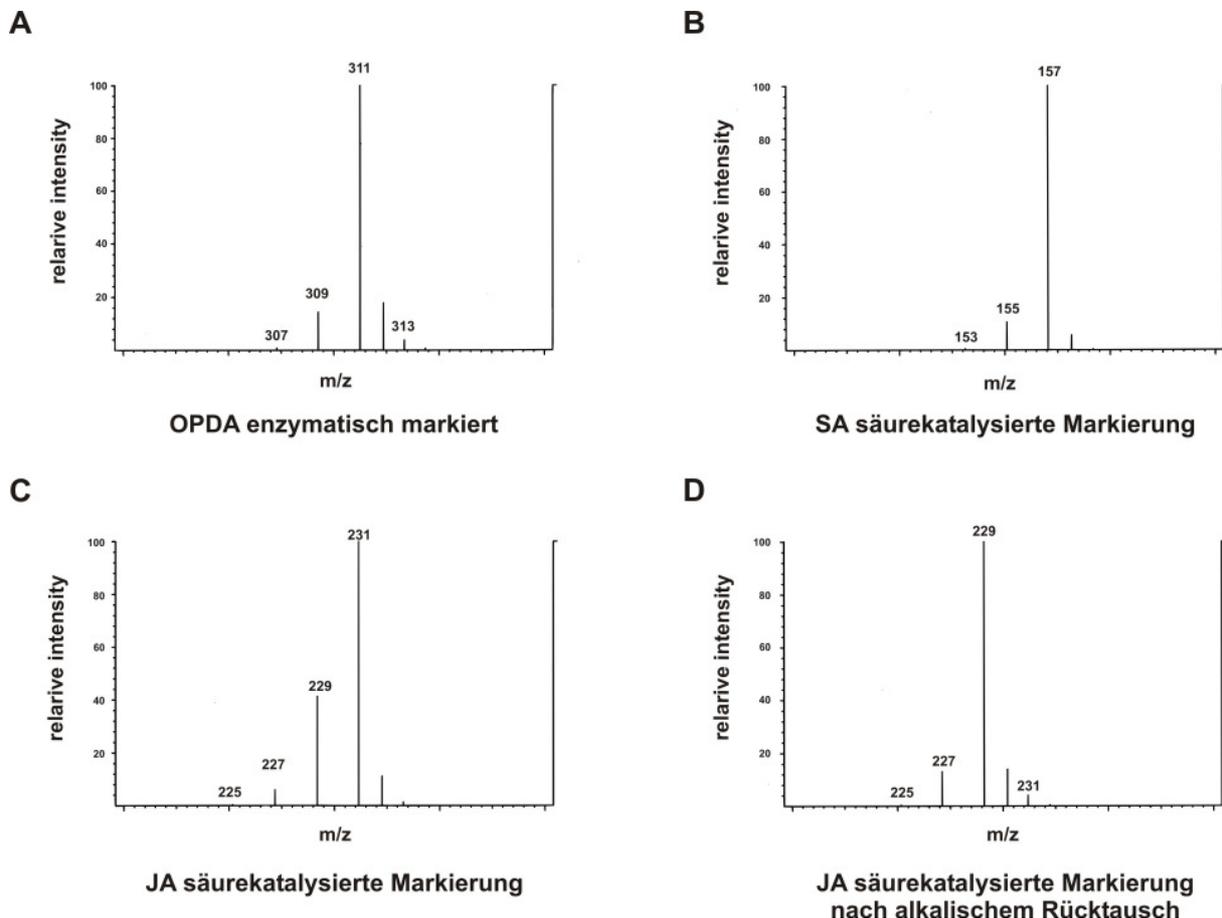


Abb. 28: Massenspektren von $[^{18}\text{O}]_2$ -markierten Standards, welche auf enzymatischem oder auf säurekatalysiertem Wege hergestellt wurden. Die Standards wurden unter Verwendung von 95 %-igem $[^{18}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$ mit den oben beschriebenen Arbeitsvorschriften hergestellt, methyliert und mittels GC-CI-MS vermessen. Gezeigt sind die Massenspektren der methylierten Verbindungen (CI-Modus).

A: Bei der enzymatischen Markierung von OPDA entsteht als Hauptprodukt die doppelt markierte Verbindung, (Me- $[^{18}\text{O}]_2$ -OPDA: $m/z = 311$), ca. 15 % einfach markierte OPDA (Me- $[^{18}\text{O}]$ -OPDA: $m/z = 309$) und ca. 1 % unmarkierte OPDA (Me-OPDA: $m/z = 307$). **B:** Massenspektrum von $[^{18}\text{O}]_2$ -markierter Salicylsäure, welche durch Säurekatalysierten Austausch hergestellt wurde. Dabei entsteht als Hauptprodukt die doppelt markierte Verbindung, (Me- $[^{18}\text{O}]_2$ -SA: $m/z = 157$), ca. 15 % einfach markierte SA (Me- $[^{18}\text{O}]$ -SA: $m/z = 155$) und ca. 1 % unmarkierte SA (Me-SA: $m/z = 153$). **C:** Bei der säurekatalysierten Markierung von Jasmonsäure entsteht hauptsächlich das dreifach markierte Produkt (Me- $[^{18}\text{O}]_3$ -JA: $m/z = 231$), bei dem sowohl die Säuregruppe als auch die Ketogruppe markiert ist, ca. 20 % sind doppelt markiert (Me- $[^{18}\text{O}]_2$ -JA: $m/z = 229$), ca. 5 % einfach markierte JA (Me- $[^{18}\text{O}]$ -JA: $m/z = 227$) und ca. 0,1 % unmarkierte JA (Me-JA: $m/z = 225$). **D:** Rücktausch der markierten Ketogruppe der dreifach markierten Jasmonsäure aus C. Dabei entsteht aus der dreifach markierten Verbindung die zweifach markierte Verbindung (an der Carboxylgruppe markiert) (Me- $[^{18}\text{O}]_2$ -JA: $m/z = 229$), ca. 15 % einfach markierte JA (Me- $[^{18}\text{O}]$ -JA: $m/z = 227$) und ca. 0,5 % unmarkierte JA (Me-JA: $m/z = 225$).

IV.2.3 Rücktausch der Ketogruppe

Bei der Markierung von Verbindungen mit einer Säure- und einer Ketogruppe wie (z.B. JA oder OPDA) kann während der Austauschreaktion mit ^{18}O ein dreifach markiertes Produkt entstehen. Unter sauren Bedingungen tauscht die Ketogruppe schneller Sauerstoff mit Wasser aus als die Säuregruppe. Da ein Teil des ^{18}O der Ketogruppe auch während der Aufarbeitung rücktauschen kann, dürfen interne Standards in der Ketogruppe keinen markierten Sauerstoff enthalten. Stattdessen kann die doppelt markierte Verbindung als interner Standard verwendet werden.

Der Rücktausch des ^{18}O der Ketogruppe kann gut in 1 M KOH durchgeführt werden. Unter alkalischen Bedingungen ist die Sauerstoff-Markierung der Carboxylgruppe stabil, da das Carboxylat-Anion mesomeriestabilisiert ist. Im Gegensatz dazu wird der Sauerstoff der Ketogruppe schnell mit unmarkiertem Sauerstoff aus Wasser ausgetauscht. Grund hierfür ist die Keto-Enol-Tautomerie, welche einen Angriff durch Wasser im Alkalischen erleichtert. Zum Rücktausch des ^{18}O der Ketogruppe wurde die Substanz in 30 μl Methanol aufgenommen und mit 20 μl 1M KOH 1h bei 40°C inkubiert. Danach wurden 500 μl kaltes Wasser und 20 μl Eisessig zugegeben und die Probe mit 1 ml Hexan / Diethylether 2:1 (v/v) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die organische Phase abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet, wobei es wichtig war, dass die Säure komplett entfernt wurde. Danach wurde der Standard zur Lagerung in einem wasserfreien Lösungsmittel aufgenommen.

IV.2.4 Stabilität der markierten Carboxylgruppe

Unter neutralen und alkalischen Bedingungen ist die Markierung der Carboxylgruppe stabil. Auch unter sauren Bedingungen tauscht der Sauerstoff der Carboxylgruppe nur sehr langsam aus. Selbst durch zweiwöchige Lagerung bei pH 2 findet kein signifikanter Austausch statt. Dies wurde am Beispiel von [$^{18}\text{O}_2$]-Phenylalanin gezeigt, das in 0,1 % Ameisensäure gelagert wurde und dessen Markierungsgrad durch wiederholte Messungen während der Lagerung mittels LC/MS bestimmt wurde. OPDA ist sogar über mehrere Stunden hinweg bei pH 1 stabil. Auch gegenüber trockenem Erhitzen (bis 300°C) ist die Markierung stabil. Allerdings kann bei höheren Temperaturen von ca. 250°C (z.B. im GC-Injektorblock oder bei der VPE) mit anwesenden Alkoholen eine merkliche Veresterung auftreten, was zum Verlust eines der markierten Sauerstoffatome führt.

Die Lagerung der [^{18}O]-markierten Standards sollte in einem wasserfreien aprotischen Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) stattfinden, unter den gleichen Bedingungen wie bei der unmarkierten Substanz.

IV.2.5 Einsatz [¹⁸O]₂-markierter Standards zur Analytik

An der Carboxylgruppe markierte [¹⁸O]₂-Standards sind in angesäuertem Urin (pH 4,0) 20h bei 4°C (Tsikas et al., 1992) und in Plasma (pH 7,4) 3 Tage bei 37°C (Murphy und Clay, 1979) stabil. [¹⁸O]₂-dinor-dihydro-iPF_{2α}-III wurde bereits erfolgreich für die GC/MS-Analytik von dinor-dihydro-iPF_{2α}-III in Plasma und Urin eingesetzt (Burke et al., 2000).

Für die Analytik von Pflanzenextrakten mit [¹⁸O]₂-markierten Standards müssen allerdings einige Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, denn pflanzliche Lipasen und Esterasen können einen Rücktausch der ¹⁸O-Markierung katalysieren. Viele Lipasen sind robust gegen Hitze (bis 65°C) und sind in einem breiten pH-Bereich katalytisch aktiv (Optimum pH 8, viele Lipasen arbeiten aber noch merklich bei pH 4). Einige pflanzliche Lipidhydrolasen scheinen so resistent gegen Denaturierung zu sein, dass sie auch im organischen Lösungsmittel (trotz Extraktion bei pH 3) aktiv sind. Deshalb sollten diese Standards niemals direkt den Pflanzenextrakten zugegeben werden, sondern erst dem getrockneten (Zugabe von Dimethoxypropan als Trockenmittel) wasserfreien Rückstand der Extraktion. Alternativ dazu kann das Pflanzenmaterial für einige Sekunden in der Mikrowelle gekocht werden, bevor der interne Standard zugegeben wird. Bei allen nachfolgenden Aufarbeitungs- und Messschritten (Derivatisierung, VPE, GC, MS) sollten sie aber auch in Gegenwart anderer Pflanzeninhaltsstoffe stabil sein.

Um diese Stabilität beurteilen zu können, wurde das gleiche Pflanzenmaterial unter Zusatz verschiedener [¹⁸O]₂-markierter Standards ([¹⁸O]₃-OPDA, [¹⁸O]₂-Laurinsäure, [¹⁸O]₂-Myristinsäure, [¹⁸O]₂-Palmitinsäure, [¹⁸O]₂-Margarinsäure und [¹⁸O]₂-Stearinsäure) 6 mal aufgearbeitet und anschließend im GC-MS vermessen. Zur Aufarbeitung wurde die Probe mit 1000 µl Methanol/Eisessig (95:5, v/v) extrahiert, in der Speedvac getrocknet und anschließend die internen Standards zugesetzt. Die Derivatisierung erfolgte mit Pentafluorbenzylbromid (siehe III.3.2) und die Aufreinigung über VPE (siehe IV.3.2). Danach wurde die Probe mittels GC-NCI-MS vermessen. Nach der Aufarbeitung kann anhand des Markierungsgrades des Standards überprüft werden, ob dieser stabil geblieben ist oder ob Austauschreaktionen stattgefunden haben, denn der Markierungsgrad sollte sich durch die Aufarbeitung nicht ändern. Da hier die einfach markierte Komponente vom endogenen Gehalt der Pflanzen abhängt, muss der Markierungsgrad anhand der einfach und doppelt markierten Verbindung bestimmt werden. Dazu wurde jeweils die Peakfläche der doppelt markierten Verbindung mit der Peakfläche der einfach markierten Verbindung verglichen und das Flächenverhältnis gebildet. Dieses sollte immer konstant sein und in der Probe den gleichen Wert wie in der Kontrolle (Aufarbeitung ohne Pflanzenmaterial) besitzen. Das Ergebnis ist in Tabelle 29 dargestellt. Das in der Probe gefundene Verhältnis der Markierung war im Mittel identisch mit der Kontrolle, das heißt der interne Standard wurde während der Aufarbeitung mit Pflanzenmaterial nicht verändert. Dabei war die Abweichung vom Mittelwert äußerst gering und lag in der Regel bei unter 10%. Das bedeutet also, dass die Standards unter den angewandten Bedingungen stabil war.

Tab. 29: Stabilität der [¹⁸O]₂-Standards während der Aufarbeitung

Markierungsgrad: Verhältnis 2-fach markiert zu 1-fach markiert				
	Kontrolle	Probe	S.D.	V.C. [%]
OPDA	3,6	3,8	0,3	7,0
Laurinsäure	4,4	4,3	0,3	6,6
Myristinsäure	5,5	4,8	0,5	9,4
Palmitinsäure	4,4	4,5	0,3	7,3
Margarinsäure	4,9	4,8	0,3	7,0
Stearinsäure	4,7	5,2	0,4	8,5

100 mg *Arabidopsis*-Blattmaterial wurde mit 1000 µl Methanol/Eisessig extrahiert und mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Pflanzenmaterial mit aufgearbeitet. Danach wurde die Probe über VPE aufgereinigt und mittels GC-NCI-MS vermessen. Als Testsubstanzen dienten die [¹⁸O]₂-markierten Standards von OPDA und der gesättigten Fettsäuren Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure und Stearinsäure. Aus den erhaltenen Peakflächen wurde jeweils das Verhältnis der 2-fach markierten Verbindung zur 1-fach markierten Verbindung bestimmt. Dabei sind die Verhältniszahlen der Kontrolle und der Proben (Mittelwert aus 6 Bestimmungen), sowie die Standardabweichung (S.D.) und der Variationskoeffizient (V.C.) angegeben.

Demnach sollte unter diesen Bedingungen zwar kein Austausch der Sauerstoffmarkierung des Standards auftreten, aber dennoch kann eine in der Pflanze nicht vorkommende Substanz (z.B. Margarinsäure) markiert und als interner Kontrollstandard zugesetzt und dessen Integrität nach der Aufarbeitung mittels GC/MS überprüft werden. Dieser Kontrollstandard muss gleichzeitig mit den anderen Standards zugesetzt werden. Eine weitere Kontrollmöglichkeit ist wie oben beschrieben die Betrachtung des Intensitätsverhältnisses der doppelt markierten Substanz im Vergleich zur einfach markierten Substanz.

IV.3 Bestimmung von Phytohormonen und anderen Metaboliten in Pflanzen

Phytohormone regeln in der Pflanze verschiedene Aspekte von Wachstum, Entwicklung und Stress. Für die Bestimmung von Phytohormonen kamen bislang viele verschiedene Methoden zum Einsatz, welche auf GC/MS, HPLC/FLD oder ELISA basieren. Das Ziel dieser Arbeit war eine Methode zu etablieren, mit welcher sämtliche Phytohormone und einige weitere Metaboliten schnell und sensitiv bestimmt werden können. In diesem Kapitel sollen zunächst konventionelle Methoden zur Bestimmung jeweils eines Phytohormons besprochen werden. Bei den etablierten Methoden handelt es sich um zielgerichtete, substanzspezifische Methoden. Anschließend soll eine neue Methode zur simultanen Bestimmung vieler Substanzen vorgestellt werden. Als Anwendungsbeispiel für die Phytohormonanalytik wurde hier die Infektion von *Arabidopsis*-Blättern mit Pseudomonaden ausgewählt. Dabei wurde für die einzelnen Phytohormone mit unterschiedlichen Methoden jeweils eine zeitabhängige Kinetik erstellt. Im Folgenden werden zunächst die konventionellen Analysemethoden vorgestellt und anschließend eine neue, verbesserte Methode zur simultanen Analytik von Phytohormonen präsentiert.

IV.3.1 Konventionelle Methoden

IV.3.1.1 Bestimmung von Salicylaten

Die Bestimmung der Salicylsäure (SA) verläuft üblicherweise über HPLC mit Fluoreszenzdetektion, denn die fluoreszierende Eigenschaft der Salicylsäure ermöglicht eine sensitive und spezifische Detektion. Als interner Standard kann hier ein Strukturanalogon verwendet werden, welches ähnliche chromatographische Eigenschaften wie die SA aufweist. Dafür wird häufig ortho-Anisinsäure eingesetzt, denn diese ist der Salicylsäure strukturell sehr ähnlich ist (Abb. 29).

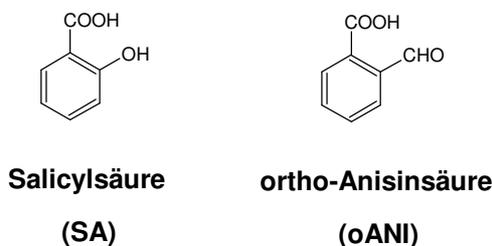


Abb. 29: Struktur von Salicylsäure und ortho-Anisinsäure.

Bei der Detektion ist die Anregungswellenlänge von 305 nm für beide Verbindungen die gleiche, das emittierte Licht allerdings besitzt unterschiedliche Wellenlängen. Deshalb wird zunächst bei 365 nm die Fluoreszenz der ortho-Anisinsäure bestimmt und dann (abhängig von der Retentionszeit der Verbindungen) die gemessene Emissionswellenlänge automatisch geändert, um bei 405 nm die Salicylsäure detektieren zu können. Eine derartige Methode wurde erstmals 1993 von Meuwly und Métraux beschrieben. Darauf basiert auch die in dieser Arbeit verwendete Methode, wobei jedoch zusätzlich das Chlorophyll durch Extraktion mit Petrol-ether entfernt wurde.

Für die Aufarbeitung von Salicylsäure aus Pflanzenmaterial wurden etwa 1g Arabidopsisblätter mit 5 nmol ortho-Anisinsäure (5 ml einer 100µM Lösung in Methanol) versetzt, 3 min mit dem Ultra-Turrax bei 2400 rpm zerkleinert und auf dem Überkopfschüttler mit 25 ml einer Mischung aus 80 %-igem Methanol (v/v) und 0,5 % (v/v) Eisessig 15 min bei RT extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) wurde der Rückstand nochmals extrahiert und der Extrakt wieder zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit 1M KOH auf pH 7,5-8 eingestellt. Diese Lösung wurde 3x mit je 15 ml Petrolether ausgeschüttelt (Zentrifugation 1 min bei 3000 rpm) und die Petroletherphasen, welche u.a. Chlorophyll enthielten, verworfen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 5 %-iger Trichloressigsäure auf pH 3 eingestellt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen (60°C). Der erhaltene Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe einiger Tropfen Wasser wurde diese Lösung direkt mittels HPLC/FLD vermessen. Abb. 30 zeigt ein typisches Chromatogramm aus Blättern einer Arabidopsis-Probe. Diese war mit Pseudomonaden infiziert, weshalb sie eine relativ hohe Menge endogene SA enthielt.

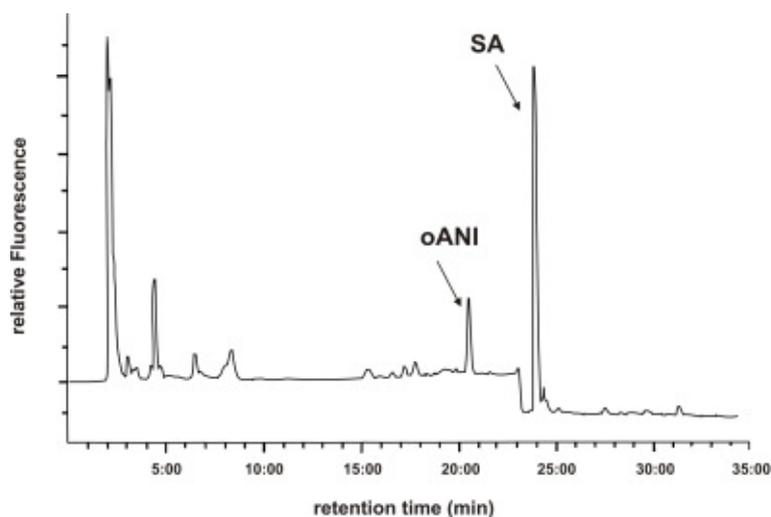


Abb. 30: Bestimmung von SA mittels HPLC/FLD unter Verwendung von oANI als internem Standard. Als Beispiel ist hier das Chromatogramm einer *Arabidopsis*-Probe dargestellt: Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden vollständig mit einer Suspension von virulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000, Konzentration 10^8 KBE, infiltriert und nach 24h geerntet.

Für die Quantifizierung mit der hier beschriebenen Aufarbeitungsmethode muss ein Responsefaktor eingerechnet werden. Dieser beträgt $1/0,824$ für SA/oANI und gilt im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 50 µM für den Verhältnis-Bereich oANI/SA 1:1 bis 10:1. Die Verluste beider Substanzen während der Aufarbeitung belaufen sich auf <10%.

Mit dieser Methode konnte sowohl der Grundspiegel als auch der Anstieg von Salicylsäure in Arabidopsis-Blättern, welche mit virulenten oder avirulenten Pseudomonaden infiziert wurden, gut gemessen werden. Abbildung 31 zeigt die erhaltene Kinetik.

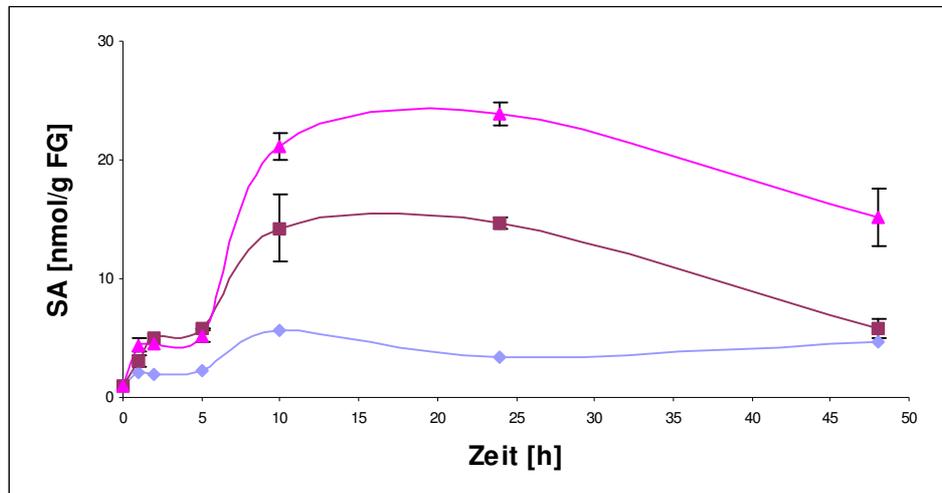


Abb. 31: Anstieg von Salicylsäure in *Arabidopsis* nach Infektion mit Pseudomonaden. Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden mit 10 mM MgCl₂-Lösung (♦), mit einer Bakteriensuspension von virulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 (▲) oder avirulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 + RPM1 (■) jeweils in einer Konzentration von 10⁸ KBE in 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Die Ernte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 5h, 10h, 24h und 48h nach der Infektion (siehe III.1.1). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

IV.3.1.2 Bestimmung von Jasmonaten

Eine Methode zur Bestimmung von Jasmonsäure (JA) wurde 1994 von Müller und Brodschelm entwickelt. 1997 wurde sie von Parchmann et al. auf die Bestimmung von 12-Oxophytodiensäure (OPDA) ausgedehnt und sorgfältig validiert. Als interner Standard sowohl für Jasmonsäure als auch OPDA kann 9,10-Dihydrojasmonsäure (H₂-JA) verwendet werden, welche endogen nicht in Pflanzengewebe vorkommt. H₂-JA besitzt gleiche chromatographische Eigenschaften wie JA. Der Responsefaktor für die Aufarbeitung und die MS-Detektion (Peakflächenverhältnisse von Analyt/int. Standard nach Aufarbeitung und Injektion gleicher Mengen Analyt und int. Standard) beträgt 1 für JA/H₂-JA und 1/1,459 für OPDA/H₂-JA.

H₂-JA wurde aus käuflich erworbenem Methyljasmonat (Fa. Serva) folgendermaßen hergestellt: 400 mg MeJA wurden zur Hydrolyse mit 2 ml 1M methanolischer KOH versetzt und 1h bei 80°C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml Wasser hinzugefügt und die Lösung mit 1M Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Die durch die Hydrolyse freigesetzte Jasmonsäure wurde mit 3 ml Diethylether extrahiert. Die Etherphase wurde abgenommen, zur Trockene eingengt und anschließend in 2 ml Methanol aufgenommen. Danach erfolgte die katalytische Hydrierung der Doppelbindung mit Adams-Katalysator (Platin) und Wasserstoff (s. III.3.5). Der so erhaltene H₂-JA-Standard war vollständig hydriert, enthielt aber noch 0,2 % Me-H₂-JA. Er wurde über GC/MS (s. III.5.3.2) gegen MeJA (unter Abzug des nichtumgesetzten Anteils) quantifiziert.

Zur Bestimmung des Jasmonsäuregehalts in Pflanzen wurden ca. 500 mg Arabidopsis-Blätter mit 15 ml gesättigter Kochsalz-Lösung, 200 µl 1 M Citronensäure, 10 ml Diethylether, ca. 20 mg Triphenylphosphin, 400 µl 5 % (w/v) tert-Butylhydroxytoluol in Methanol sowie 50 ng Dihydrojasmonsäure versetzt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit einem Ultra-Turrax durch dreiminütige Dispersion bei 2400 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 3500 rpm (4°C) zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgenommen und die wässrige Phase erneut mit 10 ml Diethylether extrahiert. Die Etherphasen wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufreinigung der Jasmonate erfolgte über die Festphasenextraktion an Aminopropyl-Material: Der aufzureinigende Extrakt wurde in Ether aufgenommen und auf die NH₂-Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 3 ml Chloroform/Isopropanol (2:1, v/v) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 6 ml Diethylether/Eisessig (98:2 v/v). Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit Pentafluorbenzylbromid verestert (s. III.3.2.). Die Abtrennung von Resten des Reagenzes erfolgte über eine SiOH-SPE. Dazu wurde die Probe in Hexan aufgegeben und JA und OPDA mit 9 ml Hexan / Diethylether (2:1, v/v) eluiert. Die Analyse erfolgte mittels GC-NCI-MS. Ein typisches GC/MS-Chromatogramm ist in Abbildung 32 dargestellt.

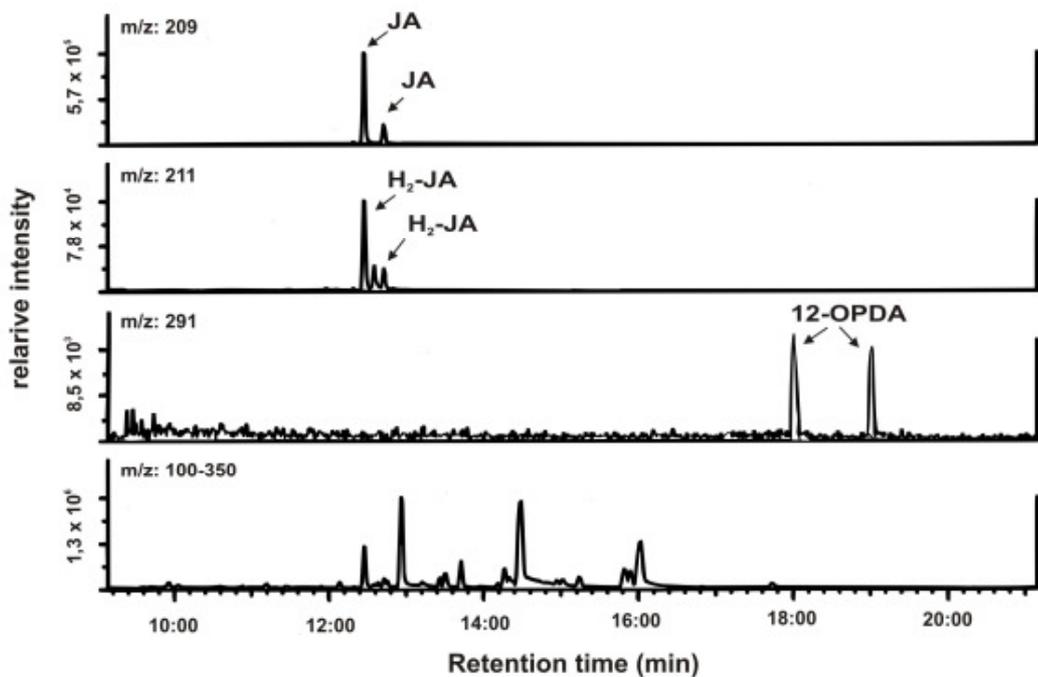


Abb. 32: Simultane Bestimmung von Jasmonsäure und OPDA mittels GC-NCI-MS. Als Beispiel ist hier das Chromatogramm einer *Arabidopsis*-Probe dargestellt: Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden vollständig mit einer Bakteriensuspension von avirulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 + RPM1 in einer Konzentration von 10⁸ KBE infiltriert und nach 24h geerntet. Endogene JA (Massenspur m/z 209) und 12-OPDA (Massenspur m/z 291) wurden als PFB-Ester vermessen, wobei H₂-JA (Massenspur m/z 291) als interner Standard diente. Auf der Massenspur m/z 100-350 ist das Totalionenchromatogramm dargestellt.

Auch diese Methode wurde auf das Beispiel der Infektion von *Arabidopsis* mit *Pseudomonas*-den angewandt (Kinetik siehe Abb. 33).

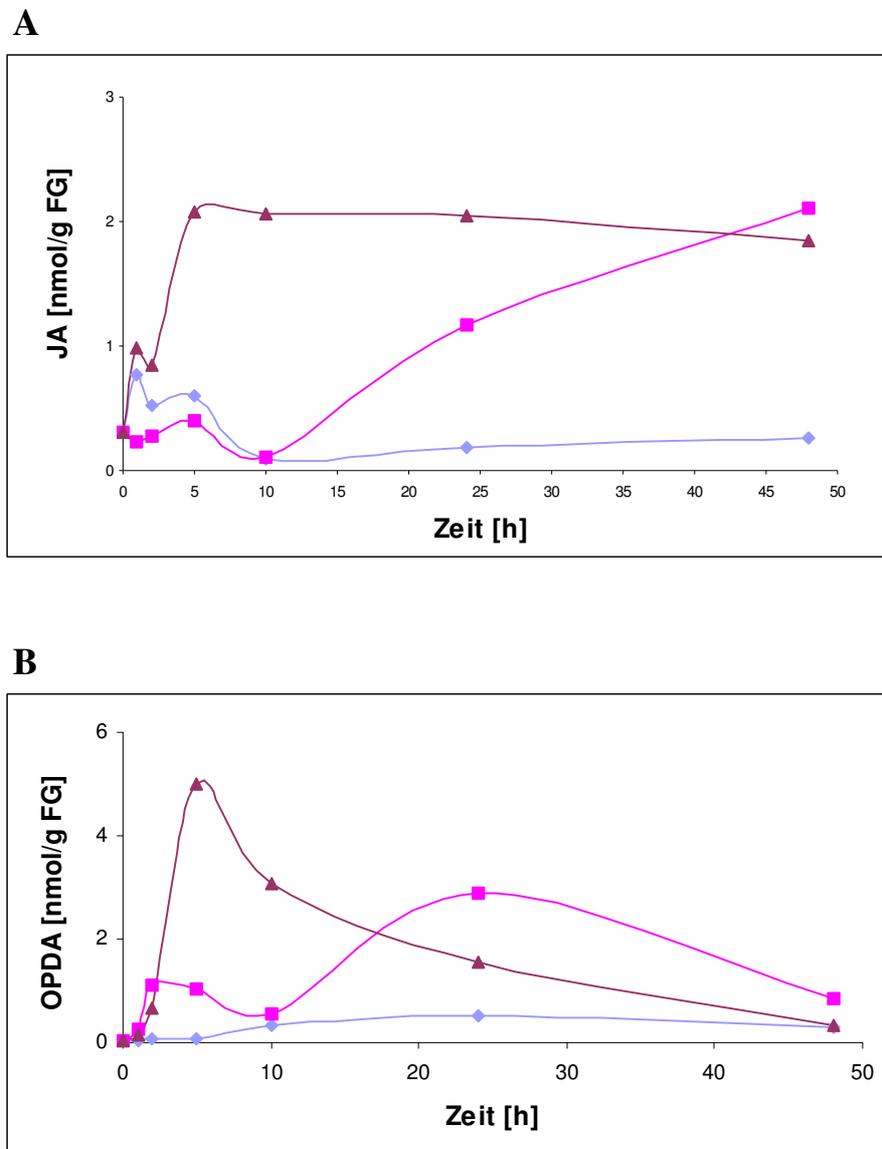


Abb. 33: Anstieg von Jasmonsäure (A) und 12-Oxophytodiensäure (B) in Arabidopsis-Blättern nach Infektion mit Pseudomonaden. Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden vollständig entweder mit 10 mM MgCl₂-Lösung (◆), mit einer Bakteriensuspension von virulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 (▲) oder avirulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 + RPM1 (■) jeweils in einer Konzentration von 10⁸ KBE in 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Die Ernte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 5h, 10h, 24h und 48h nach der Infektion (siehe III.1.1). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

IV.3.2 Modifizierte Methode nach Schmelz et al.

2003 wurde von Schmelz et al. eine sensitive Methode zur simultanen Bestimmung vieler Phytohormone mittels GC/MS vorgestellt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zielsubstanz-orientierten Methoden basiert diese revolutionäre Probenvorbereitungsmethode auf einem Metabolomik-Ansatz. Bei der Extraktion und bei der Probenvorbereitung wird kein bestimmter Analyt angereichert, sondern hunderte oder tausende Komponenten auf einmal erhalten. Die Abtrennung von Begleitsubstanzen verläuft über die Entfernung aller nichtflüchtigen störenden Bestandteile, indem die flüchtigen Verbindungen an einem Adsorptionsmaterial aufgefangen werden. Das Erhitzen der Mischung unter einem Heliumstrom ermöglicht es, das gesamte Spektrum an flüchtigen Metaboliten zu erfassen. Die Mischung wird mittels GC aufgetrennt und im Massenspektrometer ausgewählte Verbindungen daraus bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde angestrebt, das ursprüngliche Protokoll von Schmelz einigen Stellen zu optimieren. So sollte das Spektrum an erfassten Analyten ausgedehnt, die Empfindlichkeit gesteigert und die Probenvorbereitungsdauer verkürzt werden.

Bei dieser Methode wird zunächst ein methanolischer Pflanzenrohextrakt hergestellt. Der Siedepunkt der Analyten sollte zwischen 150 und 500°C liegen, um bei Standardbedingungen (3 min 200°C, 100 ml/min) zu mindestens 70 % verdampft zu werden (Schmelz et al., 2004). Sind Analyten nicht von sich aus flüchtig oder liegt ihr Siedepunkt oberhalb von 300°C, müssen sie entsprechend derivatisiert werden. Anschließend werden die Substanzen bei 200 bis 250°C verdampft und mit einem Heliumstrom (100 ml/min) durch eine simple selbstgebaute Filtervorrichtung geleitet, welche das Adsorbent Super Q Material (beschrieben in Engelberth et al., 2003) enthält. Super Q-Material ist ein leicht polares stabiles Polymer aus Divinylbenzol und Ethylvinylbenzol (Oberfläche 500-600 m²/g, Porengröße 80/100 mesh), welches organische Verbindungen mit einem Siedepunkt von > 80-100°C adsorbiert. Nicht flüchtige Probenbestandteile bleiben im Probenglas zurück. Das Prinzip dieser Aufreinigung besteht demnach in der Abtrennung aller nichtflüchtigen Komponenten, die mit den Analyten interferieren könnten. Anschließend können die adsorbierten Verbindungen mit 200µl Diethylether eluiert und direkt mittels GC/MS vermessen werden.

IV.3.2.1 Extraktion

Die Extraktionsbedingungen wurden so gewählt, dass ein möglichst breites Spektrum an Analyten erfasst wird. Deshalb wird hier als Extraktionsmittel angesäuertes Methanol verwendet, da dieses polare Verbindungen und unpolare Säuren gut lösen kann. Zur Extraktion wurde 100 mg tiefgefrorenes (bei -80°C gelagertes) Pflanzenmaterial in ein 2ml-Schraubdeckelgefäß gegeben und mit 950 µl Methanol und 50µl Eisessig versetzt. Der Probenaufschluss erfolgte in einer Kugelmühle, wobei die Probe nach Zugabe eines Keramikkügelchens (6 mm Durchmesser) 3 Minuten bei 1800 rpm homogenisiert und extrahiert wurde. Nach 1 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen, zur Entfernung mitextrahierten Wassers mit 50 µl 2,2-Dimethoxypropan versetzt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Die internen Standards werden in der Regel direkt zur Extraktion hinzugegeben. Allerdings dürfen an der Carboxylgruppe [¹⁸O]-markierte Standards erst später in den vollständig ge-

trockneten Extrakt gegeben werden, da sonst im Pflanzenextrakt enthaltene Enzyme einen Rücktausch der [^{18}O]-Markierung katalysieren würden (vgl. Abschnitt IV.3.4).

IV.3.2.2 Derivatisierung

Für die nachfolgende Gasphasenextraktion war es erforderlich, die gewünschten Analyten so derivatisiert, dass sie bei 200°C verdampfbar sind. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, solche Derivate herzustellen.

Bei der Untersuchung von Metaboliten, die in hoher Konzentration auftreten, werden die Proben methyliert und im Massenspektrometer im EI- oder positiven CI-Modus analysiert. Als Methylierungsreagenz wird üblicherweise (Trimethylsilyl)diazomethan (2M in Hexan) verwendet, da dieses Reagenz chemisch stabiler und weniger gesundheitsgefährdend als freies Diazomethan ist. In der Originalliteratur erfolgte die Methylierung durch Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ 2M TMS-Diazomethan zur Probelösung und 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (Schmelz et al., 2003). Allerdings werden OPDA und Indoleessigsäure durch längere Inkubation mit TMS-Diazomethan zerstört. Daher muss eine verdünnte Lösung eingesetzt werden und die Inkubationszeit sollte 5 min nicht überschreiten. Deshalb wurde das Reagenz unmittelbar vor Gebrauch 1:20 (v/v) mit Methanol verdünnt. Von dieser Lösung wurden $25\ \mu\text{l}$ zu der in $200\ \mu\text{l}$ Diethylether und $100\ \mu\text{l}$ Methanol gelösten Probe zugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Methylierung verläuft schnell und quantitativ und ist nach 5 min bereits vollständig abgeschlossen. Zur Beendigung der Reaktion wird überschüssiges Reagenz durch Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ Eisessig zerstört und die Probe unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Bei Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht (v.a. SA und JA) sind die Methylester allerdings bereits bei Raumtemperatur flüchtig. Deshalb müssen diese Substanzen mit äußerster Sorgfalt getrocknet werden.

Wenn Phytohormone oder andere nur in geringen Mengen vorkommende Metabolite untersucht werden sollen oder nur wenig Pflanzenmaterial zur Verfügung steht, werden die Proben mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert (beschrieben in III.3.2) und im Massenspektrometer im NCI-Modus vermessen. Bei der Derivatisierung von ACC mit Pentafluorbenzylbromid reagieren die Carbonsäuregruppe und die Aminogruppe mit Pentafluorbenzylbromid zu ACC-bis-PFB (Abb. 36). Während der negativen chemischen Ionisation wird in der Ionenkammer nur ein PFB-Rest abgespalten, wobei als Quasimolekülion ein einfach negativ geladenes Ion, $[\text{ACC-PFB}]^-$ entsteht.

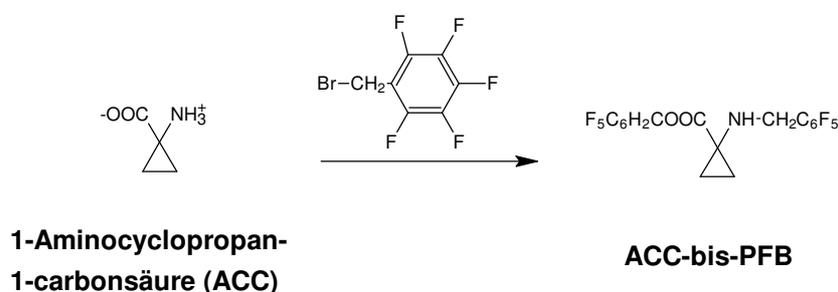


Abb. 36: Derivatisierung von ACC mit Pentafluorbenzylbromid. Das Pentafluorbenzylbromid reagiert sowohl mit der Carboxyl- als auch der Aminogruppe und es entsteht ACC-bis-PFB.

IV.3.2.3 Vapor Phase Extraction (VPE)

Für die Durchführung der VPE (siehe Abb. 37) wurde die Probe in Ether aufgenommen und in ein 2-4 ml Schraubglas überführt, welches anschließend mit einem hitzebeständigen Deckel mit Septum (GC-Septum oder Teflon-Septum) sehr dicht verschlossen wurde. Dieses Septum wurde mit zwei Stahlkanülen, der Eintritts- und der Austrittsnadel, durchstoßen. Diese durften nicht in die Probelösung eintauchen. Die Eintrittskanüle war mit einem Schlauch verbunden, über welchen ein Inertgas (Helium oder Stickstoff) mit der Fließgeschwindigkeit von 80-100 ml/min in das Probenglas eingeleitet werden konnte. Auf die Austrittskanüle wurde eine 6 ml Festphasenextraktionssäule aus Glas (luer tip, Glasfaserfritten) gesteckt, die mit 250 mg Super Q 80/100 befüllt worden war (siehe II.3). Eine Evakuierung des Säulenausgangs (angewandt in der Originalmethode) war hier nicht notwendig, da die gepackte Säule kaum Gegendruck erzeugte.

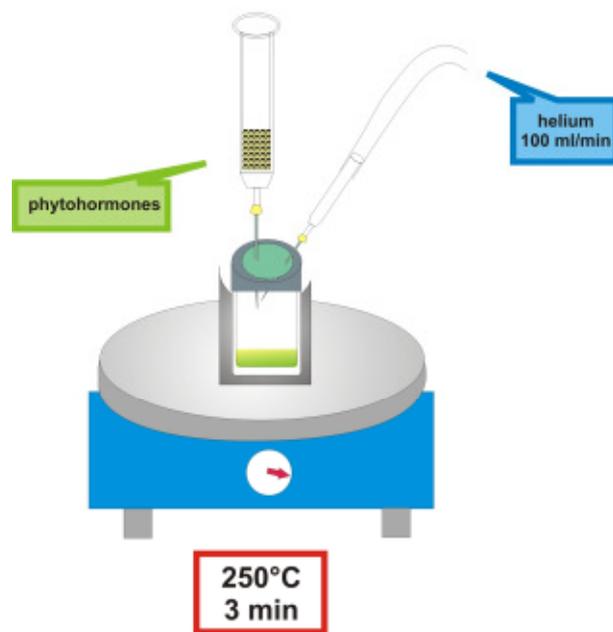


Abb. 37: Apparatur zur Durchführung der VPE. Die derivatisierte Probe wird in ein Schraubglas überführt und mit einem Deckel mit Septum fest verschlossen. Durch das Septum wird eine Kanüle eingestochen, welche über einen Schlauch mit einer Heliumzufuhr (100 ml/min) verbunden ist sowie eine zweite Kanüle, an welcher eine mit 250 mg Super Q-Material befüllte Festphasenextraktionssäule hängt. Das Lösungsmittel wird bei max. 70°C mit dem Heliumstrom zur Trockene eingedampft. Danach wird das Gläschen in einen auf 250°C temperierten Heizblock gestellt und die verdampfenden Analyten über einen Zeitraum von 3 Minuten am Super Q-Material aufgefangen.

Zunächst wurde mit dem Gasstrom das Lösungsmittel der Probe verdampft, bis das Probenglas trocken ist. Dabei dürfen zu einer Beschleunigung des Vorgangs durchaus höhere Temperaturen (max. 70°C) angewandt werden, jedoch muss ein Aufkochen des Lösungsmittels vermieden werden, da sonst nichtflüchtige Verbindungen an das Super Q-Material gelangen könnten. Niedersiedende Lösungsmittelmoleküle ($Sdp. < 80 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$) können die Säule mit dem Adsorbentmaterial ungehindert passieren, während die höhersiedenden Analyten an das Super Q-Material adsorbiert werden. Nachdem die Probe getrocknet war, wurde das Probenglas in einen auf 250°C temperierten Metall-Heizblock eingestellt und die verdampfenden Moleküle über einen Zeitraum von 3 Minuten aufgefangen. Danach wurde die Adsorptionssäule aus dem Probengefäß gezogen und die aufgefangenen Analyten wurden mit 500 μl

Diethylether eluiert. Das Eluat wurde in einem HPLC-Gläschen mit konischem Einsatz aufgefangen und unter einem Stickstoffstrom auf ein Volumen von ca. 5 µl konzentriert. Davon wurden 2 µl direkt ins GC/MS injiziert.

Das Super Q Material wurde unmittelbar vor Benutzung jeweils mit 6 ml Diethylether gewaschen. Nach Gebrauch wurde es mit 6 ml Methanol und 6 ml Diethylether gespült und nochmals verwendet.

IV.3.2.4 GC-Auftrennung von Phytohormonen und anderen Arabidopsis-Metaboliten

Um ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Analyten auf einmal zu erfassen, wurde für die GC-Auftrennung ein relativ flacher Temperaturgradient mit einer niedrigen Anfangstemperatur gewählt. Mit diesem Programm und der hier verwendeten Säule können JA, OPDA, SA, IAA, ABA, eine große Anzahl an Fettsäuren und weitere organische Säuren (vgl. Kap. IV.3.3) sowie N-Propyl-O-Methyl-Aminosäuren (vgl. Kap. IV.3.3.3) aufgetrennt werden. Allerdings kann es aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen der einzelnen Analyten notwendig sein, die Probe mehrmals in verschiedenen Konzentrationen einzuspritzen. Dabei wurden die folgenden Bedingungen verwendet:

Gaschromatograph: Varian 3400
 Injektor: Inlet-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
 Split: Öffnung nach 1 min
 Vorsäule: methyldesaktivierte Säule: 10 m x 0,25 mm (Phenomenex)
 Trennsäule: Zebron ZB-5 von Phenomenex (siehe III.5.4)
 Trägergas: Helium, Geschwindigkeit 23 cm/s

Temperaturgradient:

Gesamtzeit [min]	Heizrate [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	80
3.0	-	80
25	10	300
10.2	2.5	300
30.0	-	300

Bei der GC/CI-MS Messung der Methyl ester traten die folgenden m/z-Werte und Retentionszeiten auf: Me-SA: m/z = 153, RT = 09:04, Me-D₄-SA: m/z = 157, RT = 09:02, Me-JA: m/z = 225, RT = 15:26, Me-H₂-JA: m/z = 227, RT = 15:27, Me-IAA: m/z = 190, RT = 17:37, Me-IPA: m/z = 204, RT = 18:39, Me-ABA: m/z = 279, RT = 20:30, Me-trans-OPDA: m/z = 307, RT = 22:28, Me-cis-OPDA: m/z = 307, RT = 23:15.

Bei der GC/NCI-MS Messung der Pentafluorbenzylester traten die folgenden m/z-Werte und Retentionszeiten auf: SA-PFB: m/z = 137, RT = 16:47, D₄-SA-PFB: m/z = 141, RT = 16:45, ACC-(PFB)₂: m/z = 280, RT = 18:38, Norvalin-(PFB)₂: m/z = 296, RT = 19:00, JA-PFB: m/z = 209, RT = 21:06, H₂-JA-PFB: m/z = 211, RT = 21:07, IAA-PFB: m/z = 1740, RT = 22:39, IPA-PFB: m/z = 204, RT = 18:39, ABA-PFB: m/z = 263, RT = 25:17, trans-OPDA-PFB: m/z = 291, RT = 27:14, cis-OPDA-PFB: m/z = 291, RT = 28:14.

Die nachfolgenden MS-Bedingungen wurden entsprechend der Derivatisierung der Analyten gewählt.

IV.3.2.5 MS-Bedingungen

Für die Ionisierung einer Probe in der Ionenquelle des MS gibt es zwei generelle Methoden: Elektronenstoßionisation (EI) und chemische Ionisation (CI). Die Elektronenstoßionisation führt zu einem positiv geladenen Molekül-Radikalkation $[M^{\bullet}]^+$, das zu Fragmentierungsreaktionen in der Ionenquelle neigt. Die hochmolekularen Fragment-Ionen können als „molekularer Fingerprint“ eine Identifizierung des Moleküls ermöglichen. Weiterhin können sie für eine Quantifizierung benutzt werden. Diese Methode wird aufgrund ihrer hohen Spezifität häufig angewandt. Die chemische Ionisation hingegen führt zu Quasimolekülonen, welche an einem Sauerstoffatom protoniert sind $[MH]^+$. Der Protonendonator ist hier ein Reaktandgas. Die bei CI gebildeten Quasimolekülonen zerfallen wesentlich seltener in Fragmente als die durch EI entstandenen Molekül-Radikalkationen. Deshalb kann bei CI in der Regel nur das Quasimolekülion für die Identifizierung und Quantifizierung genutzt werden.

Die Empfindlichkeit einer GC/MS-Methode ist wesentlich von der in der Massenspektrometrie verwendeten Ionisationsmethode abhängig: Bei Anwendung der EI-Methode sind aufgrund der häufig ausgeprägten Fragmentierung des Molekülions die Intensitäten der Molekül- und Fragmentionen oft niedrig. Die EI-Methode ist daher weniger empfindlich als die CI-Ionisationsmethode, da hier das Quasimolekülion $[M+H]^+$ nicht fragmentiert und mit hoher Intensität gemessen werden kann. Für die sensitive Target-Analyse, bei der die Analyten aus einem komplexen Hintergrund heraus bestimmt werden müssen, ist deshalb die chemische Ionisation (CI) besser geeignet. Die Intensität des durch CI gebildeten Quasimolekülions kann bis zu 10 mal höher sein als die des im EI gebildeten Molekülions. Gleichzeitig ist bei einer Messung im CI-Modus das Grundrauschen reduziert. Die höchste Detektor-Sensitivität wird mit einer modifizierten CI-Methode, der negativen chemischen Ionisation (NCI) erzielt. Die Anwendung dieser Methode kann die Peakintensität des Molekülions um bis zu 3 Größenordnungen steigern. Allerdings muss der Analyt hierfür entsprechend mit einer elektronegativen Gruppe derivatisiert werden. Carbonsäuren derivatisiert man deshalb mit Pentafluorbenzylbromid (siehe III.3.2), denn der entstehende Pentafluorbenzylester verfügt über einen hohen Elektroneneinfangsquerschnitt und kann in der Ionenquelle langsame Elektronen aufnehmen. Die Bildung von Anionen ist nicht nur ein sehr effizienter, sondern auch ein hoch spezifischer Prozess. Das liegt daran, dass Anionen fast nur von derivatisierten Verbindungen gebildet werden. Dies führt zu einem stark verminderten Grundrauschen. Mit dieser Methode können 1000-fach (Fettsäuren) bis 10000-fach (JA, SA) höhere Signalintensitäten als bei Messung im positiv CI-Modus erhalten werden.

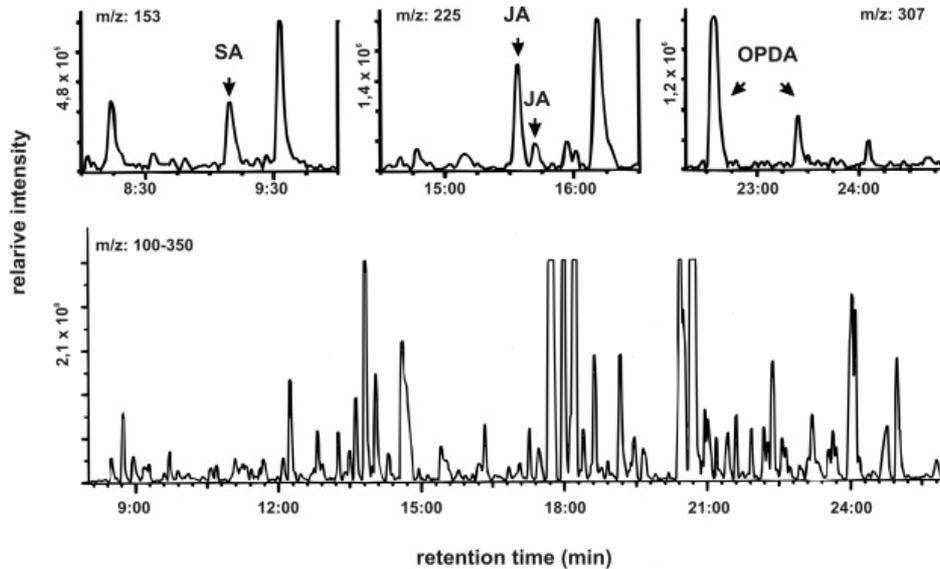


Abb. 38: GC/MS-Analyse eines methylierten Pflanzenextrakts im positiven CI-Modus. Bei der hier vermessenen Probe handelt es um einen Extrakt aus 100 mg unbehandelten *Arabidopsis*-Blättern. Dieser wurde mit TMS-Diazomethan methyliert, über VPE aufgereinigt und danach in 5 μ l aufgenommen. Davon wurden 2 μ l injiziert. Die oberen Chromatogramme zeigen die Massenspuren der Methyl-Salicylsäure (SA, $m/z = 153$), der Methyl-Jasmonsäure (JA, $m/z 225$) und der Methyl-OPDA (OPDA, $m/z 307$). Zum Vergleich ist im unteren Chromatogramm das Totalionenchromatogramm ($m/z 100$ bis 350 Da) dargestellt.

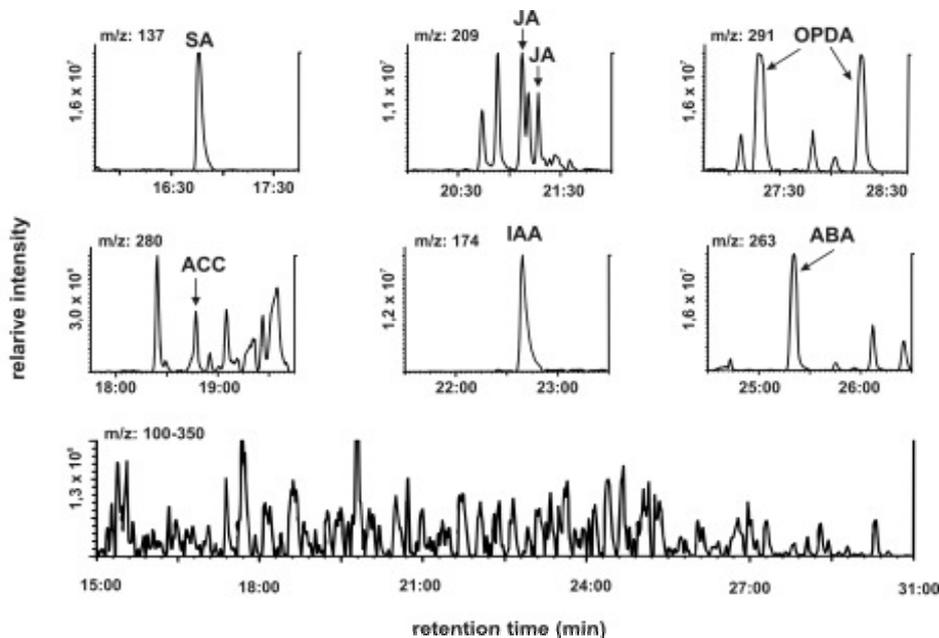


Abb. 39: GC/MS-Analyse eines mit Pentafluorbenzylbromid veresterten Pflanzenextrakts im negativ CI-Modus. Bei der hier vermessenen Probe handelt es um einen Extrakt aus 100 mg unbehandelten *Arabidopsis*-Blättern. Dieser wurde mit Pentafluorbenzylbromid verestert, über VPE aufgereinigt und danach in 20 μ l aufgenommen. Davon wurden 2 μ l injiziert. Die oberen Chromatogramme zeigen die Massenspuren der PFB-Salicylsäure (SA, $m/z 137$), PFB-Jasmonsäure (JA, $m/z 209$), PFB-OPDA (OPDA, $m/z 291$), PFB-ACC (ACC, $m/z 280$), PFB-Indoleessigsäure (IAA, $m/z 174$) und PFB-Abcisinsäure (ABA, $m/z 263$) bestimmt. Zum Vergleich ist im unteren Chromatogramm das Totalionenchromatogramm ($m/z 100$ bis 350 Da) dargestellt.

Die unterschiedlichen Signalintensitäten sowie die Signal-Rausch-Verhältnisse bei Messungen der Phytohormone im positiven und negativen CI-Modus sind in den Abbildungen 38 und 39 dargestellt. Anhand dieser Chromatogramme soll die Bestimmung der basalen Phytohormonspiegel von *Arabidopsis*-Blättern mittels GC/MS bei Messung im positiven bzw. im negativen chemischen Ionisationsmodus verglichen werden. Die Bestimmung von SA, JA und OPDA aus 100 mg unbehandelten *Arabidopsis*-Blättern ist als Methylester im positiv-CI-Modus zwar möglich, jedoch erhält man bei der Messung ein relativ hohes Grundrauschen. Ferner konnten in dieser Probe lediglich SA, JA und OPDA detektiert werden, jedoch nicht ACC, IAA und ABA. Die Messung im negativ-CI-Modus hingegen liefert wesentlich intensivere Peaks und bessere Signal-Rausch-Verhältnisse. Hier reicht für eine Bestimmung theoretisch 1 mg *Arabidopsis*-Blätter. Weiterhin ermöglicht sie auch zusätzlich die Bestimmung von ABA, ACC und IAA.

IV.3.2.6 Interne Standards

Um die Analyten im GC/MS zuverlässig quantifizieren zu können, werden interne Standards benötigt. Die internen Standards sollten der zu bestimmenden Substanz strukturell nahe verwandt sein und ähnliche physikochemische Eigenschaften und chemische Stabilität besitzen, der interne Standard das Verhalten des Analyten während der Analyse nachvollziehen muss. Generell sollten Isotopen-markierte Verbindungen als interne Standards bevorzugt werden. Dabei wird das identische Molekül verwendet, welches ein oder mehrere schwere Isotope wie Deuterium, ^{13}C oder ^{18}O enthält. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt, um im Molekül vorhandene Sauerstoff-Atome gegen das ^{18}O -Isotop auszutauschen (siehe Kapitel VI). Neben den Isotopen können auch strukturell ähnliche Verbindungen als interne Standards eingesetzt werden, bei welchen Doppelbindungen reduziert sind oder die Kohlenstoffkette verlängert oder verkürzt wurde. Hier muss allerdings ein Responsefaktor bestimmt werden, um strukturell bedingte Unterschiede in Löslichkeit, Siedepunkt, Ionisierbarkeit u.ä. auszugleichen.

In dieser Arbeit wurde für die Bestimmung der Salicylsäure D_4 -SA eingesetzt, welche aus dem Bestand des Lehrstuhls stammte und über die Kolbe-Schmidt-Synthese hergestellt worden war. Für OPDA und IAA wurden nach den in Kapitel VI beschriebenen Methoden $^{18}\text{O}_2$ -OPDA bzw. $^{18}\text{O}_3$ -OPDA und $^{18}\text{O}_2$ -IAA als interne Standards synthetisiert. Zur Bestimmung der Jasmonsäure wurde weiterhin die bislang benutzte selbst hergestellte Dihydrojasmonsäure (siehe IV.2.1.2) als interner Standard verwendet. Indoleessigsäure kann außerdem unter Verwendung von Indolpropionsäure (IPA) als internem Standard quantifiziert werden. Dafür wurde ein Responsefaktor ermittelt: Nach Aufarbeitung und Injektion gleicher Mengen von IAA und IPA wurde ein Peakflächenverhältnis IAA/IPA von 1,040 gefunden. Als interner Standard für ACC kann Norvalin verwendet werden, welches analog zu ACC bei der Derivatisierung zum norVal-bis-PFB reagiert. Auch hier wurde ein Responsefaktor bestimmt: Nach Aufarbeitung und Injektion gleicher Mengen von ACC und norVal wurde ein Peakflächenverhältnis ACC/norVal von 0,615 ermittelt. Zur Bestimmung von ABA wurde versucht, [Ring-D] $_6$ -ABA als internen Standard einzusetzen, wie es bereits für GC/MS-Analysen im EI-Modus beschrieben war (Müller et al., 2002). Da sich diese Markierung gegenüber der chemischen Ionisation jedoch als nicht stabil erwies, konnte der Standard für unsere Zwecke nicht eingesetzt werden. Deshalb wurde für die Quantifizierung der ABA H_2 -JA als interner Standard herangezogen und ein Responsefaktor bestimmt. Nach Aufarbeitung und Injektion gleicher Mengen ergab sich ein Peakflächenverhältnis ABA/ H_2 -JA von 3,893.

IV.3.2.7 Reproduzierbarkeit der Methode

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu erfassen, wurden 6 identische Aufarbeitungen aus dem gleichen Material durchgeführt und die gefundenen Metabolitkonzentrationen miteinander verglichen. Dazu wurden je 100 mg unbehandelte Arabidopsis-Blätter mit 950 µl Methanol und 50 µl Eisessig (siehe IV.2.2.1) extrahiert. Als interne Standards wurden 50 ng H₂-JA für die Quantifizierung von JA und ABA, 50 ng D₄-SA für die Quantifizierung von SA, 50 ng [¹⁸O]₃-OPDA für die Quantifizierung von OPDA, 50 ng Norvalin für die Quantifizierung von ACC sowie [¹⁸O]₂-IAA und IPA für die Quantifizierung von IAA zugegeben. Zur Quantifizierung der gesättigten Fettsäuren wurden jeweils 500 ng der jeweiligen [¹⁸O]-markierten Standards hinzugefügt und für die Quantifizierung der ungesättigten Fettsäuren 500 ng Margarinsäure. Der erhaltene Extrakt wurde getrocknet und mit Pentafluorbenzylbromid verestert (siehe III.3.3). Danach wurde die VPE wie in Kap. IV.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 wiedergegeben.

Tab. 30: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von Phytohormonen und Fettsäuren.

Quantifizierung von 6 gleichen Pflanzenproben			
	Mittelwert [ng/g TG]	S.D.	V.C. [%]
JA	189,5	11,1	5,9
OPDA	207,3	16,5	8,0
IAA^a	16,2	4,2	26,1
IAA^b	42,5	12,6	29,7
ABA	25,7	4,5	17,5
ACC	350,5	120,6	34,4
SA	110,0	23,4	21,3

Die Aufarbeitung wurde mit 100 mg unbehandelten Blättern von 7 Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen durchgeführt. Als Testsubstanzen dienen die Phytohormone sowie die Fettsäuren. Zur Quantifizierung wurden 50 ng H₂-JA, 50 ng [¹⁸O]₂-OPDA, 50 ng D₄-SA, 50 ng [¹⁸O]₂-IAA, 100 ng IPA eingesetzt. Indolessigsäure wurde sowohl über [¹⁸O]₂-IAA = IAA^a, als auch über IPA = IAA^b quantifiziert. Die Proben wurden mit 1000 µl Methanol / Eisessig (95:5, v/v) in der Kugelmühle extrahiert und anschließend der Pentafluorbenzyl-Ester gebildet. Danach wurde die VPE (3 min 250°C) durchgeführt. Als Ergebnisse sind der absolute Gehalt in den Proben (Mittelwert aus 6 Bestimmungen) in ng/g Frischgewicht angegeben, sowie die absolute (S.D.) und die prozentuale Standardabweichung = Variationskoeffizient (V.C.).

Für die meisten Analyten wurde ein Variationskoeffizient (V.C.) von < 30 % ermittelt. Indolessigsäure wurde sowohl über [¹⁸O]₂-Indolessigsäure als auch über Indolpropionsäure quantifiziert, wobei sich trotz Einrechnung der Responsfaktoren ein deutlicher Unterschied von über 50 % ergibt. Insgesamt ist diese Methode jedoch als reproduzierbar zu beurteilen und die erhaltene Präzision ist in Ordnung.

IV.3.2.8 Bewertung der Methode

Viele GC/MS basierte Analysemethoden benutzen zur Probenvorbereitung einen oder mehrere Festphasenextraktionsschritte. Das Aufreinigungsprinzip der Festphasenextraktion (SPE) sind die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (v.a. Polarität) von Analyten und Begleitstoffen. Bei der SPE kann man durch Anwendung unterschiedlicher Adsorbenzien (Si-OH, NH₂, RP-18) und verschiedener Elutionsmittel aus einem Gemisch einen bestimmten Analyten in sehr reiner Form erhalten. Allerdings muss man hier Analyten mit unterschiedlicher Polarität in verschiedenen Fraktionen eluieren, da man sonst ein zu breites Spektrum an Substanzen erhält, das noch zu viele störende Begleitstoffe beinhaltet. Eine spätere Vereinigung dieser Fraktionen würde das Ergebnis der vorangegangenen Aufreinigung zunichte machen. Das Trennprinzip der Gasphasenextraktion (VPE) hingegen beruht auf unterschiedlichen Siedepunkten der Analyten. Mit der VPE werden vor allem die störenden Hauptkomponenten der Matrix (Chlorophyll, Fette, Proteine) und andere bei der Derivatisierung nicht mit-erfasste Komponenten abgetrennt. Sämtliche flüchtige Verbindungen (derivatisierte Analyten und andere verdampfbare Pflanzeninhaltsstoffe) werden in einer Fraktion erhalten. In der Regel reicht diese Aufreinigung aus, um nach GC-Trennung Massenspektren mit hinreichend isolierten und gut integrierbaren Peaks zu erhalten. Weiterhin ist es vorteilhaft, dass nach der VPE definitiv keine schwerflüchtigen Substanzen mehr vorhanden sind, welche die GC-Säule irreversibel verschmutzen und damit schädigen könnten.

Das ursprüngliche Protokoll von Schmelz et al. wurde an einigen Stellen optimiert. So wurde die Extraktion variiert, um ein noch breiteres Spektrum an Analyten zu erhalten. Das hier verwendete Extraktions-Lösungsmittel Methanol und 5 % Essigsäure scheint der ideale Kompromiss zu sein, da es sowohl polare Substanzen wie Aminosäuren als auch unpolare Komponenten wie Fettsäuren gut lösen kann. So sollten selbst in der Kälte sämtliche relevanten Pflanzeninhaltsstoffe innerhalb von 5 Minuten mit einer guten Ausbeute gelöst werden. Außerdem wurde eine schnellere Probenvorbereitung erzielt und die Proben sind nach 3 h fertig für die GC/MS Analyse. Weiterhin wurde eine Verbesserung der Nachweisgrenze erreicht und bei einer Messung im NCI-Modus sind Pflanzenmengen von 1 mg ausreichend, um die beschriebenen Phytohormone bestimmen zu können. Diese Methode besitzt gegenüber den früher angewandten Methoden (IV.3.1) einige deutliche Vorteile: Mit dieser Probenvorbereitung bietet sich die Möglichkeit, viele Analyten gleichzeitig zu bestimmen. Weiterhin kann die Probenvorbereitung auf nur einen Aufreinigungsschritt verkürzt werden, was auch die Gesamtdauer der Probenvorbereitung merklich verkürzt. Dadurch wird außerdem die Wiederfindungsrate gesteigert und somit kann weniger Pflanzenmaterial (1 – 20 mg) eingesetzt werden. Allerdings gehen bei dieser Aufarbeitung flüchtige Verbindungen verloren.

Mit dieser Methode konnten auch ABA, ACC und IAA aus 50 mg Pflanzenmaterial bestimmt werden, was mit den bisher angewandten Festphasenextraktionsmethoden nicht möglich war. Somit konnte die Kinetik der Phytohormone nach Pst-Infektion um ABA und IAA erweitert werden (Abb. 40 und 41).

Neben der Analytik von Phytohormonen ist mit dieser Methode zusätzlich die Bestimmung von Fettsäuren und weiteren Oxylipinen wie Hydroxyfettsäuren und Ketofettsäuren möglich. Bei den letztgenannten Verbindungen müssen allerdings zusätzlich zur Carboxylgruppe noch die Hydroxylgruppen derivatisiert werden, weil diese Substanzen sonst nicht flüchtig sind.

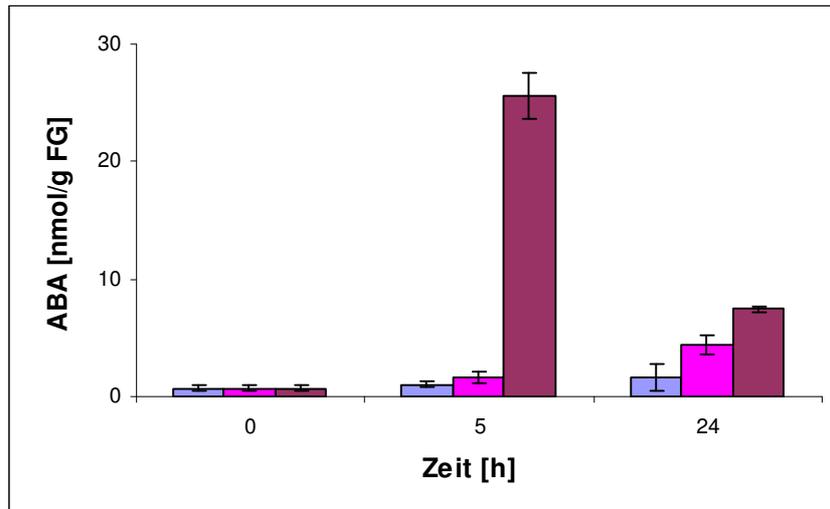


Abb. 40: Anstieg von Abscisinsäure (ABA) in Arabidopsis-Blättern nach Infektion mit Pseudomonaden. Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden vollständig entweder mit 10 mM MgCl₂-Lösung (■), mit einer Bakteriensuspension von virulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 (■) oder avirulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 + RPM1 (■) jeweils in einer Konzentration von 10⁸ KBE in 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Die Ernte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 5h, und 24h nach der Infektion (siehe III.1.1). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

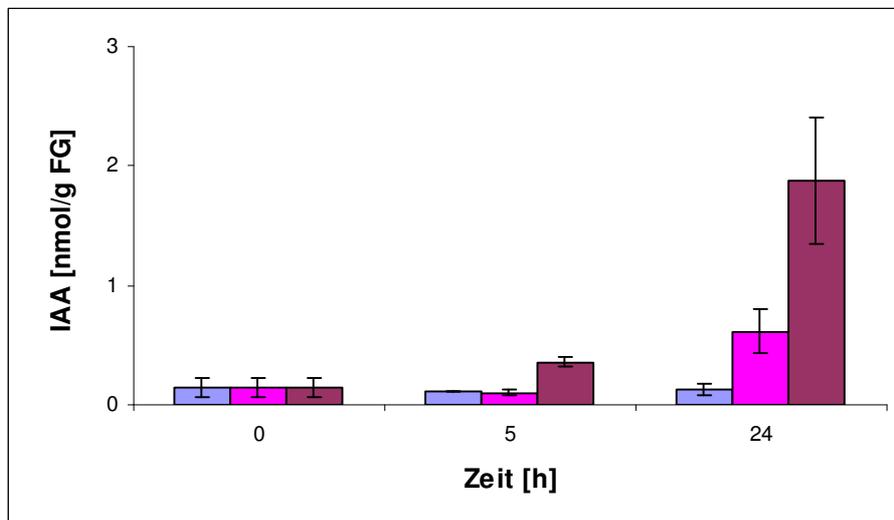


Abb. 41: Anstieg von Indoleessigsäure (IAA) in Arabidopsis nach Infektion mit Pseudomonaden. Blätter von 8 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden vollständig entweder mit 10 mM MgCl₂-Lösung (■), mit einer Bakteriensuspension von virulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 (■) oder avirulenten *Pseudomonas syringae* path. tomato DC 3000 + RPM1 (■) jeweils in einer Konzentration von 10⁸ KBE in 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert. Die Ernte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 5h, und 24h nach der Infektion (siehe III.1.1). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

IV.3.3 Bestimmung von org. Säuren und Aminosäuren

Zur Beurteilung einiger physiologischer Prozesse (Wachstum und Entwicklung, Reaktionen auf Reize, Änderungen im Stoffwechsel bei Auftreten von Stressfaktoren u.ä.) ist neben der Bestimmung der Signalstoffe auch die Bestimmung von Metaboliten des Primärstoffwechsels von Interesse und kann wichtige Informationen über Reaktionen von Pflanzen liefern. In diesem Zusammenhang sollten Methoden zur Bestimmung von freien Säuren und Aminosäuren aus Pflanzenmaterial entwickelt werden. Gegenstand dieser Arbeit war zum einen die direkte quantitative Analyse von organischen Säuren und Aminosäuren eines Pflanzenextrakts als auch der Vergleich zweier Zustände, wie beispielsweise Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen oder ein Vergleich der Metabolitkonzentrationen von jungen Blättern mit alten Blättern.

Zur simultanen Bestimmung von organischen Säuren und Aminosäuren müssen die einzelnen Verbindungen extrahiert, aufgereinigt und analysiert werden. Da die interessierenden Substanzklassen chemisch sehr inhomogen sind, sollten mit dem verwendeten Extraktionsmittel sowohl hydrophile als auch lipophile Analyten erfasst werden können. Die in Abschnitt IV.1.2.1 beschriebene Extraktion mit Methanol / Eisessig (95:5, v/v) ist auch für Aminosäuren und Zucker gut geeignet. Deshalb wurde dieses Verfahren auch in den folgenden Bestimmungen eingesetzt. Eine gute Methode zur Abtrennung unerwünschter Begleitstoffe ist die VPE (siehe Kap. IV.3.2). Aus diesem Grund wurde versucht, die Bestimmung möglichst vieler Metaboliten in das System der VPE/GC-MS mit einzugliedern. Zur Analytik von organischen Säuren kann die in Kapitel IV.2.2 beschriebene Methode unverändert angewendet werden. Dabei extrahiert man die Pflanzen mit Methanol / Eisessig (95:5, v/v) und derivatisiert die Analyten zum Methyl- oder PFB-Ester. Anschließend reinigt man den Extrakt über VPE auf und analysiert die Probe mittels GC/MS. Mit dieser Bestimmung kann man sämtliche Fettsäuren von C:12 bis C18:3 sowie Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Fumarsäure, Ketoglutarinsäure und Oxaloesigsäure erfassen. Um auch Aminosäuren mit der beschriebenen GC/MS-Methode untersuchen zu können, muss bei diesen neben der Säuregruppe allerdings auch die Aminogruppe derivatisiert werden (siehe V.2.3.3).

Unter den angewandten GC/MS-Bedingungen wurden für die organischen Säuren folgende Retentionszeiten ermittelt: Laurinsäure-Me: m/z = 215, RT = 13:48, Laurinsäure-PFB: m/z = 199, RT = 19:48, Myristinsäure-Me: m/z = 243, RT = 16:16, Myristinsäure-PFB: m/z = 227, RT = 21:44, Palmitinsäure-Me: m/z = 271, RT = 18:32, Palmitinsäure-PFB: m/z = 255, RT = 23:31, Margarinsäure-Me: m/z = 285, RT = 19:35, Margarinsäure-PFB: m/z = 269, RT = 24:22, Stearinsäure-Me: m/z = 299, RT = 20:37, Stearinsäure-PFB: m/z = 283, RT = 25:11, Ölsäure-Me: m/z = 297, RT = 20:25, Ölsäure-PFB: m/z = 281, RT = 25:01, Linolsäure-Me: m/z = 295, RT = 20:23, Linolsäure-PFB: m/z = 279, RT = 25:01, Linolensäure-Me: m/z = 293, RT = 20:28, Linolensäure-PFB: m/z = 277, RT = 25:07, Palmitoleinsäure-Me: m/z = 269, RT = 18:25, 16:2-Me: m/z = 267, RT = 18:22, 16:3-Me: m/z = 265, RT = 18:27, Me-Äpfelsäure: m/z = 163, RT = 07:52, Me-Äpfelsäure-H₂O: m/z = 145, RT = 06:05, Me-Bernsteinsäure: m/z = 147, RT = 06:11, Me-Citronensäure: m/z = 235, RT = 13:09, Me-Fumarsäure: m/z = 145, RT = 06:03, Me-Ketoglutarinsäure: m/z = 175, RT = 09:31, Me-Oxaloesigsäure: m/z = 175, RT = 09:19.

D₃-methylierte Verbindungen wurden einige Sekunden früher eluiert.

Alternativ zur GC/MS-Analyse können die freien oder methylierten Aminosäuren auch über LC/MS bestimmt werden. Dafür müssen diese allerdings von den organischen Säuren abgetrennt werden. Um die Aminosäuren von den Fettsäuren abzutrennen, wird die Probe in 50 µl 0,1M Ameisensäure aufgenommen und 300 µl Ethylacetat hinzugefügt. Dabei reichern sich die Aminosäuren in der Wasserphase und die Fettsäuren in der organischen Phase an. Nach kurzem Zentrifugieren (1 min bei 14000 rpm) werden aus der unteren Phase 30µl zur Bestimmung der Aminosäuren und aus der oberen Phase 250 µl zur Bestimmung der Fettsäuren abgenommen. Zur Bestimmung der Aminosäuren können 10µl der 30µl direkt ins LC/MS injiziert werden. Die Ethylacetatfraktion mit den Fettsäuren wird noch über VPE aufgereinigt, bevor ein Aliquot davon ins GC/MS injiziert wird. Prinzipiell sind mittels LC/MS alle Aminosäuren erfassbar. Praktisch konnten in Pflanzen weder Asparaginsäure noch Glutaminsäure noch Cystein gefunden werden.

Für die Bestimmung von Aminosäuren wurden folgende LC/MS-Bedingungen angewandt:

HPLC-Anlage: Surveyor
 Säule: Purospher-Säule Star® 250 x 2 mm C18e (5µm)
 Fließmittel: A: 0,1 % Ameisensäure
 B: Methanol

Gradient:

Zeit	Flussrate [µl/min]	%A	%B
0	150	100.0	0.0
5.0	150	100.0	0.0
15.0	150	0.0	100.0
25.0	150	0.0	100.0

PDA: Wellenlängen (A) 214.0 nm, (B) 254.0 nm und (C) 290.0 nm
 Direct Valve: 0.00-35.00 min in die Ionenquelle
 MS: Deca XP Plus mit Ionenfalle von Thermo-Finnigan
 MS Run Time: 35.00 min
 Scan Events:
 1: MS: positive Ionen, gescannter Ionenbereich 50.0-300.0 Da

Für die freien Aminosäuren wurden folgende Retentionszeiten ermittelt:

Glycin: m/z = 76, RT = 3:99, Alanin: m/z = 90, RT = 4:14, Serin: m/z = 106, RT = 4:04, Prolin: m/z = 116, RT = 4:46, Valin: m/z = 118, RT = 5:66, Threonin: m/z = 120, RT = 4:19, Cystein: m/z = 122, RT = 4:69, Leucin: m/z = 132, RT = 10:27, Isoleucin: m/z = 132, RT = 10:62, Asparagin: m/z = 133, RT = 4:17, Asparaginsäure: m/z = 134, RT = 6:39, Lysin: m/z = 147, RT = 3:58, Glutamin: m/z = 147, RT = 5:06, Glutaminsäure: m/z = 148, RT = 4:27, Methionin: m/z = 150, RT = 7:04, Histidin: m/z = 156, RT = 3:56, Phenylalanin: m/z = 166, RT = 16:30, Arginin: m/z = 175, RT = 3:71, Tyrosin: m/z = 182, RT = 10:09, Tryptophan: m/z = 205, RT = 17:49, Cystin: m/z = 241, RT = 3:96.

Für die methylierten Aminosäuren wurden folgende Retentionszeitenermittelt:

Me-Glycin: $m/z = 90$, RT = 3:96, Me-Alanin: $m/z = 104$, RT = 4:70, Me-Serin: $m/z = 120$, RT = 4:06, Me-Prolin: $m/z = 130$, RT = 5:63, Me-Valin: $m/z = 132$, RT = 14:39, Me-Threonin: $m/z = 134$, RT = 4:65, Cystein: $m/z = 136$, RT = 6:02, Me-Leuin: $m/z = 146$, RT = 16:61, Me-Isoleucin: $m/z = 146$, RT = 16:77, Me-Asparagin: $m/z = 147$, RT = 5:06, Me₂-Asparaginsäure: $m/z = 162$, RT = 7:09, Me-Lysin: $m/z = 147$, RT = 3:58, Me-Glutamin: $m/z = 161$, RT = 4:61, Me₂-Glutaminsäure: $m/z = 176$, RT = 10:33, Me-Methionin: $m/z = 164$, RT = 15:24, Me-Histidin: $m/z = 170$, RT = 3:35, Me-Phenylalanin: $m/z = 180$, RT = 17:22, Me-Arginin: $m/z = 189$, RT = 3:50, Me-Tyrosin: $m/z = 196$, RT = 15:99, Me-Tryptophan: $m/z = 219$, RT = 17:57, Cystin: $m/z = 255$, RT = 3:94.

Mit den hier entwickelten Methoden soll eine Vielzahl von Analyten erfasst werden. Aus diesem Grund kann zur Quantifizierung nicht für jeden zu bestimmenden Analyten ein isotope markierter Standard eingesetzt werden. Bei der Metabolitanalytik wird in der Regel eine im Pflanzenextrakt nicht vorhandene Substanz als universeller interner Standard für sämtliche Analyten eingesetzt. Beim Vergleich zweier Pflanzenextrakte sollte ebenfalls ein interner Standard zur Abschätzung von Substanzverlusten oder Unterschieden in der Reaktionsausbeute eingesetzt werden. Für diesen Zweck sind strukturanaloge Komponenten, welche in der Pflanze natürlicherweise nicht vorkommen, gut geeignet. Als interner Standard für die Quantifizierung von Fettsäuren kann Margarinsäure eingesetzt werden. Margarinsäure ist eine synthetische gesättigte Fettsäure mit 17 Kohlenstoffatomen (C17:0), welche in der Natur nicht vorkommt. Zur Quantifizierung der verschiedenen Fettsäuren über Margarinsäure muss jeweils ein Responsefaktor mit eingerechnet werden. Als interner Standard für die Aminosäurebestimmung könnte wie für die Bestimmung von ACC (siehe IV.2.5) Norvalin verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Methoden gesucht, möglichst viele Analyten auf ein Mal bestimmen und wenn möglich quantifizieren zu können. Andererseits sollten auch Methoden zur vergleichenden Quantifizierung entwickelt werden. Dieses Problem kann durch stabile Isotopenmarkierung gelöst werden, indem ein Kontrolleextrakt markiert wird und später mit dem Testextrakt vermischt und gemeinsam analysiert wird (Fukusaki und Kobayashi, 2005). Beispielsweise werden die Metaboliten des einen Extraktes mit Deuterium markiert, anschließend beide Extrakte vermischt und zusammen ins GC/MS oder LC/MS injiziert. Im Chromatogramm werden die Peakflächen der deuterierten Metaboliten mit den Peakflächen der unmarkierten Metaboliten des anderen Extraktes verglichen. Somit können Konzentrationsunterschiede der einzelnen Metaboliten zwischen den beiden Extrakten bestimmt werden. Nachfolgend werden verschiedene Derivatisierungsreaktionen vorgestellt, mit welchen deuterierte Derivate der gesuchten Metaboliten erzeugt werden können.

IV.3.3.1 Methylierung mit normalem und deuteriertem TMS-Diazomethan

Eine Möglichkeit zur Gewinnung deuterierter Derivate ist die Verwendung von deuteriertem Diazomethan. Deuteriertes TMS-Diazomethan kann leicht aus normalem TMS-Diazomethan hergestellt werden. Dazu werden 5 µl TMS-Diazomethan in 100 µl MeOD verdünnt und dieses Gemisch 5 min vorinkubiert. Dabei erreicht man im Reagenz durchschnittlich folgenden Markierungsgrad: ~ 74 % D₃-TMS-Diazomethan, ~ 28 % D₂-TMS-Diazomethan, ~ 0,5 % D-TMS-Diazomethan sowie < 0,1 % unmarkiertes TMS-Diazomethan. Von dieser Methylierung

runungslösung werden 25 µl zu der in 200 µl Diethylether und 100 µl Methanol gelösten Probe zugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird nichtumgesetztes Diazomethan mit 2µl Eisessig zerstört. Für die Derivatisierung der Referenzprobe wird das Diazomethan-Reagenz in normalem Methanol angesetzt. Alle anderen Schritte verlaufen analog zur ersten Probe. Nach der Zugabe des Eisessigs können beide Proben vereinigt und gemeinsam aufgearbeitet werden.

Die Methylierung mit TMS-Diazomethan hat den Vorteil, dass sie schonend und ohne die Anwendung extremer Bedingungen verläuft. Deshalb können mit dieser Methode auch weniger stabile Verbindungen wie beispielsweise OPDA erfasst werden.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu untersuchen, wurden 100 mg unbehandelten Arabidopsis-Blätter mit MeOH/Eisessig (95:5, v/v) in der Kugelmühle extrahiert. Als interner Bezugsstandard zum Ausgleich von Volumenunterschieden oder verschiedenen Reaktionsausbeuten wurde 500 ng Margarinsäure zugegeben. Dieser Extrakt wurde in zwei gleiche Hälften geteilt, welche jeweils mit deuteriertem bzw. unmarkiertem Diazomethan derivatisiert wurden. Nach der Zugabe des Eisessigs wurden beide Teile wieder vereinigt und der Extrakt wurde über die VPE aufgereinigt. Danach erfolgte die Bestimmung der Fettsäuren und der Phytohormone mittels GC-CI-MS. Anschließend wurde jeweils die Peakfläche der 3-fach deuterierten Substanz mit der Peakfläche der unmarkierten Substanz verglichen und das Verhältnis unmarkiert zu deuteriert bestimmt. Im idealen Fall sollten die Flächenverhältnisse der einzelnen Analyten gleich dem Flächenverhältnis des internen Standards Margarinsäure sein. Deshalb wurden zur besseren Übersicht alle Flächenverhältnisse auf das Verhältnis des internen Standard Margarinsäure normiert (N/D [MA]). Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung des normierten Peakflächenverhältnisses bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 31 aufgelistet.

Tab. 31: Reproduzierbarkeit der Methylierung mit MeOH/TMS-Diazomethan im Vergleich zur Methylierung mit MeOD/TMS-Diazomethan bei Fettsäuren und Phytohormonen.

	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	MW ± S.D.	V.C. [%]
	1	2	3		
Myristinsäure-Me	1,77	2,13	2,14	2,01 ± 0,21	10,30
Palmitinsäure-Me	1,63	1,45	1,57	1,50 ± 0,09	6,02
Stearinsäure-Me	1,47	1,70	1,88	1,69 ± 0,21	12,27
Ölsäure-Me	2,48	1,95	2,10	2,18 ± 0,27	12,60
Linolsäure-Me	1,29	1,27	1,27	1,28 ± 0,01	0,69
Linolensäure-Me	1,11	0,93	1,24	1,09 ± 0,16	14,30
Me-SA	0,47	1,23	0,89	0,86 ± 0,38	44,23
Me-JA	n.d.	0,93	1,57	1,25 ± 0,45	36,20
Me-OPDA	0,59	0,54	0,71	0,61 ± 0,09	14,23

Die Aufarbeitung wurde dreimal mit je 100 mg unbehandelten Arabidopsis-Blättern durchgeführt, der erhaltene Extrakt geteilt und mit MeOH/TMS-Diazomethan bzw. MeOD/TMS-Diazomethan 1 min bei RT derivatisiert. Die Fettsäuren und die Phytohormone wurden mittels GC-CI-MS vermessen. Das dabei erhaltene Verhältnis der Peakfläche der unmarkierten Verbindung zur Peakfläche der deuterierten Verbindung (N/D) wurde jeweils bezüglich des internen Standards Margarinsäure normiert (N/D [MA]). Für alle 3 Bestimmungen ist das Verhältnis der Peakflächen der normalen zur deuterierten Substanz angegeben, weiterhin der berechnete Mittelwert aus den 3 Bestimmungen sowie die absoluten (S:D.) und der Variationskoeffizient (V.C.).

Wie aus Tab. 31 hervorgeht, funktioniert diese Methode der Probenaufarbeitung reproduzierbar: In Testversuchen mit zwei identischen Vergleichslösungen ergaben sich für die Fettsäuren Abweichungen vom Verhältnis Analyt-Me/Analyt-Me-D₃ der Margarinsäure, welche im Bereich von $\pm 50\%$ lagen. Das zeigt, dass diese Methode grundsätzlich anwendbar ist.

Diese Methode wurde bereits an einem praktischen Beispiel getestet. Sie wurde zur Bestimmung von freien Fettsäuren und Phytohormonen in *Arabidopsis* nach Verwundung eingesetzt (Abb. 42).

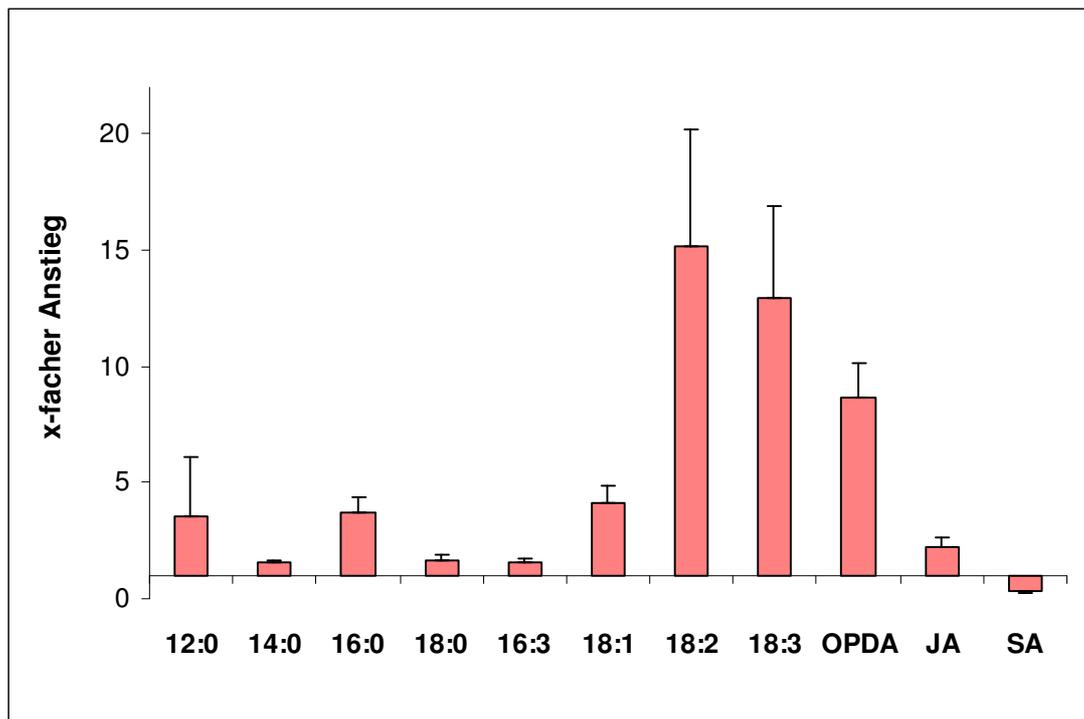


Abb. 42: Vergleichende Bestimmung von freien Fettsäuren und Phytohormonen in unbehandelten und verwundeten Blättern: Relativer Anstieg der Metabolitkonzentrationen. Von zwei gleich alten *Arabidopsis*-Blättern (Pflanzen ca. 8 Wochen alt) wurde eines mit einem Nadelkissen verwundet. Nach 1h erfolgte die Extraktion mit Methanol / Essigsäure (95:5, v/v) und die Derivatisierung mit normalem bzw. deuteriertem Diazomethan. Die derivatisierten Extrakte wurden über VPE aufgereinigt und die freien Fettsäuren sowie Jasmonsäure mittels GC-MS vermessen. Danach wurde das Verhältnis der Peakflächen von unmarkierter zu deuterierter Verbindung bestimmt und auf die Verhältnisse des Volumenstandards Margarinsäure normiert. Die so erhaltenen Werte entsprechen direkt dem Anstieg der Metabolit-Konzentrationen durch Verwundung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.D.

Für diesen Zweck wurden zwei gleich alte, gegenüberliegende *Arabidopsis*-Blätter ausgewählt und jeweils eines davon mit einem Nadelkissen (siehe III.1.2) perforiert. Nach 1h wurden beide Blätter abgeerntet und die jeweiligen Konzentrationen an freien Fettsäuren, SA, JA und OPDA miteinander verglichen. Dazu wurden beide Blätter jeweils in der Kugelmühle mit MeOH/Eisessig (95:5, v/v) extrahiert. Als interner Korrekturstandard wurden 500 ng Margarinsäure zugegeben. Anschließend wurde der Extrakt aus dem unbehandelten Kontrollblatt mit deuteriertem Diazomethan und der Extrakt des verwundeten Blattes mit unmarkiertem Diazomethan derivatisiert. Nach der Zugabe des Eisessigs wurden beide Extrakte vereinigt und die Probe wurde über die VPE aufgereinigt. Danach erfolgte die Bestimmung der Fettsäu-

ren sowie der Phytohormone mittels GC-MS. Die Peakflächen der unmarkierten Substanz wurden jeweils zu den Peakflächen der deuterierten Substanz ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde das Verhältnis für jede Substanz auf das Verhältnis der Margarinsäure normiert, um eventuelle Volumenunterschiede oder Unterschiede in der Reaktionsausbeute o.ä. auszugleichen. Dadurch erhält man direkt den Faktor, um welchen sich die Konzentrationen des entsprechenden Analyten bei der Verwundung ändern. Die jeweiligen Werte wurden als x-facher Anstieg in Abb. 42 dargestellt.

Mit dieser Methode war eine reproduzierbare Bestimmung der Fettsäuren sowie der Phytohormone OPDA, JA und SA möglich. IAA und ABA konnten mit dieser Analytik nicht erfasst werden. Die Messung konnten den direkten Vergleich zweier Proben (behandelt und unbehandelt) liefern. Dabei wurde gezeigt, dass bei der Verwundung die Konzentration an freien Fettsäuren ansteigt, und zwar insbesondere die von Linol- und Linolensäure. Des Weiteren findet ein signifikanter Anstieg der Konzentration von OPDA und eine geringe Zunahme der Jasmonsäure-Konzentration statt, wohingegen der Gehalt an Salicylsäure abnimmt. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, denn es ist bekannt dass nach Verwundung eine Freisetzung von Fettsäuren sowie Jasmonaten stattfindet.

IV.3.3.2 Derivatisierung von Fettsäuren und Aminosäuren mittels MeOH / AcCl

Alternativ zur Methylierung mit Diazomethan können Säuren auch mit Methanol und Acetylchlorid methyliert werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass das Acetylchlorid in Methanol Salzsäure freisetzt, woraufhin es zur säurekatalysierten Veresterung mit Methanol kommt. Dazu werden die Extrakte in 25 µl MeOH bzw. CD₃OD aufgenommen, 2,5 µl Acetylchlorid hinzugegeben und 60 min bei 80°C inkubiert. Danach werden die Reste der Reagenzien durch Trocknen in der Speedvac entfernt. Allerdings werden mit dieser Methode auch die Wasserstoffe acider C-Atome oder die Protonen von Hydroxyl-, Amino- oder Sulfhydrylgruppen ausgetauscht. Diese Markierung ist jedoch reversibel, weshalb austauschbare Markierungen mit 10 µl Eisessig zurückgetauscht werden müssen. Dazu wird die trockene Probe in 20 µl Eisessig aufgenommen und in der Speedvac zur Trockene gebracht. Dieser Prozess muss dreimal durchgeführt werden. Bei den hier angewandten Derivatisierungsbedingungen werden allerdings die Wasserstoffe acider C-Atome irreversibel ausgetauscht, und für manche Verbindungen ergibt sich eine Schar mehrfach deuterierter Markierungsprodukte. Nachteilig bei dieser Methode ist sicherlich die Anwendung extremer Reaktionsbedingungen, die zur Degradation säurelabiler und thermisch instabiler Substanzen führen könnten. Ferner kann bei Verbindungen mit austauschbaren Wasserstoffen an Carbonyl- oder Hydroxygruppen wie beispielsweise den Jasmonaten eine multiple Deuterierung auftreten, welche zu einem merklichen Empfindlichkeitsverlust führt. Für solche Verbindungen ist diese Methode daher nicht geeignet.

Die Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde anhand der Bestimmung von Aminosäuren und Fettsäuren in einem Extrakt aus Arabidopsis-Blättern untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Tab. 32: Reproduzierbarkeit der Methylierung mit MeOH /AcCl im Vergleich zur Methylierung mit MeOD /AcCl bei Aminosäuren und Fettsäuren.

	Verhältnis Peakflächen N/D	Verhältnis Peakflächen N/D [Verhältnis Peakflächen N/D	MW ± S.D.	V.C. [%]
Glycin	1,13	n.d.	0,97	1,05 ± 0,11	11
Alanin	0,94	1,22	1,09	1,08 ± 0,14	13
Serin	1,10	1,25	1,03	1,13 ± 0,11	10
Prolin	1,09	0,84	1,03	0,98 ± 0,13	13
Valin	0,93	n.d.	0,99	0,96 ± 0,04	4
Threonin	0,95	1,25	0,87	1,02 ± 0,20	19
(Iso)leucin	0,86	0,86	0,69	0,81 ± 0,10	12
Lysin	0,97	n.d.	1,28	1,12 ± 0,22	19
Glutamin	1,04	1,05	1,01	1,04 ± 0,02	2
Histidin	n.d.	0,77	1,20	0,99 ± 0,30	31
Phenylalanin	0,72	1,08	0,73	0,84 ± 0,21	25
Tyrosin	1,08	0,91	1,43	1,14 ± 0,27	23
Tryptophan	0,73	0,72	0,51	0,66 ± 0,12	19
	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]		
Laurinsäure	0,94	n.d.	0,78	0,86 ± 0,11	13
Myristinsäure	1,01	1,53	1,33	1,29 ± 0,26	21
Palmitinsäure	0,94	0,98	1,11	1,01 ± 0,09	9
Stearinsäure	1,06	1,07	1,57	1,23 ± 0,29	24
Ölsäure-Me	1,35	1,31	1,65	1,44 ± 0,19	13
Linolsäure	0,83	1,49	0,94	1,09 ± 0,35	33
Linolensäure-	0,78	1,29	0,92	1,00 ± 0,26	26

Die Aufarbeitung wurde dreimal mit 100 mg unbehandelten *Arabidopsis*-Blättern durchgeführt. Diese wurden jeweils mit 2000 µl Methanol / Essigsäure (95:5, v/v) extrahiert, der erhaltene Extrakt geteilt und mit Methanol/Acetylchlorid bzw. D₃-Methanol/Acetylchlorid 1h bei 75°C derivatisiert. Die Aminosäuren wurden mittels LC/MS und die Fettsäuren sowie die Jasmonate mittels GC-Cl-MS vermessen. Dabei ist für die Aminosäuren das Verhältnis der Peakflächen der normalen zur deuterierten Substanz angegeben (N/D), für die Fettsäuren wurde dieser Response auf den des internen Standards Margarinsäure normiert (N/D [MA]). Für alle 3 Bestimmungen ist das Verhältnis der Peakflächen der normalen zur deuterierten Substanz angegeben, weiterhin der berechnete Mittelwert aus den 3 Bestimmungen (MW) sowie die Standardabweichung (S.D.) und der Variationskoeffizient (V.C.).

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Methode wurden 200 mg unbehandelte *Arabidopsis*-Blätter in der Kugelmühle mit 2000 µl Methanol / Essigsäure (95:5, v/v) extrahiert, wobei als interner Standard 500 ng Margarinsäure zugegeben wurde. Danach wurde der Extrakt in zwei gleiche Teile aufgeteilt und jeweils die eine Hälfte mit MeOH und die andere Hälfte mit CD₃OD derivatisiert. Danach wurden die beiden Hälften wieder vereinigt und austauschbare Markierungen mit Essigsäure rückgetauscht. Anschließend wurde die Probe in 50 µl 0,1M Ameisensäure aufgenommen und 300 µl Ethylacetat hinzugefügt. Nach kurzem Zentrifugieren (1 min bei 14000 rpm) wurden aus der unteren Phase 30µl zur Bestimmung der Aminosäuren und aus der oberen Phase 250 µl zur Bestimmung der Fettsäuren abgenommen.

Die Aminosäuren wurden aus 10 µl der Wasserphase mittels LC/MS bestimmt. Zur Bestimmung der Fettsäuren wurde die Ethylacetatfraktion noch über VPE aufgereinigt. Danach wurde die Probe in 20 µl Hexan aufgenommen und 2 µl davon mittels GC/MS vermessen. Die erhaltene Peakfläche der deuterierten Substanz wurde jeweils zu der Peakfläche der unmarkierten Substanz ins Verhältnis gesetzt (N/D), wobei sich im Idealfall der Wert 1 ergeben sollte. Um Volumenunterschiede sowie Unterschiede von Reaktionsausbeuten auszugleichen, wurde bei den Fettsäuren dieses Verhältnis auf das Verhältnis des internen Standards Margarinsäure normiert. Dabei sollte das bei der Messung erhaltene Verhältnis der Peakflächen von normaler und deuterierter Substanz im Idealfall 1 betragen. Für die meisten Substanzen ergab sich ein Wert von $100 \pm 20 \%$ (siehe Tabelle 32). Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Methode wie erwartet mit einer guten Reproduzierbarkeit funktioniert und prinzipiell für die Bestimmung von Fettsäuren und Aminosäuren anwendbar ist.

Trotz dieser Erfolge wurde versucht, die Aminosäuren in den größeren Rahmen der simultanen Metabolitanalytik einzugliedern und eine Methode zu entwickeln, bei welcher die Aminosäuren nach entsprechender Derivatisierung über VPE aufgereinigt und anschließend mittels GC/MS-Analyse bestimmt werden können. Deshalb ist im nachfolgenden Abschnitt eine Derivatisierungsmethode für Aminosäuren beschrieben, welche eine GC/MS-Analytik ermöglicht, mit welcher zwei Extrakte direkt verglichen werden können.

IV.3.3.3 Derivatisierung von Fettsäuren und Aminosäuren mittels PCF

Eine häufig angewandte Methode zur schnellen Derivatisierung von Aminosäuren für die GC- oder GC/MS-Analyse ist deren Reaktion mit Chloroformaten in Gegenwart eines Alkohols (Wang et al., 1994). Die erforderlichen Reaktionen laufen nacheinander im wässrigen Milieu ab. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abb. 43 dargestellt. In Wasser als Lösungsmittel wird der Acylrest des Chloroformats auf die Aminogruppe übertragen und es entsteht ein Carbamat, während an der Carboxylgruppe ein gemischtes Anhydrid bildet wird (siehe Abb. 41). Dabei wird Salzsäure freigesetzt, die von dem zugegebenen Pyridin abgepuffert wird. In Gegenwart eines Alkohols wird das Anhydrid hydrolysiert und es bildet sich der entsprechende Carbonsäureester. Mit dieser Reaktion können prinzipiell auch andere organische Säuren verestert werden. Bei Einsatz von deuterierten Alkoholen (z.B. D₃-MeOH) erhält man deuterierte Ester. Damit in der Reaktionsmischung auch langkettige Fettsäuren löslich sind, wurde in der hier angewandten Arbeitsvorschrift das üblicherweise verwendete Wasser durch Tetrahydrofuran ersetzt.

Die gemeinsame Derivatisierung von Aminosäuren und organischen Säuren kann folgendermaßen durchgeführt werden: Die Proben werden in 100 µl Tetrahydrofuran und 30 µl MeOH bzw. CD₃OD aufgenommen. Anschließend werden 10 µl Pyridin (organische Base) sowie portionsweise 30 µl Propylchloroformat zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 200 µl Wasser und 1000 µl Chloroform hinzugefügt. Die Analyten werden in die Chloroformphase ausgeschüttelt, welche abgenommen und mit der Chloroformphase der anderen Probe (normal und deuteriert) vereinigt wird. Anschließend kann die Probe über VPE aufgereinigt und danach ins GC/MS injiziert werden.

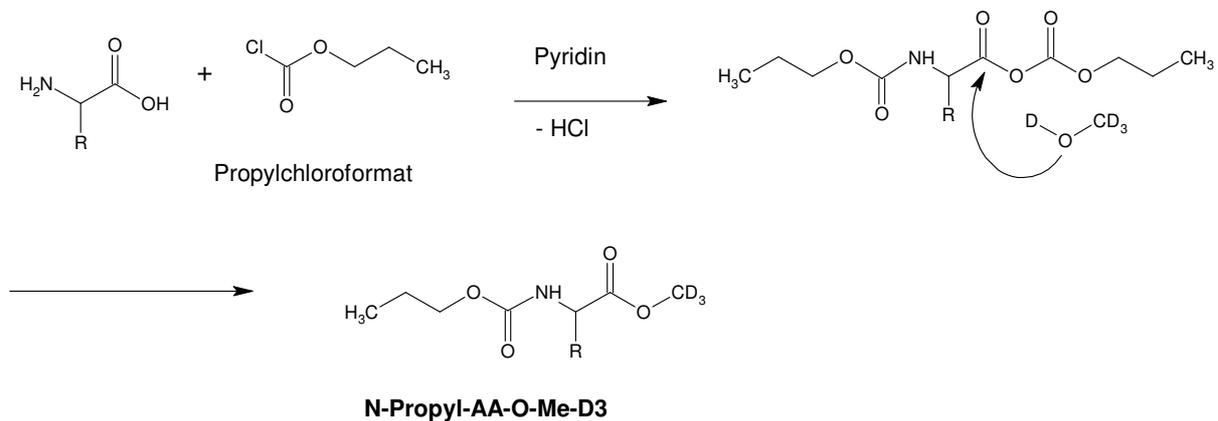


Abb. 43: Derivatisierung von Aminosäuren (AA) mit Propylchloroformat. Mechanismus nach Wang et al., 1994.

Mit dieser Methode können Glycin, Alanin, Serin, Prolin, Valin, Threonin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Methionin, Phenylalanin und ACC detektiert werden. Nicht erfasst werden können hingegen Cystein, Arginin, Tyrosin, Lysin, Histidin, Tryptophan sowie Glutamin und Asparagin.

Für die mit PCF und Methanol derivatisierten Aminosäuren (AA-P-Me) wurden unter den in IV.3.3 beschriebenen Bedingungen für die GC/MS-Messung im positiven CI-Modus die folgenden m/z -Werte sowie die Retentionszeiten (RT) ermittelt:

Glycin-P-Me: $m/z = 176$, RT = 10:48, Alanin-P-Me: $m/z = 190$, RT = 10:37, Serin-P-Me: $m/z = 206$, RT = 13:38, Prolin-P-Me: $m/z = 216$, RT = 14:02, Valin-P-Me: $m/z = 218$, RT = 12:25, Threonin-P-Me: $m/z = 220$, RT = 13:46, Leucin-P-Me: $m/z = 232$, RT = 13:40, Isoleucin-P-Me: $m/z = 232$, RT = 13:40, Asparaginsäure-P-Me₂: $m/z = 248$, RT = 15:10, Glutaminsäure-P-Me₂: $m/z = 262$, RT = 16:40, Methionin-P-Me: $m/z = 250$, RT = 16:44, Phenylalanin-P-Me: $m/z = 266$, RT = 18:11.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode beurteilen zu können, wurden 200 mg unbehandelte Arabidopsis-Blätter in der Kugelmühle mit 2000 μ l Methanol/Essigsäure (95:5, v/v) extrahiert. Als interner Standard wurde 500 ng Margarinsäure zugegeben. Dieser Extrakt wurde in 2 gleiche Teile geteilt, wovon der eine Teil mit PCF/MeOH und der andere mit PCF/CD₃OD derivatisiert wurde. Nach der Derivatisierung wurden die beiden Hälften wieder vereinigt und über VPE (3 min 250°C, siehe IV.3.2.3) aufgereinigt. Danach wurde die Probe in 10 μ l Hexan aufgenommen, wovon 2 μ l ins GC/MS injiziert und im positiv CI-Modus vermessen.

Zur Berechnung der Präzision wurde jeweils die für die erhaltene Peakflächen der unmarkierten Substanz mit der Peakfläche der deuterierten Substanzen ins Verhältnis gesetzt. Nach Normierung auf die Verhältnisse des internen Standards Margarinsäure (Berücksichtigung von Volumenunterschieden und unterschiedlichen Reaktionsausbeuten) sollte sich für das Verhältnis der Wert 1 ergeben. Dieser Versuch wurde insgesamt 3-mal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 aufgelistet.

Tab. 33: Reproduzierbarkeit der vergleichenden Derivatisierung von Fettsäuren, Phytohormonen und Aminosäuren mit PCF/MeOH bzw. PCF/CD₃OD

	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Verhältnis Peakflächen N/D [MA]	Mittelwert ± S.D.	V.C. [%]
Laurinsäure	3,20	1,38	1,73	2,10 ± 0,97	46,07
Myristinsäure	3,44	2,41	2,08	2,64 ± 0,71	26,81
Palmitinsäure	1,50	1,43	1,25	1,39 ± 0,13	9,42
Stearinsäure	1,67	1,53	1,20	1,46 ± 0,24	16,41
Ölsäure	2,66	2,45	2,85	2,65 ± 0,20	7,59
Linolsäure	4,20	3,52	3,06	3,59 ± 0,57	15,92
Linolensäure	3,69	2,50	3,13	3,11 ± 0,60	19,15
Palmitoleinsäure	1,19	0,19	0,84	1,01 ± 0,24	23,86
16:2	1,46	0,97	1,47	1,30 ± 0,29	21,94
16:3	2,45	1,96	1,21	1,87 ± 0,62	33,26
SA	n.d.	1,79	0,68	1,23 ± 0,79	63,81
JA	3,04	2,08	0,73	1,95 ± 1,16	59,27
trans-OPDA	3,16	2,10	1,67	2,31 ± 0,77	33,26
cis-OPDA	1,37	1,11	1,09	1,19 ± 0,16	13,15
IAA	n.d.	0,46	1,75	1,10 ± 0,91	82,08
ABA	3,39	2,30	1,56	2,42 ± 0,92	38,09
ACC	0,96	2,42	0,13	1,17 ± 1,16	98,86
Glycin	1,13	1,30	0,35	0,93 ± 0,51	54,44
Alanin	1,14	0,78	0,51	0,81 ± 0,32	39,03
Serin	0,97	0,19	0,42	0,52 ± 0,40	76,74
Prolin	0,93	1,39	0,46	0,93 ± 0,46	50,20
Valin	1,24	1,42	0,74	1,13 ± 0,35	31,10
Threonin	11,25	4,56	6,02	7,28 ± 3,52	48,31
Isoleucin	1,35	2,23	1,55	1,45 ± 0,14	9,70
Leucin	1,57	1,92	1,37	1,62 ± 0,28	17,08
Asparaginsäure	0,67	0,11	0,70	0,68 ± 0,02	3,18
Glutaminsäure	0,71	2,45	0,12	1,09 ± 1,21	110,97
Methionin	0,63	0,80	0,43	0,71 ± 0,12	16,46

Die Aufarbeitung wurde mit 100 mg unbehandelten *Arabidopsis*-Blättern durchgeführt, der erhaltene Extrakt geteilt und mit PCF/MeOH oder PCF/CD₃OD derivatisiert. Danach wurden die beiden Teile wieder vereinigt, über VPE aufgereinigt und mittels GC-MS vermessen. Für alle 3 Bestimmungen ist das Verhältnis der Peakflächen der unmarkierten zur deuterierten Substanz angegeben, weiterhin der berechnete Mittelwert aus den 3 Bestimmungen (MW) sowie die Standardabweichung (S.D.) und der Variationskoeffizient (V.C.).

Für die meisten Aminosäuren und Phytohormone funktionierte diese Methode gut und das mittlere Verhältnis von unmarkierter zu deuterierter Substanz lag zwischen 0,5 und 2. Lediglich bei den Fettsäuren fanden sich einige größere Abweichungen. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch diese Methode prinzipiell zum Vergleich zweier Proben anwendbar ist.

V Diskussion

V.1 Phytoprostanen in fetten Ölen

V.1.1 Bedeutung der Phytoprostane in der menschlichen Ernährung

In Kapitel IV.2.1 wurde gezeigt, dass in fetten Ölen mikromolare Mengen an Phytoprostanen vorkommen. Jeder Deutsche nimmt statistisch gesehen täglich 117,2 g Fett zu sich, damit 1,8 g Linolensäure (VERA Schriftenreihe, Band XII V). Direkt werden an Speisefetten und Ölen täglich 19,4 g verzehrt, darunter 5,20 g mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Diese werden vor allem durch pflanzliche Öle (Distelöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Maiskeimöl) geliefert. Weltweit gesehen spielen einige der untersuchten Speiseöle eine bedeutende Rolle in der Ernährung (FAO-Statistik Abb. 44).

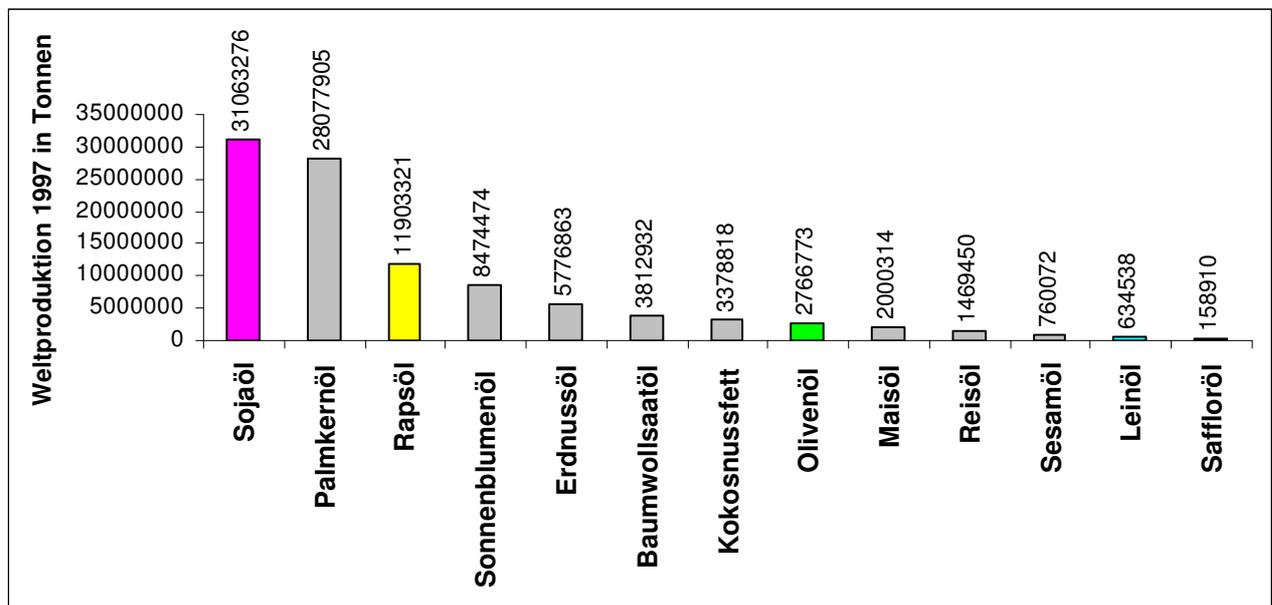


Abb. 44: Bedeutendste Speiseöle weltweit: Aufgezeigt ist die Weltproduktion der wichtigsten pflanzlichen Öle im Jahr 2002. Tatsächlich wurde der Hauptanteil der Pflanzenöle zu Ernährungszwecken hergestellt. Quelle: Statistische Datenbank der FAO, Update von 2004.

Sojaöl ist das weltweit am meisten produzierte Öl und erfreut sich besonders in Nordamerika und Asien großer Beliebtheit. Rapsöl ist das am dritthäufigsten produzierte Speiseöl. Olivenöl nimmt zumindest in den Mittelmeerländern einen großen Stellenwert ein, wo es einen wesent-

lichen Bestandteil der sog. mediterranen Diät darstellt. Leinöl liegt allerdings weltweit nur auf Platz 12, wohingegen Walnussöl oder Traubenkernöl in dieser Statistik nicht auftauchen. Dennoch werden gerade diese beiden Öle kaltgepresst gerne von gesundheitsbewussten Menschen konsumiert.

Allerdings ist anzunehmen, dass die Bedeutung von Olivenöl und Omega-3-Fettsäuren für die menschliche Ernährung in Zukunft steigen wird, denn für diese Fettsäuren wurden in zahlreichen Studien positive Effekte auf die Gesundheit festgestellt. Mit der mediterranen Ernährungsweise kann man langfristig koronaren Herzkrankheiten entgegenwirken (de Lorgeril et al., 1996) und die Blutfettwerte verbessern (Ambring et al., 2004). Durch zusätzliche Anreicherung des Speiseplanes mit α -Linolensäure lassen sich die kardioprotektiven Auswirkungen der Diät noch weiter erhöhen (de Lorgeril et al., 1994). In diesem Zusammenhang empfiehlt auch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) den Verzehr von Omega-3-Fettsäuren zur Vorbeugung von Herzinfarkten und Krebserkrankungen sowie zur unterstützenden Behandlung von Rheuma. Dabei schlägt sie für die Ernährung als optimales Verhältnis von Linolsäure zu α -Linolensäure 5:1 vor. Aus diesem Grund sind in Deutschland spezielle Omega-3-Fettsäure-reiche Lebensmittel auf dem Markt, welche von der Deutschen Herzzstiftung bzw. dem Arbeitskreis Omega-3 unterstützt werden und deren Loga tragen. Dabei handelt es sich vor allem um Produkte wie Pflanzenöl, Margarine, Brot, welche unter Verwendung von Rapsöl, Walnussöl und Leinöl hergestellt wurden.

In den folgenden Kapiteln soll die Bildung von Phytoprostanen in Ölen genauer betrachtet werden.

V.1.2 Bildung von Phytoprostanen in Ölen

Die in den Ölen enthaltenen Phytoprostane wurden durch Autoxidation von Linolensäure entweder bereits in der Pflanze, bei der Herstellung des Öles oder während der Lagerung gebildet. Die Autoxidation von Linolensäure verläuft schnell in Abwesenheit von Antioxidantien. Beispielsweise werden bei der Autoxidation von Linolensäure unter normaler Atmosphäre bei Raumtemperatur innerhalb von 5 bis 10 Tagen große Mengen an PPE₁ und PPF₁ (6-11 g/kg Linolenat) gebildet. In lebenden Pflanzen werden die Lipide durch die natürlichen Antioxidantien offenbar nur teilweise geschützt. In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass die Gesamtmenge an PPF₁ in frischen Pflanzen im Bereich von 0,5 bis 35 mg/kg Trockengewicht liegt. Während der üblichen Trocknung und Lagerung übersteigen die endogenen Konzentrationen die Konzentrationen unmittelbar nach der Ernte um zwei bis drei Größenordnungen und bewegen sich im Rahmen von 13 mg/kg bis 75 mg/kg Trockengewicht (Imbusch und Mueller, 2000).

Der zeitliche Verlauf der Autoxidation von Fetten und Ölen ist in Abbildung 45 dargestellt. Die Geschwindigkeit sowie das Ausmaß der Autoxidation von Ölen wird meist durch den Anstieg der Konzentration von typischen Lipidperoxydationsprodukten (z.B. Hydroperoxiden) gemessen. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Autoxidation von der Fettsäurezusammensetzung, den Konzentrationen von Pro- und Antioxidantien, dem Sauerstoffpartialdruck sowie des Oberflächenkontakts mit Sauerstoff und den Lagerungsbedingungen (Temperatur, Licht, Wassergehalt) ab (Frankel, 1998). Die Autoxidation von Ölen verläuft in der Regel zunächst sehr langsam und steigt anschließend nach Ablauf der Induktionsperiode (IP) sprunghaft an. Diese lag-Phase kommt dadurch zustande, dass zunächst im Öl vorhandene natürliche Anti-

oxidantien die Autoxidation eindämmen und erst wenn diese verbraucht sind, kann die Kettenreaktion der Lipidperoxidation starten.

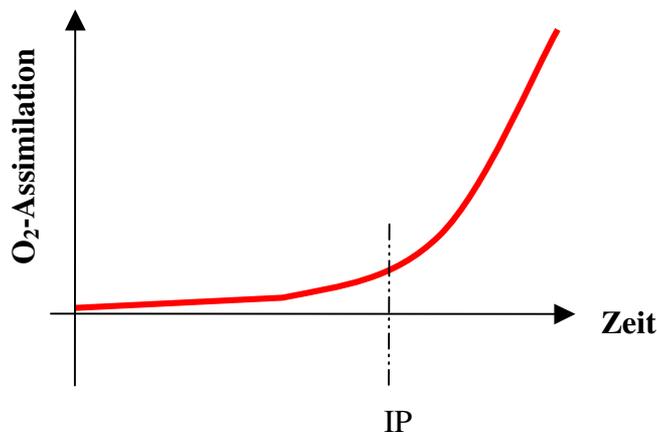


Abb. 45: Zeitlicher Verlauf der Autoxidation von Ölen. Nach: Frankel, 1998.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PPA₁, PPB₁, PPE₁ und PPF₁ in Milligramm-Mengen in 100 ml frischem Pflanzenöl vorkommen. Während der Lagerung können diese Mengen um mehr als eine Größenordnung ansteigen, ohne dass Anzeichen von Ranzigkeit zu erkennen sind. Dies wurde am Beispiel von einigen Autoxidationsversuchen überprüft. In diesem Zusammenhang konnte auch bestätigt werden, dass die Bildung von Phytoprostanen im wesentlichen der Kinetik der allgemeinen Autoxidation eines Öles (siehe Abb. 45) zu folgen scheint: Die Bildung von Phytoprostanen ist in der Anfangsphase der Autoxidation gering und setzt erst nach einigen Tagen stärker ein (siehe Abb. 22). Dies liegt zum einen am allgemeinen Profil der Bildung von Autoxidationsprodukten, zum anderen aber auch daran, dass Phytoprostane Sekundärprodukte der Autoxidation sind, welche aus primär gebildeten Hydroperoxiden hervorgehen. Weiterhin charakteristisch ist, dass die Bildung von Phytoprostanen durch Zugabe von Wasser und Einbringen von Sauerstoff gesteigert werden kann. Damit enthält die menschliche Nahrung beachtliche Mengen an Phytoprostanen, welche als Marker für die Qualität von pflanzlichen Lebensmitteln herangezogen werden können.

Theoretisch sollte die Lipidperoxidation eine Reaktion zweiter Ordnung darstellen und deren Geschwindigkeit sollte primär von der Konzentration der beiden Edukte Linolensäure und Sauerstoff abhängen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Kapitel IV.1.5.5 fällt auf, dass das Ausmaß der Lipidperoxidation kaum vom Linolensäure-Gehalt des Öles abhängt. Tatsächlich enthält Leinöl (~ 50 % Linolensäure) mit Abstand die größten Mengen an Phytoprostanen insgesamt (~ 126 µg/g Öl). Für die anderen Öle allerdings ist kein Zusammenhang mehr erkennbar, da Sojaöl, Rapsöl und Walnussöl ähnlich hohe Linolensäuregehalte aufweisen (~ 10 %), aber Sojaöl viele Phytoprostane (~ 29 µg/g Öl), Walnussöl eine moderate Menge (~ 5 µg/g Öl) und Rapsöl nur sehr wenige Phytoprostane enthält (~ 2 µg/g Öl). Olivenöl, welches kaum Linolensäure besitzen sollte (≤ 1 %), befindet sich dagegen mit dem Phytoprostangehalt (~ 3-4 µg/g Öl) auf gleichem Niveau wie das Walnussöl. Allerdings wurde für natives Olivenöl beschrieben, dass es bereits im frischen Zustand viele Peroxide beinhaltet (Satué et al., 1995). In Traubenkernöl, wo Linolensäure ebenfalls nur in Spuren auftreten sollte, wurden erwartungsgemäß auch nur sehr geringe Mengen an Phytoprostanen gefunden (~ 0,4 µg/g Öl). Dass der Linolensäuregehalt nicht das allein entscheidende Kriterium für

das Ausmaß der Lipidperoxidation ist, wurde auch 2004 von Lukaszewicz et al. beobachtet, als sie verschiedene Flachs-Kultivare mit stark unterschiedlichen Linolensäure-Gehalten zwischen 3 und 73 % auf ihre Oxidationsanfälligkeit untersuchten. Unter den verschiedenen zusammengesetzten Leinölen erwies sich das Öl des Flachs-Kultivars „Abby“ mit 59 % Linolensäure als stabiler wie das Öl des Flachs-Kultivars „Linola“ mit nur 3 % Linolensäure. Diese Diskrepanz liegt vermutlich an unterschiedlichen Gehalten von in den Ölen enthaltenen Antioxidantien.

Interessant ist auch, dass Intralipid®, obwohl ihm als Medizinprodukt hochgereinigtes Sojaöl zugesetzt wurde, dennoch viele Phytoprostane (~ 3 µg/g Öl) enthält. Allerdings ist über dieses Produkt auch bekannt, dass in seinen Triglyceriden erstaunlich viele Hydroperoxide vorkommen (10 µmol/l), deren Menge nach 24h Lichteinwirkung noch bis auf das 60fache ansteigen kann (Neuzil et al., 1995). Als Ursache dafür wird ein veränderter Gehalt endogenen Antioxidantien vermutet, welcher einen prooxidativen Effekt von Vitamin E, welches in Sojaöl und auch in Intralipid® in großen Mengen vorkommt, zur Folge hat.

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Gehalt an der Precursor-Fettsäure, konnte die Abhängigkeit der Lipidperoxidation von der Konzentration des zweiten Reaktionspartners, dem Sauerstoff, experimentell bewiesen werden. Dabei ist bei der Autoxidation der Arachidonsäure in vitro die Menge der gebildeten Isoprostane auch wesentlich vom Sauerstoff-Partialdruck abhängig. Die Isoprostan-Konzentration steigt bis zu 21 % Sauerstoff linear an und verweilt dann auf einem Plateau (Morrow et al., 1998). Da in den einzelnen Ölfaschen die Sauerstoffgehalte abhängig vom Herstellungsprozess etwas variieren können, sind daher auch beim gleichen Rohstoff Unterschiede in der Autoxidation abhängig von der Charge sehr wahrscheinlich.

Neben dem Gehalt an Linolensäure und dem Kontakt mit Sauerstoff spielen auch andere Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Lipidperoxidation. Entscheidend für Autoxidationsvorgänge ist unter anderem der Gehalt von in der Probe vorhandenen Pro- und Antioxidantien. Chlorophyll beispielsweise ist ein potenter Sensitivator bei der Bildung von Singulett-Sauerstoff und kann somit die Lipidperoxidation initiieren. Carotinoide hingegen fungieren in dieser Reaktion als Quencher. Allerdings werden beide Verbindungen bei der Raffination in erheblichem Maße abgetrennt. Tocopherole überstehen zum größten Teil die Raffination und stellen ein wichtiges Antioxidans in fetten Ölen dar, können allerdings in höheren Konzentrationen auch prooxidativ wirken (Frankel, 1996). Außerdem sind noch andere Inhaltsstoffe der Pflanzenöle beteiligt, besonders Phenole, Terpenoide oder Steroide, als Radikalfänger bei der Lipidautoxidation (Frankel, 1998). Dabei sind für Leinöl und Rapsöl vor allem die Tocopherole (Frankel, 1996), für Sojaöl die Isoflavone Genistein und Daidzein (Wiseman et al., 1999) zu nennen und für die herausragenden antioxidativen Eigenschaften von Olivenöl in vitro und in vivo sind vor allem phenolische Verbindungen wie Kaffeesäure oder Tyrosol bzw. Hydroxytyrosol (Satué et al., 1995) verantwortlich. Entscheidend ist auch die Anwesenheit von reduzierten Metallionen, da sie die Zersetzung von Hydroperoxiden katalysieren (s. Kap. I.1.2) und so die Autoxidation erheblich beschleunigen können. Spuren von Metallen sind herstellungsbedingt immer vorhanden. Diese können aber durch organische Säuren (Phenole, Flavonoide, Citronensäure, Ascorbinsäure) komplexiert werden und können so keinen Einfluss mehr auf die Lipidperoxidation ausüben.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Abhängigkeit der Phytoprostanbildung vom Gehalt an Linolensäure, Vitamine E und anderen Matrixbestandteilen gehen konform mit einer Studie von Gopaul und Mitarbeitern aus dem Jahr 2000. Darin untersuchten sie verschiedene Fast-Food-Lebensmittel (Big Mac, Hühnchen-Burger, Fisch-Burger, Döner) auf ihren Gehalt an iPF_{2α}-III. Dabei stellten sie fest, dass der Isoprostangehalt nicht generell vom Arachidonsäuregehalt abhängt, sondern vielmehr vom Typ des Lebensmittels selbst. Vegetarische Le-

bensmittel enthielten nur geringe Mengen an $iPF_{2\alpha}$ -III bezogen auf ihren Arachidonsäuregehalt. Beim Fleisch dagegen hing die Menge wesentlich von der Tierart ab, wobei Hähnchen, Lamm und Fisch relativ wenig und Rindfleisch große Mengen an $iPF_{2\alpha}$ -III pro g Arachidonsäure aufwiesen. Bei der gleichen Fleischart waren sich die Werte einzelner Chargen ziemlich ähnlich. Auch bei diesen Daten lässt sich keine Korrelation zwischen gebildeten Lipidautoxidationsprodukten und Vitamin E-Gehalt der Lebensmittel herstellen.

Allerdings hängt die Geschwindigkeit der Autoxidation eines Lipids nicht nur von seiner Zusammensetzung, sondern auch in großem Maße vom Herstellungsprozess (Raffination u.ä.) und den Transport- und Lagerungsbedingungen ab (Frankel, 1998). Hier spielen insbesondere Temperatur, Licht und Sauerstoff eine große Rolle.

Weiterhin fällt bei den Phytosteranen im Öl auf, dass das Verhältnis der gebildeten Phytosteran-Klassen D_1/E_1 zu F_1 keineswegs konstant ist, sondern von Öl zu Öl verschieden ist. Selbst die beiden Olivenöle zeigen sich diesbezüglich unterschiedlich.

Im Autoxidationsansatz von Linolensäure hängt die Absolutmenge der gebildeten Phytosterane E_1 oder F_1 entscheidend vom verwendeten Lösungsmittel ab. Protisches Lösungsmittel fördert die Bildung von PPE_1 (2,4-fach mehr als PPF_1) wohingegen aprotisches Lösungsmittel zur verstärkten Bildung von PPF_1 (39-facher Überschuss gegenüber PPE_1) führt (Imbusch und Mueller, 2000b). Das liegt daran, dass Endoperoxide im aprotischen Lösungsmittel weniger stark zu Umlagerungen neigen und so durch Reduktion des Endoperoxids vermehrt PPF_1 auf Kosten von PPE_1/PPD_1 gebildet werden. Das erklärt, warum in vielen Ölen große Mengen an PPF_1 und geringere Mengen der anderen Phytosteranklassen gefunden wurden. Allerdings kommen im Leinöl deutlich größere Mengen PPE_1 als PPF_1 vor, was darauf hindeutet, dass hierbei noch andere Faktoren im Spiel sind.

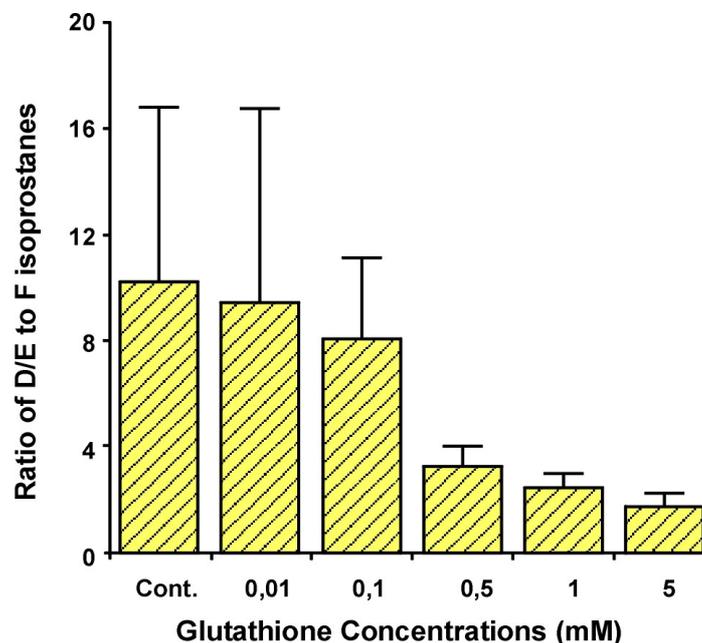


Abb. 46: Effekt verschiedener GSH-Konzentrationen auf das Verhältnis gebildeter F_2 -iP zu D_2/E_2 -iPs in peroxidierenden Mikrosomen der Rattenleber. Abbildung entnommen aus Morrow et al.; 1998.

Diese Effekte treten nicht nur bei Reaktionen in vitro auf, sondern können auch bei der Lipidperoxidation in vivo beobachtet werden. So existieren auch Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben, wo die relativen Mengen von F_2 - zu D_2/E_2 -Isoprostanen variieren. In einigen

Gewebe sind F_2 -Isoprostane dominierend und in anderen Geweben herrschen D_2/E_2 -Isoprostane relativ zu F_2 -Isoprostanen vor (Morrow und Roberts 2nd, 1996). Das liegt daran, dass die Bildung der verschiedenen Isoprostan-Ringsysteme vor allem von der Konzentration an verfügbaren Reduktionsmitteln abhängt (Morrow et al., 1998). Im wässrigen Milieu übersteigt die Bildung von iPD_2/iPE_2 wesentlich die von $iPF_{2\alpha}$. Das Vorhandensein von Glutathion (GSH) und anderen Thiolen steigert jedoch die Konversion von iPH_2 zu $iPF_{2\alpha}$ beträchtlich. GSH in einer Konzentration von 0,5 mM steigert die Bildung von F_2 -Isoprostanen im Verhältnis zu D_2/E_2 -Isoprostanen auf das 2,5-fache (Abb. 46).

Weiterhin ist es von Interesse, ob die gebildeten Phytoprostane im Öl in freier oder veresterter Form vorliegen. Auf diesen Aspekt soll nachfolgend eingegangen werden.

V.1.3 Autoxidation freier und veresterte Fettsäuren

In den Ölen fällt der verhältnismäßig große Anteil an freien PPF_1 im Vergleich zu veresterten PPF_1 auf, der nicht in Zusammenhang mit der ursprünglichen Fettsäureverteilung stehen kann. In den Bio-Ölen gibt es sogar fast ausschließlich freie PPF_1 und kaum veresterte. Dies kann zum einen daran liegen, dass pflanzliche Lipasen verestert in Membranlipiden gebildete PPF_1 bevorzugt hydrolysieren. Andererseits könnten aber im abgefüllten Öl die freien Fettsäuren auch tatsächlich bevorzugt oxidiert werden.

Im pflanzlichen und tierischen Gewebe autoxidieren allerdings zuerst die veresterten Fettsäuren: Bei der Induktion der Isoprostanbildung nach Behandlung mit CCl_4 steigen in Rattenlebern die veresterten F_2 -Isoprostane im Verhältnis stärker an als die freien (Morrow et al.; 1992). Dies trifft auch für die Oxidation der Lipoproteine des Blutplasmas zu, wo bei der Autoxidation von LDL ein schnellerer Anstieg von veresterten F_2 -Isoprostanen im Vergleich zu freien beobachtet wurde (Gopaul et al., 1994a).

In Bulk-Ölen ist jedoch das Gegenteil der Fall. Freie Fettsäuren werden anscheinend bevorzugt zu PPF_1 oxidiert, wie in Autoxidationsversuch Nr. IV gezeigt (siehe IV.1.6.4). Zum einen könnte es daran liegen, dass in pflanzlichen Ölen kaum hydrophile Antioxidantien vorkommen. In Körperflüssigkeiten und in den Zellen hingegen liegen diese beispielsweise mit Ascorbinsäure und Glutathion in effektiven Konzentrationen vor. Diese polaren Antioxidantien können die polareren freien Fettsäuren, welche dem hydrophilen Zelllumen zugewandt sind, durch ihre räumlichere Nähe besser erreichen und damit besser schützen als die unpolaren Triacylglyceride. Daneben muss auch die Anordnung der freien und veresterten Fettsäuren im Bulk-Öl in Bezug auf ihren Kontakt mit Sauerstoff betrachtet werden (siehe Abb. 47): Im Bulk-Öl bilden sich reverse Mizellen, in denen sich Sauerstoff, Prooxidantien (v.a. Übergangsmetalle) und Spuren von Wasser befinden und somit den Ort mit der höchsten Lipidperoxidationsrate darstellen. Die freien Fettsäuren als amphiphile Moleküle sind dabei an der Phasengrenzfläche angeordnet, wo sich Öl, Wasser und emulgierende Moleküle treffen. Ferner können die freien Fettsäuren, die in den Ölen größtenteils als Anionen vorliegen noch zusätzlich Übergangsmetallionen komplexieren und so Metall-Lipid-Interaktionen fördern (Decker et al., 2005). Lipophile Antioxidantien wie Tocopherol schützen eher die Lipidphase und sind besonders wichtig bei Emulsionen, wie in Intralipid® oder Margarine, da diese sich hier auch an der Oberfläche der Tröpfchen anordnen (Frankel, 1996).

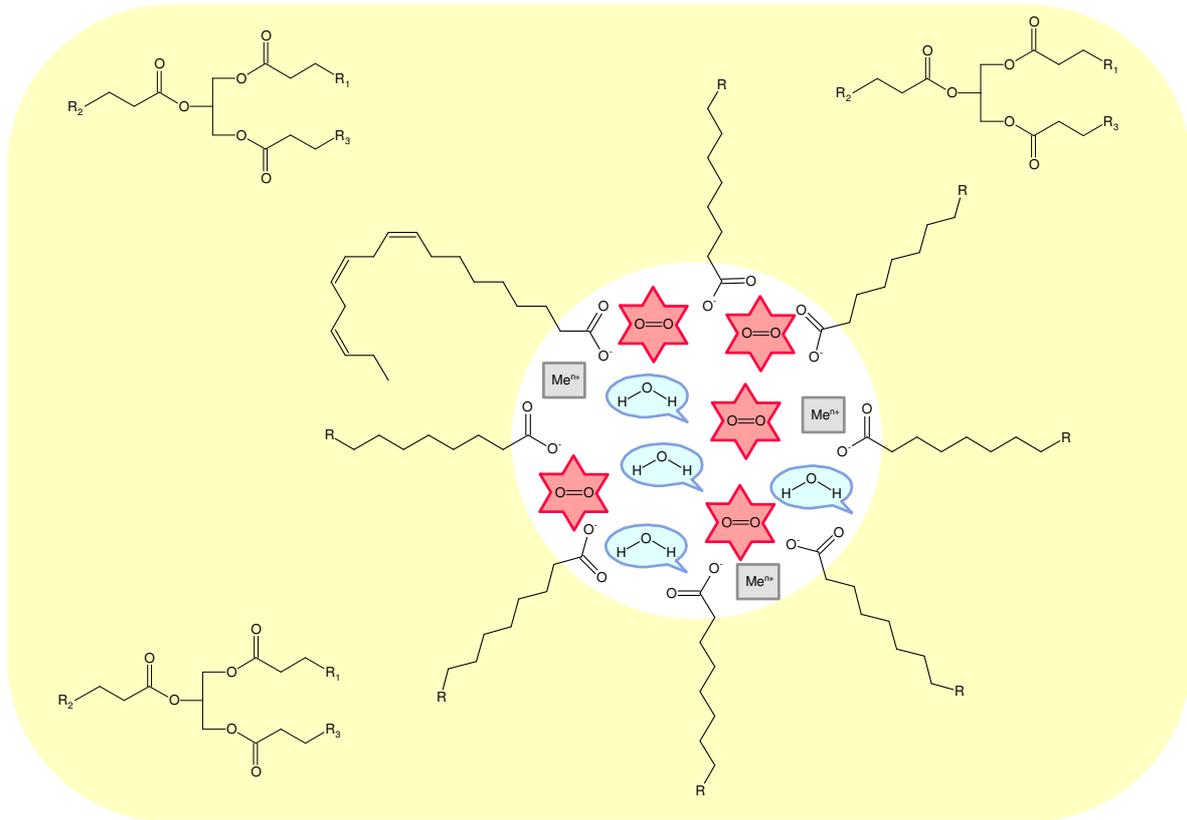


Abb. 47: Polare Mizellen mit Sauerstoff, Wasser und Metallionen in Bulk-Ölen.

Nachdem hiermit das Vorkommen von Phytoprostanen in Speiseölen genauer betrachtet wurde, soll im nächsten Kapitel deren Bioverfügbarkeit erörtert werden.

V.2 Bioverfügbarkeit von Phytoprostanen

V.2.1 Direkte Infusion von Phytoprostanen

Speiseöle werden normalerweise oral aufgenommen, in einigen Fällen aber auch intravenös infundiert. Dies ist zum Beispiel bei Intensivpatienten der Fall, welchen täglich 50 bis 100 ml intravenös Intralipid zur parenteralen Ernährung verabreicht wird. Auch in diesem Produkt wurden PPE₁, PPF₁, PPA₁ und PPB₁ gefunden (siehe Tab. 8 Kapitel IV.2.5.3). Mit der üblichen Dosis werden den Patienten pro Tag ca. 96 µg Phytoprostane zugeführt, welche in der Emulsion hauptsächlich verestert vorliegen. In diesen Mizellen sollten die Phytoprostane auch weitgehend geschützt vor einem enzymatischen Abbau sein. Dabei übersteigen die in den

Mizellen vorliegenden Konzentrationen an Phytoprostanen die Konzentrationen der in menschlichen Geweben vorkommenden Isoprostanen bei weitem. Beispielsweise übertrifft die Konzentration des Cyclopentenon-Phytoprostans PPA₁ in den Mizellen von Intralipid (832 ng/g) die Spiegel von A₂- und J₂-Isoprostanen in der normalen Rattenleber (5,1 ng/g) um das mehr als 160-fache. Selbst unter extremen Stressbedingungen wie schwerer CCl₄-Intoxikation erreichen die maximalen Konzentrationen von iPA₂-III und iPJ₂-III in der Rattenleber (122 ng/g) bei weitem nicht die im Intralipid vorliegenden Konzentrationen. Die Konzentrationen von PPA₁ in Intralipid übersteigen die endogen gebildeten Cyclopentenone immer noch die um einen Faktor von ca. 7 (Chen et al., 1999). Darüber hinaus findet auch während der 24-stündigen Infusion bedingt durch Lichteinfall eine Lipidperoxidation statt, welche zu einer Zunahme der Hydroperoxidkonzentration im Intralipid auf das 60-fache führen kann (Neuzil et al., 1995). Dabei werden vermutlich auch andere Lipidperoxidationsprodukte gebildet, so dass bei diesem Prozess die Menge an Phytoprostanen im Intralipid noch weiter drastisch zunehmen sollte.

Neben Intralipid® kommen seit den späten 90er Jahren auch Lipidemulsionen aus Olivenöl zum Einsatz, welche unter dem Handelsnamen ClinOleic® im Handel sind. Da in Olivenöl relativ viele Phytoprostane gefunden wurden (siehe Tab. 13 und 14 in Kapitel IV.2.5.3), befinden sich wahrscheinlich auch in dieser Infusionslösung Phytoprostane.

Im Gegensatz zu den Infusionslösungen, deren Phytoprostane direkt ins Blut eingebracht werden, müssen die Phytoprostane aus der normalen Ernährung erst den Verdauungstrakt passieren und im Dünndarm resorbiert werden. Um zu untersuchen, ob diese Phytoprostane tatsächlich vom Menschen aufgenommen werden, wurde eine klinische Studie, Etude Biophyto, durchgeführt. Deren Planung sowie die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

V.2.2 Resorption von oral aufgenommenen Phytoprostanen

Für die Durchführbarkeit der Studie war von entscheidender Bedeutung, dass die Lipidperoxidation im Körper gesunder Menschen konstant bleibt und keinen tagesabhängigen oder ernährungsbedingten Schwankungen unterworfen ist. Die hierfür nötige Planungssicherheit gaben Ergebnisse aus der Isoprostan-Forschung. Die mit dem Urin ausgeschiedene Menge an iPF_{2α}-III unterliegt beim gesunden Menschen keinen tageszeitabhängigen Schwankungen (Helmersson und Basu, 1999; Richelle et al., 1999) und kann zwischen verschiedenen Tagen höchstens um bis zu 41 % variieren (Helmersson und Basu, 2000). Allerdings ist bekannt, dass die mit dem Urin ausgeschiedene Isoprostanmenge von Alter und Geschlecht abhängt. Vergleicht man den Uringehalt von iPF_{2α}-III zwischen Männern und Frauen, ist dieser bei jungen Männern größer als bei jungen Frauen und bei prä-menopausalen Frauen niedriger als bei post-menopausalen (Cracowski et al., 2002). Außerdem hängt die Menge vom BMI ab: Jede 5 kg/m² steigern die Uringehalte von iPF_{2α}-III um 16 % (Keaney et al., 2003). Deshalb wurden für diese Studie ausschließlich junge Männer im Alter von 18-35 Jahren mit einem niedrigen BMI-Index von 20-29 m²/kg ausgewählt.

Verschiedene Studien zeigten, dass der Isoprostan-Gehalt in Blut und Urin nicht vom Lipidgehalt der Ernährung abhängt. In einer Studie bekamen die Probanden vier Tage lang eine Diät, die nur aus Glucosepolymeren und Wasser bestand. Tatsächlich waren die Uringehalte

an $iPF_{2\alpha}$ -III nach der Diät exakt die gleichen wie zuvor (Morrow et al., 1990). Auch der tagesweise Wechsel von einer normalen Diät mit 35 % Fett zu einer fettarmen Diät mit 5 % Fett bei ansonsten gleicher Energiezufuhr führte an unterschiedlichen Tagen zu gleichen Urin-Ausscheidungen von $iPF_{2\alpha}$ -III (Richelle et al., 1999). Allerdings war nach einem Tag Fasten ein vorübergehender Anstieg um 40 % zu beobachten, der sich jedoch nach einem weiteren Tag Normalkost wieder normalisiert hatte. Dieser Effekt wird auf eine verstärkte Lipolyse in den Adipozyten zurückgeführt. Auch die Isoprostangehalte im Blut scheinen unabhängig von der Ernährung zu sein, wie ein Versuch mit fettreichem Fastfood zeigte: Nach Genuss eines Big-Mac-Menüs (Mc Donald's Corp.) nahmen die Plasmaspiegel von $iPF_{2\alpha}$ -III innerhalb von 2h nicht signifikant zu (Gopaul et al., 2000a). Auch Nahrungsbestandteile mit ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften scheinen die basal auftretende Lipidperoxidation nicht zu beeinflussen. Flavonoidreiche Ernährung zeigte keinen nachhaltigen Effekt auf die Plasmaspiegel (Willcox et al., 2003) und die ausgeschiedenen Urinmengen (Widlansky et al., 2005) von $iPF_{2\alpha}$ -III. Jedoch konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Flavonoide in der Mahlzeit dem postprandialen oxidativen Stress und dem damit verbundenen Anstieg der Plasmakonzentration von $iPF_{2\alpha}$ -III um 20 % entgegenwirken können (Wiswedel et al.; 2004). Isoflavone aus Sojaprodukten (Genistein, Daidzein, Equol) sind ebenfalls potente Antioxidanzien und senkten die Plasmaspiegel von $iPF_{2\alpha}$ -III um 20 % und vermindern die Oxidationsanfälligkeit von LDL in vitro (Wiseman et al., 1999). Supplementation mit Vitamin E reduziert die Urin-Ausscheidung von $iPF_{2\alpha}$ -III bei Patienten mit klinischen Erscheinungen, die mit oxidativem Stress einhergehen, wie beispielsweise cystischer Fibrosis, Diabetes Typ 2, Arteriosklerose und Hypercholesterinämie. (Davì et al., 2004). Allerdings weisen solche Patienten auch erheblich verminderte Plasmaspiegel an Tocopherol und anderen Antioxidanzien auf, die durch Supplementation gesteigert werden können. Beim gesunden Menschen sind die Plasmaspiegel von $iPF_{2\alpha}$ -III unabhängig von den Tocopherolkonzentrationen (Sarabi et al., 1999) und selbst durch Vitamin-E-Gaben von 1200 und 2000 i.E. pro Tag, welche die Blutplasma-Spiegel von Vitamin E dosisabhängig steigern, wird kein Effekt auf die ausgeschiedene $iPF_{2\alpha}$ -III-Menge ausgeübt (Meagher et al., 2001). Ähnliches gilt für Versuche mit Raxofelast, einem Vitamin E-ähnlichem Antioxidans, und Vitamin C: Raxofelast reduziert die Plasma-Konzentration von $iPF_{2\alpha}$ -III in Patienten mit Diabetes Typ 2, aber nicht in Gesunden; und Vitamin C senkt die Urinausscheidung von $iPF_{2\alpha}$ -III in Patienten mit chronischer Alkohol-geschädigter Leber aber nicht zirrhotischer Hepatitis C, einer Krankheit, bei der die endogenen Spiegel von Vitamin C und E relativ normal sind (Cracowski et al., 2002). Selbst eine Kombination aus Vitamin E (400 i.E./d) und Vitamin C (500 mg Ascorbat/d), welche synergistische Effekte zeigen könnte, zeigte keinen Einfluss auf den Gehalt von $iPF_{2\alpha}$ -III und MDA sowie 4-Hydroxyalkenal im Urin (Huang et al., 2001).

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Testpersonen zueinander zu gewährleisten, wurden die Teilnehmer sorgfältig ausgewählt. An der Studie durften nur junge gesunde Männer mit einem festgelegten (niedrigen) BMI teilnehmen. Eine vorherige Überprüfung des Gesundheitszustandes mit Anamnese und Blutuntersuchungen sowie der Ausschluss von Rauchern sollte verhindern, dass sich unter den Teilnehmern Personen mit einem erhöhten Grad oxidativen Stresses befanden. Die Probanden wurden angewiesen, für die Dauer der Studie den Verzehr von Pflanzenölen und fetthaltigen Speisen zu reduzieren, um den Konsum anderer Phytoprostane als die in den Test-Ölen enthaltenen zu vermeiden. Weiterhin durften während dieser Zeit keine Arzneimittel eingenommen werden.

Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Bildung oder Abbau von PPF_1 während der Lagerung muss natürlich auch ausgeschlossen werden können. Die Grundlagen hierzu stammen ebenfalls aus der Isoprostan-Forschung sind im Folgenden beschrieben.

Eine Bildung von PPF₁ während der Lagerung oder der Aufarbeitung der Plasma- und Urinproben ist ausgeschlossen, da diese bei -80°C gelagert wurden. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde das Antioxidans BHT zugesetzt und die Proben danach zügig aufgearbeitet. Für die Entstehung von Isoprostanen zeigten Morrow et al. 1990 bzw. 1993, dass Blutproben bei einer Lagerung bei -80°C stabil sind. Allerdings werden während einer mehrmonatigen Lagerung von Plasma bei -20°C erhebliche Mengen an Isoprostanen F₂, E₂ und D₂ gebildet, deren Entstehung aber durch Zugabe von 0,002 % BHT bei der Blutabnahme (BHT in der Spritze vorgelegt) zu 90 % verhindert werden kann. Selbst ohne BHT sind Blutproben bei Raumtemperatur 2h stabil. Urinproben sind ohne BHT sogar bei 37°C über 7 Tage stabil und bei -20°C über 6 Monate. Auch eine alkalische Hydrolyse führt nicht zur Bildung von F₂-Isoprostanen (Morrow et al.; 1992). Diese Voraussetzungen geben die Grundlage dafür, dass man die Studie überhaupt sinnvoll auswerten kann. Die Diskussion dieser Daten folgt im nächsten Abschnitt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pankreaslipase alle Klassen von Phytoprostanen hydrolysieren kann. Dies ist eine Grundvoraussetzung für eine mögliche Resorption der Phytoprostane in der Darmmucosa. Resorbierte Phytoprostane sollten sich anschließend im Blutkreislauf wieder finden lassen.

Linolensäure kommt im tierischen Organismus kaum vor, da es vom Körper nicht selbst gebildet und durch die Nahrung nur in sehr geringen Mengen aufgenommen wird. Deshalb sollte hier auch kein PPF₁ anzutreffen sein. Diese Annahme wird durch die in der Etude Biophyto erhaltenen Daten im Wesentlichen bestätigt: Der Basalwert im Blut scheint unter 0,2 nmol/l und der Basalwert im Urin unter 0,01 nmol/mmol Kreatinin zu liegen. Bei der Etude Biophyto wurde weiterhin nachgewiesen, dass im menschlichen Körper nach Konsum von Speiseölen eine erhöhte Menge an PPF₁ auftreten kann. Dabei kann darüber diskutiert werden, ob diese durch Resorption von präformierten PPF₁ zustande gekommen ist oder ob die detektierten Phytoprostane erst in vivo durch Autoxidation der resorbierten Linolensäure entstanden sind.

Die endogen gefundenen Phytoprostankonzentrationen passen gut zu den im Öl enthaltenen Phytoprostanmengen. Den höchsten Gehalt an PPF₁ findet man im Olivenöl, etwas weniger im Sojaöl und fast kein PPF₁ im Traubenkernöl. Das Verhältnis der PPF₁ in den Ölen spiegelt sich auch in den gefundenen Plasma- und Urinkonzentrationen wieder: relativ hohe Mengen an PPF₁ bei den Olivenöl-Konsumenten, relativ geringe Mengen bei den Sojaöl-Konsumenten und keine nachweisbaren Mengen bei den Traubenkernöl-Konsumenten.

Zwischen dem Linolensäuregehalt der Öle und den PPF₁-Mengen in Blut und Urin hingegen lässt sich keine Korrelation herstellen. Sojaöl enthält 9 % Linolensäure, aber seine Konsumenten wiesen Phytoprostan-Gehalte von nur ~ 1,0 nmol/l PPF₁ in Blut und ~ 0,4 nmol PPF₁/mmol Kreatinin im Urin auf. Olivenöl und Traubenkernöl besitzen beide max. 1 % Linolensäure und dennoch sind die damit erzielten PPF₁-Konzentrationen im Organismus bei Sojaöl hoch (~ 1,2 nmol/l im Blut und ~ 2,0 nmol/mmol Kreatinin) und im Fall des Traubenkernöls sowohl im Blut als auch im Urin unterhalb der Nachweisgrenze. Ferner kann man davon ausgehen, dass die Reaktionsbedingungen für die Oxidation in vivo für alle drei Öle gleich waren und dass auch von daher Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Gruppen ausgeschlossen werden können.

Im Gegensatz dazu werden die endogenen Konzentrationen der aus Arachidonsäure gebildeten C₂₀-Isoprostane nicht durch die Ernährung beeinflusst (s.o.). Im Vergleich zu den durch die Ernährung erzielten Plasmaspiegeln an PPF₁ liegen die Basalspiegel der Isoprostane etwas niedriger: Gesunde Menschen enthalten im Blut veresterte iPF_{2α}-III in Konzentrationen von 0,16 bis 0,45 (0,31 ± 0,15) nmol/l. Die Konzentrationen an freien iPF_{2α}-III liegen bei < 0,3

nmol/l (Nourooz-Zadeh et al., 1995). Damit erreichen die F₁-Phytosterane die systemischen Serumkonzentrationen der enzymatisch gebildeten Prostaglandine, die für PGF_{2α} bei 0,71 ± 0,2 nmol/l liegen (Yang und Gao, 1999). iPF_{2α}-III wird im Menschen schnell zu 2,3-Dinor-iPF_{2α}-III und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-iPF_{2α}-III metabolisiert. Die Urinkonzentrationen von PPF₁ nach Konsum phytosteranreicher Pflanzenöle liegen in der gleichen Größenordnung wie die Konzentrationen von iPF_{2α}-III und seinen Hauptmetaboliten im Urin gesunder Menschen: Von iPF_{2α}-III sind durchschnittlich 0,36 ± 0,16 nmol/mmol Kreatinin im Urin enthalten, von 2,3-Dinor-iPF_{2α}-III 5,44 ± 1,96 nmol/mmol Kreatinin und von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-iPF_{2α}-III 2,16 ± 0,71 nmol/mmol Kreatinin (Nourooz-Zadeh et al., 2005). Auch die Menge des ausgeschiedenen PGF_{2α}-Metaboliten 15-Keto-13,14-dihydro-PGF_{2α} liegt mit 0,46 ± 0,19 nmol/mmol Kreatinin (Helmersson und Basu, 2001) in diesem Bereich.

Im Rahmen der Etude Biophyto konnte folglich gezeigt werden, dass eine Resorption von Phytosteranen aus der Nahrung stattfindet. Eine endogene Bildung von PPF₁ ist in Anbetracht der oben angeführten Zusammenhänge unwahrscheinlich. Im folgenden Abschnitt wird dennoch die Möglichkeit einer endogenen Bildung von Phytosteranen diskutiert.

V.2.3 Endogene Bildung von Phytosteranen

Eine Lipidperoxidation kann nicht nur in Lebensmitteln stattfinden, sondern auch während der Verdauung und nach der Resorption *in vivo*. Dabei ist besonders der Aufenthalt im Magen als kritisch zu beurteilen, da dieser absorbierten Sauerstoff enthält und der Magensaft einen sehr niedrigen pH-Wert besitzt. Der Magen ist ein Bioreaktor, in dem viele Substanzen zusammentreffen. Hier kommen die pflanzlichen Lebensmittel u.a. mit Fleischprodukten zusammen, welche große Mengen an Eisen und Myoglobin enthalten. Dabei steigt im Sauren die katalytische Aktivität von Metallionen und Ascorbinsäure bei der Lipidperoxidation um den Faktor 1,5 bis 3. Dabei konnte von Kanner und Lapidot experimentell gezeigt werden, dass die in Linolsäure enthaltenen Fettsäurehydroperoxide in künstlichem Magensaft bei Anwesenheit von Metmyoglobin innerhalb von 2 bis 3 Stunden auf das 5-fache ansteigen können. Der gleiche Effekt konnte auch mit realen oxidierten Lebensmitteln (Sojaöl und erhitztes Muskelfleisch) erzielt werden. Im Gegenzug konnten pflanzliche Antioxidantien wie Polyphenole aus Obst, Gemüse, Rotwein und Tee diese Oxidation dosisabhängig unterdrücken (Kanner und Lapidot, 2001).

Nicht nur im Magen, sondern auch im Dünndarm könnten Phytosterane gebildet werden. Dies liegt daran, dass 2 bis 6 Stunden nach Einnahme einer Mahlzeit während der Resorption eine durch Leukozyten verstärkt freie Radikale erzeugt werden, was als postprandialer oxidativer Stress bezeichnet wird. Gleichzeitig findet nach 2 h eine Senkung der Vasodilatationsfähigkeit des Endotheliums um bis zu 50 % statt. Diese endotheliale Dysfunktion ist mit dem vermehrten Auftreten von Lipidperoxidationsprodukten verbunden und kann durch Antioxidantien vermindert werden. In diesem Zusammenhang steigt die Urinausscheidung von iPF_{2α}-III innerhalb von 2 Stunden nach einer fettreichen Mahlzeit leicht und nach 4 h stark an, wobei der Gehalt an iPF_{2α}-III im Urin um ca. 100 % zunimmt (Tsai et al., 2004).

Schließlich könnten die Phytoprostane auch bei der Oxidation von in LDL transportierter Linolensäure entstanden sein. In vitro-Studien zeigten deutlich den Anstieg von Lipidhydroperoxiden und 8-iso-PGF_{2α} bei der Autoxidation von LDL mit Kupfer (Lynch et al., 1994; Gopaul et al., 1994a), mit 2,2'-Azobis-2-Amidinopropan (AAPH), einer Quelle für wasserlösliche Peroxyl-Radikale (Lynch et al., 1994) oder mit Peroxynitrit (Moore et al.; 1995). Tatsächlich enthalten die Phospholipiden arteriosklerotischer Läsionen im Vergleich zu gesundem Gefäßendothelgewebe die 10-fache Menge an iPF_{2α}-III und iPF_{2α}-I (Praticó et al.; 1997).

Allerdings macht die im menschlichen Blutplasma vorkommende α-Linolensäure unabhängig von den Ernährungsgewohnheiten (Fleischesser, Vegetarier, Veganer) mengenmäßig weniger als 2 % der Gesamtfettsäuren aus und liegt somit weit unterhalb der Konzentration von Arachidonsäure, die zu 6 % enthalten ist (Rosell et al., 2005). Andererseits wurde von den Probanden eine große Menge Linolensäure auf einmal konsumiert und die Oxidationsanfälligkeit von Lipoproteinen oder lipidreichen Geweben hängt entscheidend von ihrer Fettsäurezusammensetzung ab. Plasmalipoproteine von Ratten, welche mit Rapsöl (~ 10 % Linolensäure) gefüttert wurden, oxidieren deutlich schneller als die von Ratten, welche mit Sesamöl (< 0,5 % Linolensäure) gefütterte wurden (Baba et al., 2000). Dies zeigt auch ein Versuch, bei dem Schweine entweder mit Leinöl, einer Mischung aus Lein- und Olivenöl oder Sonnenblumenöl gefüttert worden waren und deren Leber anschließend in vitro autoxydiert wurde (D'Arrigo et al., 2000).

Neben der Leber passiert das Blut noch permanent die Niere. Auch hier könnte eine Autoxidation stattfinden. Einige Studien haben gezeigt, dass unmetabolisierte Prostaglandine im Urin zu einem großen Teil von der lokalen Produktion in der Niere herrühren und weniger durch die Filtration aus dem Blut bedingt sind (Morrow und Roberts, 1996). Das hat zu der Hypothese geführt, dass auch die im Urin gemessenen Isoprostane entweder aus dem Blutkreislauf gefiltert oder in der Niere gebildet worden sein könnten oder eine Kombination aus beidem darstellen. Einige Studien, bei denen die Isoprostangehalte in Blut und Urin von Gesunden und Menschen mit erhöhter Lipidperoxydationsrate gemessen wurden, zeigten auch ein deutliches Missverhältnis der Isoprostane im Blut zu den Isoprostanen im Urin. Tatsächlich stellten Morrow und Roberts 1997 eine lediglich schwache Korrelation zwischen der Urin-Ausscheidung unmetabolisierter F₂-Isoprostane und deren Plasmaspiegeln fest, wohingegen die Korrelation zwischen ausgeschiedenen Metaboliten von F₂-Isoprostanen und zirkulierenden F₂-Isoprostanen sehr hoch war. Eine ähnliche Divergenz stellten Feillet-Coudray et al. 2002 für die Spiegel von iPF_{2α}-III bei Patienten mit Typ 2 Diabetes in Blut und Urin fest. Im Urin fanden sie bei Diabetikern knapp die doppelte Menge an iPF_{2α}-III verglichen mit Gesunden, im Plasma jedoch nur das 0,6-fache. Der gleichzeitig mitbestimmte Lipidperoxydationsmarker Malondialdehyd war in beiden Fällen bei Diabetes-Patienten erhöht, allerdings im Urin viel deutlicher als im Plasma. Diese Unstimmigkeiten lassen den Verdacht aufkommen, dass zumindest in manchen Fällen eine Lipidperoxydation im Urogenitaltrakt auftritt und so die Werte von Lipidautoxydationsprodukten im Urin erhöht.

Die endogene Bildung von Phytoprostanen in vivo aus Linolensäure ist also theoretisch möglich. Praktisch konnte in der Etude Biophyto allerdings kein Zusammenhang zwischen dem Linolensäuregehalt eines Öles und den Phytoprostanspiegeln in Blut und Urin beobachtet werden. Demgegenüber existiert eine hohe Korrelation zwischen dem Phytoprostangehalt der Öle und den endogenen Phytoprostanspiegeln. Demnach liegt es nahe, dass Phytoprostane über die Nahrung in den Körper gelangen können und wenn überhaupt, nur in untergeordnetem Maß endogen gebildet werden. Analog dazu ist auch von oral verabreichten Isoprostanen und Prostaglandinen bekannt, dass sie schnell resorbiert, metabolisiert und dann mit dem Urin

ausgeschieden werden (Magee et al., 1972; Bygdeman et al., 2003). Durch die Gabe von 100 ml Olivenöl konnten Blutspiegel von bis zu 1,4 nmol PPF₁/l erreicht werden. Diese F₁-Phytoprostane liegen im Blut großenteils in veresterter Form vor. Das liegt daran, dass die gastrische Lipase im Wesentlichen die sn-3 und die Pankreaslipase hauptsächlich die Positionen sn-1 und sn-3 von Triacylglyceriden hydrolysiert. Die so gebildeten freien Phytoprostane und 2-Phytoprostanoylglyceride könnten möglicherweise resorbiert und anschließend in Chylomikronen eingebaut werden. In den Lipoproteinen sollten die Phytoprostane vor Metabolisierung und renaler Ausscheidung geschützt sein. Damit besteht die Möglichkeit, dass sie entfernte Organe erreichen und dort spezifische Wirkungen entfalten könnten. Während der Aufnahme von Lipiden in die Zielzellen, sollten die Phytoprostane aus den Lipoproteinen freigesetzt werden und anschließend in konzentrierter Form vorliegen. Im Blut frei vorliegende Phytoprostane werden vermutlich analog zu Isoprostanen (Morrow und Roberts, 1997) schnell metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden. Dieses Szenario passt zu der beobachteten langsamen renalen Elimination: etwa 50 % der mit dem Urin ausgeschiedenen PPF₁ wurden in der nach 4-8 Stunden gesammelten Urin-Fraktion gefunden und einige PPF₁ konnten immer noch in den nach 8-24 Stunden gesammelten Urin-Fraktion identifiziert werden.

Die Metabolisierung von Prostaglandinen und Isoprostanen erfolgt in der Zelle, weil dort die entsprechenden Enzyme lokalisiert sind. Dabei ist es denkbar, dass diese Enzyme auch Phytoprostane abbauen. Deshalb soll im Folgenden diskutiert werden, wie gut Phytoprostane in Zellen gelangen können.

V.2.4 Transport von Phytoprostanen in die Zellen

Phytoprostane könnten ihre Wirkungen sowohl an extrazellulären membranständigen Rezeptoren vermitteln als auch über intrazelluläre Rezeptoren. Andererseits ist zu erwarten, dass Phytoprostane nach ihrem Transport in die Zelle rasch metabolisiert werden.

Normalerweise werden oxidierte Fettsäuren von Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Makrophagen nur sehr begrenzt aufgenommen. Beispielsweise nehmen glatte Muskelzellen nach 30 min Inkubation oxidierte Linolsäure nur zu 3 % auf, normale Linolsäure dagegen aber zu 30 % (Penumetcha et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass Phytoprostane aufgrund ihrer komplexen Struktur noch weit schlechter Eintritt in die Zellen finden.

Es ist aber denkbar, dass Phytoprostane durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Prostaglandinen den nach innen gerichteten Prostaglandin-Transporter der Zellmembran nutzen können. Die strukturellen Anforderungen für die Bindung an den Prostaglandin-Transporter weichen von denen des Prostaglandin-Rezeptors geringfügig ab (Schuster, 1998). Prostaglandine werden vom humanen Prostaglandin-Transporter in folgender Reihenfolge transportiert: PGE₁ ≈ PGE₂ = PGD₂ ≈ PGF_{2α} > TxB₂ >> 6-Keto-PGF_{1α}. Die K^{1/2}-Werte, welche die entsprechende Substrataffinität anzeigen, liegen für Prostaglandine im Bereich von ~ 50-100 nM. Verbindungen mit reduzierter Doppelbindung (Dihydroprostaglandine) zwischen C-5 und C-6 oder C-13 und C-14 haben eine leicht reduzierte Wirksamkeit. Auch die Isomerisierung an Position C-8, wie sie bei den Isoprostanen auftritt, ändert nur wenig an der Affinität: 8-iso-PGE₂ ist 1,3-mal weniger aktiv als PGE₂ und 8-iso-PGF_{2α} ist 3,5-mal weniger aktiv als PGF_{2α}. Die Bindung an den PGT wird drastisch geschwächt, wenn die 15(S)-OH-Gruppe zu 15(R)-OH

oder zu 15-Keto ausgetauscht wurde. Die Aufnahme von Metaboliten wie 15-Keto-PGF_{2α} oder 13,14-Dihydro-15-keto-PGE₁ ist nur sehr gering. Diese Strukturbedingungen lassen vermuten, dass zumindest einige Phytoprostan-Isomere ähnlich gut wie Prostaglandine transportiert werden können und damit in die Zellen aufgenommen werden können.

Dementsprechend können mit der Nahrung aufgenommene Phytoprostane einige Zeit im Körper verweilen, bevor sie metabolisiert und/oder ausgeschieden werden. Deshalb soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden, ob sie extrazellulär oder intrazellulär biologische Wirkungen vermitteln können.

V.3 Wirkungspotential von Phytoprostanen im Menschen

V.3.1 Archetypische Prostaglandine

Isoprostane und Phytoprostane sind gemäß einer Hypothese (M. J. Mueller, 2004) keine unbedeutenden Verbindungen aus einer Schar von Oxylipinen, sondern sie sind als archetypische Prostaglandine zu betrachten. Das bedeutet, dass diese Substanzen, welche als Produkte der Lipidautoxidation seit jeher in den Zellen vorhanden waren, schon lange als Signalstoffe fungiert haben, bevor sich Enzyme zur Synthese von Lipidmediatoren etablierten. Prostaglandine wurden möglicherweise gebildet, um bereits vorhandene Signalwege zu verstärken. Tatsächlich konnte bereits nachgewiesen werden, dass Isoprostanoide im nanomolaren Konzentrationsbereich PG-Rezeptoren aktivieren können (Unmack et al., 2001; Schuster et al., 2000) und damit auch zumindest einen Teil der Wirkungen der Prostaglandine vermitteln können. Allerdings sind die Isoprostan-Konzentrationen in heute lebenden Säugetieren sehr niedrig (Morrow et al., 1990 und 1993; Chen et al., 1999).

Die Tatsache, dass neben den enzymatisch hergestellten Produkten *in vivo* auch noch autoxidativ gebildete Strukturisomere vorkommen, ist bereits seit über einem Jahrzehnt bekannt. Neben den Isoprostanen gibt es weitere Lipidmediatoren, die autoxidativ gebildet werden können, nämlich Isoleukotriene (Harrison und Murphy, 1995), Isothromboxane (Morrow et al., 1996b) und Isolevuglandine (Brame et al., 1999). Für Isoleukotrien B₄ wurde bereits gezeigt, dass es in nanomolaren Konzentrationen die gleichen biologischen Aktivitäten wie durch Lipoxygenase gebildete Leukotriene ausübt. Diese werden bei beiden Verbindungen über den Leukotrien-Rezeptor vermittelt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch die enzymatisch gebildeten Produkte der Arachidonsäure, die Prostaglandine, auf rein autoxidativem Weg hergestellt werden können: Gao et al. entdeckten 2003, dass *in vitro* und *in vivo* (in Rattenlebern nach Behandlung mit Tetrachlormethan) die gebildeten Mengen von rac-PGE₂ mindestens genauso groß sind wie die von rac-iPE₂-III. Dabei entstehen auch große Mengen an rac-PGD₂, welche die an rac-PGE₂ noch etwas übersteigen. Die Produkt-Analyse mit chiraler HPLC zeigte, dass jede Verbindung aus zwei Enantiomeren gleicher Menge besteht. Die Autoren nehmen an, dass die Prostaglandine E₂ und D₂ aus den gebildeten rac-iPE₂-III bzw. rac-

12-iso-iPD₂-III entstehen, indem über Tautomerie eine Epimerisierung der β -Hydroxy-Ketogruppe statt findet. In vitro epimerisiert iPE₂-III bei pH 7,4 zeitabhängig zu PGE₂ mit einer Halbwertszeit von 2 h.

Müller stellte die Hypothese auf, dass oxidierte Lipide evolutionsgeschichtlich zunächst als Mediatoren für oxidativen Stress fungierten und im Laufe der Evolution deren kontrollierte Synthese mittels Enzymen eingeführt wurde, um diesen Signalweg zu verstärken und zu modulieren. So existieren vom Leukotrienrezeptor BLT zwei Isoformen, von denen der BLT₂ seinen Liganden Leukotrien B₄ mit 20-fach geringerer Affinität als BLT₁ bindet, dafür aber verschiedene Eicosanoide (Hydroxyfettsäuren, Thromboxane) im unteren mikromolekularen Konzentrationsbereich bindet und von ihnen aktiviert werden kann (Yokomizo et al., 2001). Das gibt Anlass zur Vermutung, dass der BLT₂ zuerst existierte und später der spezifischere BLT₁ hinzugekommen ist.

Oxidierte Fettsäuren entstehen mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche während des normalen aeroben Metabolismus kontinuierlich gebildet werden. Bei Auftreten einer Reihe biotischer oder abiotischer Stresssituationen reagiert der tierische oder pflanzliche Organismus mit einer vermehrten Produktion von ROS. So werden ROS in Pflanzen und Tieren bei Infektionen als frühe Reaktion gebildet. Pflanzen besitzen das Enzym NADPH-Oxidase, welches bei Pathogenbefall aktiviert wird und im Verlauf des sogenannten „oxidativen burst“ Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale produziert. Diese ROS führen neben der direkten Schädigung des Pathogens zu einer oxidativen Vernetzung der Glykoproteine der Zellwand und dem Auslösen des hypersensitiven Zelltods, der biotrophen Pathogenen die Nahrungsgrundlage entziehen soll (Lamb und Dixon, 1997). Im Säugetier reagieren Phagozyten nach Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren mit dem sogenannten „respiratorischen burst“, bei dem über die Enzyme NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff gebildet werden. Dies ist von Bedeutung für die unspezifische Pathogenabwehr, da durch die gebildeten ROS Bakterien u.ä. aktiv geschädigt werden (Siems et al., 1998; Soccio et al., 2005).

Neben diesen direkten Wirkungen sind ROS auch selbst Signalstoffe in Pflanzen und Tieren: Wasserstoffperoxid beispielsweise moduliert in Arabidopsis mindestens 175 Gene (Desikan et al., 2001). Der Mechanismus der Signalübertragung durch ROS ist noch nicht geklärt, es ist aber wahrscheinlich, dass durch autoxidative Prozesse Produkte wie beispielsweise Phytprostane und Isoprostane gebildet werden, welche dann als Signalstoffe erkannt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass reaktive Sauerstoffspezies und Prostanoiden gegenseitig ihre Bildung stimulieren. Möglicherweise existiert hier eine positive Rückkopplung und dies gibt einen weiteren Hinweis auf die enge funktionelle Verwandtschaft von enzymatisch und autoxidativ hergestellten Oxylipinen. Gut beschrieben ist dies am Beispiel der Aktivierung von Blutplättchen (Iuliano et al., 1997): In den Plättchen löst oxidativer Stress eine Signalkaskade aus, bei der schließlich die cytosolische Phospholipase A₂ aktiviert wird. Dies führt zu einer verstärkten Freisetzung von Arachidonsäure, welche anschließend zu Prostanoiden umgesetzt werden kann. Zusätzlich können freie Sauerstoffradikale sowie H₂O₂ und andere Hydroperoxide die Aktivität der Cyclooxygenase auch direkt stimulieren. Andererseits werden während der Prostanoid-Synthese aufgrund der Hydroperoxidase-Aktivität dieses Enzyms freie Radikale und ROS als Nebenprodukte gebildet.

Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Phytprostane und Isoprostane auf ähnliche Art und Weise wirken wie Prostaglandine. Möglicherweise können Phytprostane an denselben Zielstrukturen (Rezeptoren, regulatorische Enzyme) angreifen wie Isoprostane und Prostaglandine. Nachfolgend soll auf mögliche extra- und intrazelluläre Targets für Phytprostane eingegangen werden.

V.3.2 Wirkorte von Phytoprostanen

Viele autoxidativ entstandene Lipidperoxidationsprodukte sind in der Lage, verschiedene Rezeptoren für enzymatisch gebildete Oxylipine zu ligieren und zu aktivieren. Als mögliche spezifische Rezeptoren für Phytoprostane kommen die entsprechenden Prostaglandin-Rezeptoren und der Thromboxan-Rezeptor in Frage. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass diese Rezeptoren von verschiedenen Isoprostanen ligiert, aktiviert und desensitiviert werden können (Kunapuli et al., 1997). Daneben gibt es Hinweise auf die Existenz eines putativen Isoprostan-Rezeptors. Allerdings ist noch nicht abgeklärt, ob die Phytoprostane auch die zur Ligation notwendigen Strukturbedingungen erfüllen.

V.3.2.1 Aktivierung von Prostanoid-Rezeptoren

E₁ und F₁-Isoprostane vom Typ III sind schwache Agonisten für den EP- (Sametz et al., 2000; Helli et al., 2004; Janssen und Tazzeo, 2000; Unmack et al., 2000), den FP- (Kunapuli et al., 1997) sowie den TP-Rezeptor (Kunapuli et al., 1997, Audoly et al., 2000). Besonders wichtig für die Affinität zum Prostanoid-Rezeptor und die Aktivität eines Liganden ist die Carboxylgruppe am C¹: Sie interagiert mit konservierten Arginin-Resten der Transmembrandomäne VII, welche in allen 8 Prostanoidrezeptoren vorkommen. Dies führt zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen (Ungrin et al., 2001). Für Phytoprostane vom Typ I sollte diese Wechselwirkung noch gut erreicht werden, da hier die Seitenkette nur eine Methylgruppe kürzer ist als beim entsprechenden Prostaglandin oder Thromboxan (Abb. 48). Bei Phytoprostanen vom Typ II ist die Molekülgeometrie allerdings so verschieden, dass die Wechselwirkung möglicherweise nicht mehr zustande kommen kann. So ist unter den F₂-Isoprostanen auch nur das Regioisomer III für Prostanoid-Rezeptor-vermittelte biologische Aktivitäten wie Konstriktion glatter Muskulatur u.ä. bekannt. Typ V hingegen konnte in menschlichen Arterien und Venen keine Vasokonstriktion verursachen (Marlière et al., 2002).

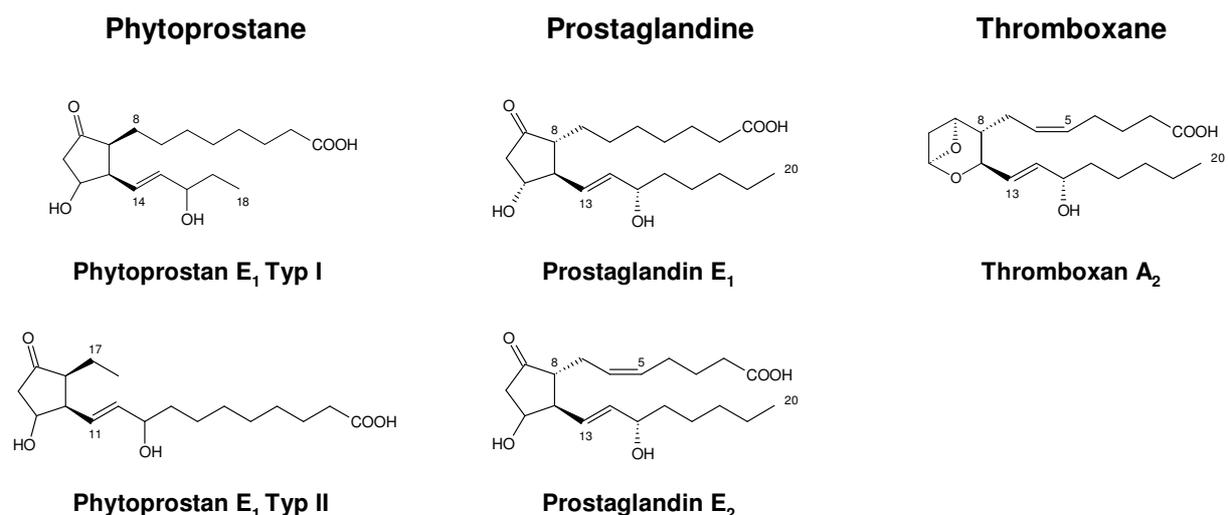


Abb. 48: Vergleich der Strukturen von Phytoprostanen, Prostaglandinen und Thromboxanen am Beispiel von PPE₁ Typ I und II, PGE₁ und PGE₂ sowie TXA₂.

Phytprostane sind Dinor-dihydro-Isoprostane und entsprechen in ihrer Struktur deshalb den im Körper gebildeten Isoprostan-Metaboliten 2,3-Dinor-5,6-dihydro- $iPF_{2\alpha}$ -III (= $PPF_{1\alpha}$ -III). Der Metabolismus von Prostaglandinen allerdings führt in der Regel zu Produkten mit stark verminderter Aktivität oder inaktiven Verbindungen (Russell et al., 1975). Dies konnte auch für Isoprostane beobachtet werden: Eine Kettenverkürzung von $iPF_{2\alpha}$ -III um zwei C-Atome hat einen Aktivitätsverlust zur Folge: In der Thorax-Arterie zeigten 2,3-Dinor-5,6-dihydro- $iPF_{2\alpha}$ -III oder 2,3-dinor- $iPF_{2\alpha}$ -III weder konstriktive noch relaxierende Wirkung (Cracowski, 2004). Allerdings existieren auch hierbei Ausnahmen: So besitzt 15-keto- $PGF_{2\alpha}$ die Fähigkeit, Bronchokonstriktion hervorzurufen und für 2,3-Dinor-5,6-Dihydro- $iPF_{2\alpha}$ -III = PPF_1 Typ III (aus γ -Linolensäure) wurde bereits gezeigt, dass diese Verbindung ebenso gut wie $PGF_{2\alpha}$ eine Kontraktion der Netzhautgefäße bewirken kann (Hou et al., 2001; Hou et al., 2004).

Nicht nur die Konstitution, sondern auch die Konfiguration ist für die Interaktion mit Prostanoid-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. Viele Isoprostane sind weniger aktiv als die Prostaglandine bzw. Thromboxane und weitere Änderungen der Stereochemie (Isomere von PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ und $iPF_{2\alpha}$ -III) haben meist eine Aktivitätsminderung um das 100- bis 1000-fache zur Folge. Die Hydrierung von Doppelbindungen zeigte in den untersuchten Beispielen nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität (Unmack et al., 2001; Kunapuli et al., 1997; Audoly et al., 2000).

Neben diesen klassischen Rezeptoren wird auch die Existenz eines putativen Isoprostan-Rezeptors diskutiert, denn bei einigen physiologischen Prozessen zeigen Isoprostane bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich biologische Aktivität. Beobachtet wurde dies für die Aggregation von Thrombozyten (Audoly et al., 2000), die Restriktion der glomerularen Filtrationsrate der Niere (Morrow et al., 1990; Morrow et al., 1993) und die Konstriktion der Lymphgefäße (Sinzinger et al., 1997) sowie die Aktivierung der Phospholipase C in den Zellen der glatten Gefäßmuskeln (Fukunaga et al., 1993a). Interessanterweise scheint hier die cis-Konfiguration der Seitenketten ein notwendiges Strukturelement zu sein, denn bei diesen Interaktionen sind Prostaglandine kaum aktiv: Die drastische Senkung der glomerularen Filtrationsrate, die von 34 nM $iPF_{2\alpha}$ -III oder iPE_2 -III ausgelöst wurde, konnte nicht von $PGF_{2\alpha}$ oder von $9\alpha,11\beta$ - PGF_2 in ähnlicher Dosierung imitiert werden (Morrow et al., 1990; Morrow et al., 1993). Gleiches gilt für die Kontraktion der menschlichen Lymphgefäße, wo verschiedene E- und F-Isoprostane ab Konzentrationen von 30 nM gute Wirkung zeigten (Sinzinger et al., 1997). Auch hier war $iPF_{2\alpha}$ -III wesentlich potenter als $PGF_{2\alpha}$ und die relaxierende Wirkung von PGI_2 im gleichen Konzentrationsbereich reichte bei weitem nicht an die kontrahierende Wirkung von $iPF_{2\alpha}$ -III heran (Oguogho et al., 2000). Ebenso konnte der mutmaßliche Isoprostan-Rezeptor der Blutplättchen selbst durch 50 μ M $PGF_{2\alpha}$ nicht aktiviert werden (Praticó et al., 1996).

Bei Isoprostan-Rezeptor-vermittelten Interaktionen scheinen die E-Ring-Verbindungen potenter als die F-Ring-Verbindungen zu sein. Außerdem scheint es noch weitere strukturelle Anforderungen des Isoprostan-Rezeptors zu geben, denn die strukturell verwandte Verbindung $iPF_{3\alpha}$ -III erwies sich im Hinblick auf die Thrombozytenaggregation als inaktiv (Praticó et al., 1996).

V.3.2.2 Ligation von PPAR

Neben membranständigen Rezeptoren für Prostaglandine (und oxidierte Lipide) gibt es auch lösliche Rezeptorproteine, die eine Funktion als Transkriptionsfaktoren haben. Bindung von Lipiden aktiviert die Transkriptionsfaktoren. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die drei Subtypen des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptors (PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ), welche oxidierten Fettsäuren und Isoprostanen aktiviert werden können (siehe Abschnitt 1.2.5). Aufgrund des Ligandenspektrums von PPAR ist es denkbar, dass auch Phytoprostane gute Liganden für sie darstellen. In einem Versuch von Chao et al. 2001 wurde die Wirkung von thermisch (6 h 205°C) oxidiertem Sojaöl auf die Regulation verschiedener Gene zur Aktivierung von PPAR α untersucht (siehe Abb. 49).

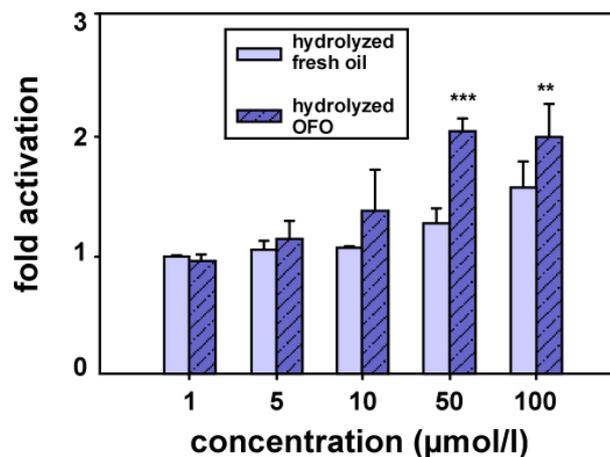


Abb. 49 Transaktivierung von PPAR α durch hydrolysiertes frisches oder oxidiertes gebratenes Sojaöl. Abbildung aus Chao et al., 2001.

Beim hier verwendeten Öl war gut die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Linolensäure oxidiert und darin sollten auch größere Mengen an Phytoprostanen - zumindest vom stabilen PPF₁ - enthalten gewesen sein. Chao et al. stellten fest, dass in Ratten der PPAR α -Rezeptor besser von oxidierten Fettsäuren aktiviert wird als durch intakte Fettsäuren (Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure). Möglicherweise sind an diesem Effekt neben den bekannten Liganden für PPAR (8S-HETE sowie 9- und 13-HODE) auch Phytoprostane beteiligt.

V.3.2.3 Cyclopentenone

Prostaglandine mit einem A-, J- oder deoxy-J-Ringsystem gehören aufgrund ihrer chemischen Struktur zu den Cyclopentenonen. Diese weisen in vivo antiinflammatorische, anti-neoplastische und antivirale Eigenschaften auf. Cyclopentenone vermitteln ihre Wirkung nicht durch Ligation bestimmter Rezeptoren, sondern durch kovalente Bindung an Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine (siehe Kap. I.2.4.3). Für ihre Wirkung scheint vor allem die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe verantwortlich zu sein, denn hydrierte Verbindungen stellten sich als unwirksam heraus (Vosseler et al., 2003). Außerdem können viele biologische Aktivitäten der Cyclopentenon-Prostaglandine ebenso durch 2-Cyclopenten-1-on, allerdings in 30- bis 100-fach höheren Konzentration, erzielt werden (Strauss und Glass,

2001). Es ist deshalb durchaus denkbar, dass die Cyclopentenon-Phytoprostane PPA₁ und dPPJ₁ ähnliche biologische Aktivität besitzen wie die Cyclopentenon-Prostaglandine PGA₁/PGA₂ und 15d-PGJ₂.

Für Phytoprostane existieren also verschiedene denkbare Wirkorte. Allerdings wurde die Wirkung von Phytoprostanen an Membranrezeptoren und löslichen Rezeptoren vom PPAR-Typ bisher noch nicht untersucht. Dennoch sind bereits einige Wirkungen der Phytoprostane in vivo bekannt, welche im nächsten Abschnitt beschrieben werden sollen.

V.3.3 Wirkungen von Phytoprostanen in vitro

V.3.3.1 Immunmodulatorische Wirkungen

Nachdem in Blütenpollen Phytoprostane in Mengen von einigen nmol/g gefunden wurden (vgl. Kapitel IV.1.4) wurde untersucht, ob Phytoprostane an der Entstehung von Allergien mit beteiligt sind und dabei möglicherweise eine Rolle bei der Immunreaktion spielen. Die Lipide wässriger Pollenextrakte von *Betula alba* (Bet.-APE) bewirken eine signifikante Aktivierung von Neutrophilen und Eosinophilen (Traidl-Hoffmann et al., 2002; Plötz et al., 2004). In Bet.-APE sind PPA₁/PPB₁, PPE₁ und PPF₁ jeweils in nanomolaren Konzentrationen enthalten. An der Entwicklung von Atopie und Allergien sind vor allem T-Helferzellen (Th) maßgeblich beteiligt. Dabei müssen Th1 und Th2-Zellen unterschieden werden, welche sich im Verlaufe der Reifung aus naiven Th0-Zellen bilden. Th1-Zellen steuern die Abwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze. Die durch Th1-Zellen gebildeten Cytokine (Tc1) aktivieren die zelluläre Immunantwort, darunter vor allem die Makrophagen und die T-Zell-gesteuerte Cytotoxizität sowie die natürlichen Killerzellen. Th2-Zellen sind für die Abwehr von helminthischen Parasiten zuständig und initiieren und propagieren eine Entzündung. Th2-Cytokine (Tc2) bewirken die Aktivierung von B-Zellen, deren Reifung zu Plasmazellen und damit die Bildung von spezifischen Antikörpern sowie die Aktivierung und Rekrutierung von Eosinophilen (Rocca und FitzGerald, 2002). Atopische Erkrankungen sind durch überwiegend Th2-Zell-gesteuerte Immunreaktionen gekennzeichnet und Allergen-spezifische Th2-Zellen sind Schlüsselorganismen der allergischen Reaktion. Die verstärkte Produktion von IgE-Antikörpern durch die B-Zellen führt zur Aktivierung von Mastzellen, welche Histamin, Proteasen und Heparin ausschütten sowie der damit verbundenen Hypersensitivität der Allergiker. Daneben verursachen die durch die Eosinophilen produzierten proinflammatorischen Cytokine eine Hyperreaktivität der Bronchien. Obwohl beim Thema Allergie die Biologie der Th2-Zellen gut verstanden ist, weiß man wenig über die Mechanismen, die als Reaktion nach Kontakt mit einem Allergen eine Th2-Polarisierung auslösen. Dendritische Zellen (DCs) spielen eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort. Nach Aktivierung durch Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen wie LPS oder durch T-Zellen gesteuerte Signale wie Ligation von CD40 produzieren die dendritischen Zellen Cytokine, die zu einer Th1-Polarisierung führen. Allerdings kann die gleichzeitige Anwesenheit von endogenen Signalen wie IL-10, TGFβ, Corticosteroide, Vita-

min D_3 oder PGE_2 dendritische Zellen von Th1- nach Th2-polarisierenden Antigenpräsentierenden Zellen konvertieren.

Der Wirkmechanismus von PGE_2 bei der Polarisierung naiver Th-Zellen ist bereits ausführlich untersucht worden (Abb. 50).

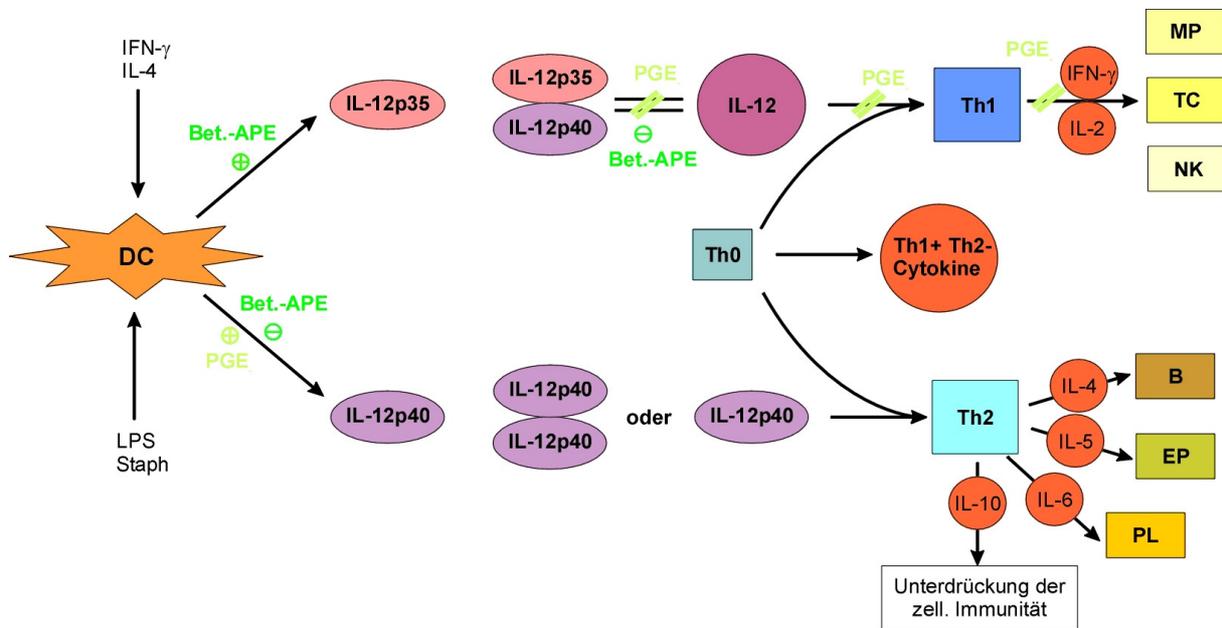


Abb. 50: Polarisierung von naiven T-Helfer-Zellen zum Typ 1 oder 2. DC = dendritische Zelle, MP = Makrophage, TC = cytotoxische T-Zelle, NK = natürliche Killerzelle, B = B-Zelle, EP = eosinophile Zellen, PL = Plasmazellen. Abbildung nach Kalinski et al., 2001 und Traidl-Hoffmann et al., 2005.

Sind während der Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) mit LPS PGE_2 in Konzentrationen von 100 nM bis 300 μM anwesend, führt dies zu einer dosisabhängigen Inhibierung der Produktion von IL-12p70 durch die DCs. Zusätzlich führt PGE_2 in den DCs zu einer Zunahme der mRNA für IL-12p40. IL-12p40 ist ein Antagonist des IL-12-Rezeptors und inhibiert die Wirkung von IL-12p70. Zusätzlich wird durch PGE_2 die Responsivität der Th0-Zellen auf IL-12 gemindert, indem der IL-12-Rezeptor herabreguliert wird. Diese Effekte führen miteinander zu einer verstärkten Ausbildung von Th2-Reaktionen (Kalinski et al., 2001).

Wie Phytostane und wässrigen Blütenpollenextrakte mit diesem System wechselwirken können, wurde 2004 von Traidl-Hoffmann et al. untersucht. Die Effekte, die durch Pollen oder Phytostane ausgelöst werden können, sind in Abbildung 50 dargestellt.

Für wässrige Extrakte von Birkenpollen (Bet.-APE) konnte von Traidl-Hoffmann et al. experimentell gezeigt werden, dass diese eine funktionelle und phänotypische Reifung von dendritischen Zellen induzieren können. Weiterhin können sie eine verstärkte Th2-Polarisierungskapazität von dendritischen Zellen hervorrufen: DCs, die in Gegenwart von Bet.-APE gereift waren, zeigten reduzierte Polarisierungskapazität für Th1 und erhöhte Polarisierungskapazität für Th2. Um den Einfluss der löslichen Pollenbestandteile auf die Funktion von dendritischen Zellen näher zu untersuchen, wurden unreife menschliche DCs den

wässrigen Extrakten von Pollen verschiedener Pflanzenspezies ausgesetzt und die phänotypische und funktionelle Reifung der DCs untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass auch Pollenextrakte eine Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von IL-12p70 bewirken können. Allerdings unterscheidet sich der Wirkmechanismus von Bet.-APE deutlich vom Wirkmechanismus von PGE₂: Der wässrige Birkenpollenextrakt konnte die Produktion von IL-12p70 dosisabhängig unterdrücken, indem er eine Inhibition die Expression der mRNA für IL-12p40 bewirkte sowie zu einer Erhöhung der Menge an LPS-induzierter IL-12p35-mRNA führte (siehe Abb. 51). Dabei veränderte der Pollenextrakt weder die Produktion von TNF α noch die von IL-6 oder IL-10 und seine Wirkung auf die Zellen erwies sich als unabhängig von IL-10. PGE₂ dagegen führt zu einer Hemmung der Produktion von TNF α sowie zu einer Steigerung der Produktion von IL-10. Eine Inhibierung der Cyclooxygenase mit Indomethacin konnte die Wirkung des Pollenextraktes nicht beeinflussen. Das bedeutet, dass die Wirkung von Bet.-APE unabhängig von endogenen Cyclooxygenase-Produkten wie PGE₂ verläuft.

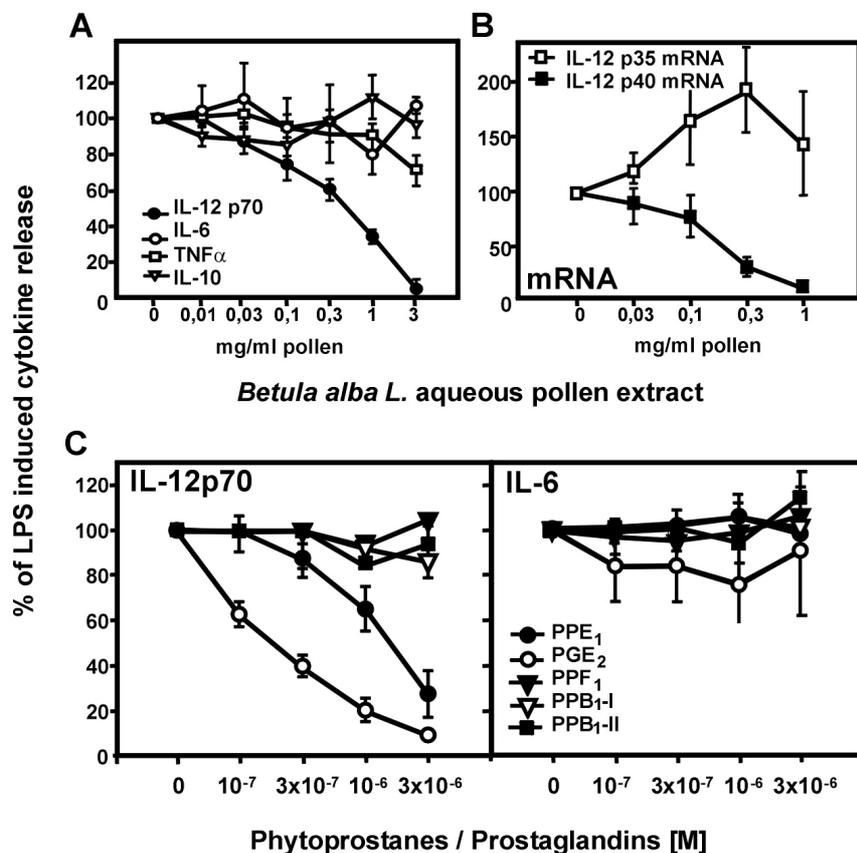


Abb. 51: Inhibition der Interleukinproduktion durch Bet.-APE (A, B) oder Phytoprostane/Prostaglandine (C). Quelle: Traidl-Hoffmann et al., 2005.

(A) DCs wurden in Gegenwart steigender Bet.-APE-Konzentrationen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert und nach 24h die Cytokine im Zellkultur-Überstand gemessen. Die Daten werden als Prozentanteil der LPS-induzierten Cytokinproduktion \pm S.D. (n = 5-6) gezeigt. (B) Unreife DCs wurden mit LPS und Bet.-APE stimuliert und nach 6h die Spiegel der mRNA für IL-12p35 und IL-12p40 gemessen. Es wurde eine quantitative Analyse der IL-12p40 und der p35 mRNA durchgeführt. Die Daten werden als Prozentsatz der LPS-induzierten IL-12p40 mRNA \pm S.D. (n = 3) gezeigt. (C) DCs wurden mit LPS (100 ng/ml) in Gegenwart verschiedener Phytoprostane in nichttoxischen Konzentrationen stimuliert und die resultierenden Konzentrationen von IL-12p70 und IL-6 bestimmt. Die Werte sind als Prozentanteil der LPS-induzierten Cytokinproduktion \pm S.D. (n = 6) gezeigt.

PPE₁ führt wie PGE₁ bei reifenden dendritischen Zellen zu einer Inhibierung der LPS-induzierten Produktion von IL-12p70 und steigert die Kapazität der DCs zur Th2-Polarisierung. Die Produktion von IL-6 wird durch beide Substanzen nicht beeinträchtigt. PPE₁ ist allerdings etwas schwächer wirksam als PGE₁ und verursacht erst in Konzentrationen > 1µM einen Effekt. Daneben fördert PPE₁ nicht wie PGE₂ die Stimulus-induzierte Reifung der dendritischen Zellen (Traidl-Hoffmann et al., 2005). Anders als PPE₁ können PPB₁-I, PPB₁-II oder PPF₁ weder die LPS-induzierte Produktion von IL-12p70 noch die LPS-induzierte Produktion von IL-6 beeinflussen.

Ob PPE₁ allein für die Wirkung von Bet.-APE verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Jedenfalls erwiesen sich die getesteten Hydroxyfettsäuren von Linol- oder Linolensäure als völlig unwirksam: Die Produktion von IL-12p70 wird durch 9- und 13-HODE oder 9- und 13-HOTE selbst in Konzentrationen von 10⁻¹¹ bis 10⁻⁵ M nicht gehemmt. Die genaue Wirkungsweise des Pollenextraktes ist noch nicht bekannt, allerdings entspricht der Wirkmechanismus nicht dem von PGE₂. Da die Wirkung des Pollenextraktes unabhängig von endogenen Cyclooxygenase-Produkten verläuft, wird sie möglicherweise durch die direkte Ligation von PPE₁ an einen Rezeptors vermittelt.

In diesem Zusammenhang könnten Phytoprostane lokal als Mediatoren der allergischen Reaktion dienen und an der Auslösung der allergischen Reaktion beteiligt sein oder diese verstärken. Die systemische Bedeutung der immunmodulatorischen Eigenschaften der Phytoprostane muss jedoch aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden. Bei einigen Krankheiten herrscht ein Ungleichgewicht von Th1- und Th2-Zellen und das Verhältnis ist stark zu Th1 hin verschoben. In diesem Zustand werden zu viele proinflammatorische Th1-Cytokine produziert, welche dann gegenüber den antiinflammatorisch wirkenden Th2-Cytokinen stark überwiegen. Aus diesem Grund können Substanzen, welche eine Th2-Polarisierung auslösen, durch eine verminderte Bildung von Th1-Zellen und der damit verbundenen Drosselung der zellulären Immunreaktion (Makrophagen, cytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen) eine Eindämmung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, ulcerative Colitis, Morbus Crohn und Psoriasis) bewirken (Wallace et al., 2001).

V.3.3.2 Entzündungshemmende Wirkung durch Hemmung von NF-κB

In Pflanzen stellen Phytoprostane einen verlässlichen Marker für stressinduzierte Lipidperoxidation dar. Cyclopentenon-Phytoprostane können darüber hinaus pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen, welche gegen Pathogene gerichtet sind und vor den Konsequenzen von oxidativem Stress schützen können (Thoma et al., 2003; Loeffler et al., 2005). In Säugetieren besitzen Cyclopentenon-Prostaglandine und Isoprostane antiinflammatorische, Apoptose-induzierende und antivirale Eigenschaften (Strauss und Glass, 2001). Die antiinflammatorischen Eigenschaften der Cyclopentenone beruhen zumindest zum Teil auf Inhibierung des NF-κB-Signalwegs. Ob auch die Cyclopentenon-Phytoprostane in Säugetierzellen eine Hemmung des NF-κB-Signalwegs induzieren können, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe V. Dirsch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München durch zwei in vitro Versuche getestet. Dabei wurden die Effekte von Cyclopentenon-Phytoprostanen mit denen von Cyclopentenon-Prostaglandinen verglichen.

Mit einem NF- κ B-Luciferase-Assay wurde die Hemmung der NF- κ B induzierten Genexpression durch Cyclopentenone untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen (Nierenzellen aus menschlichem Embryo) mit den Plasmiden pNF- κ B-luc und pFC-MEKK (Stratagene, Heidelberg) als Positivkontrolle für die NF- κ B-gesteuerte Transkription sowie pRSV- β -gal (Clontech, Heidelberg) als Transfektionskontrolle transformiert. In diesen Zellen induziert aktives NF- κ B die Transkription des Gens für die Luciferase. Als Testsubstanzen wurden PPA₁ (1:1-Mischung von Typ I und II), PPB₁ Typ I und II, dPPJ₁ Typ I und II sowie PGA₁ und dPGJ₂ untersucht. Die Testsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit Medium weiter verdünnt, so dass die Endkonzentration von DMSO im Zellüberstand weniger als 1 % betrug. Bei dieser Konzentration hatte sich in Vorversuchen keine Beeinflussung der Testsysteme gezeigt. Bei der Durchführung des Assay wurden die transfektierten HEK 293 Zellen 2h mit den der Testsubstanzen vorinkubiert und anschließend mit 1 ng/ml TNF- α stimuliert. Nach 6h wurden die Zellen lysiert und die NF- κ B-Aktivität anhand eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays (Luciferase Assay System, Promega, Heidelberg) bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 10 μ M MG 132 verwendet, ein Proteasom-Inhibitor mit dem Molekulargewicht 132 Da. Die Ergebnisse sind in Abb. 52 dargestellt.

NF- κ B-Transaktivierungs-Assay

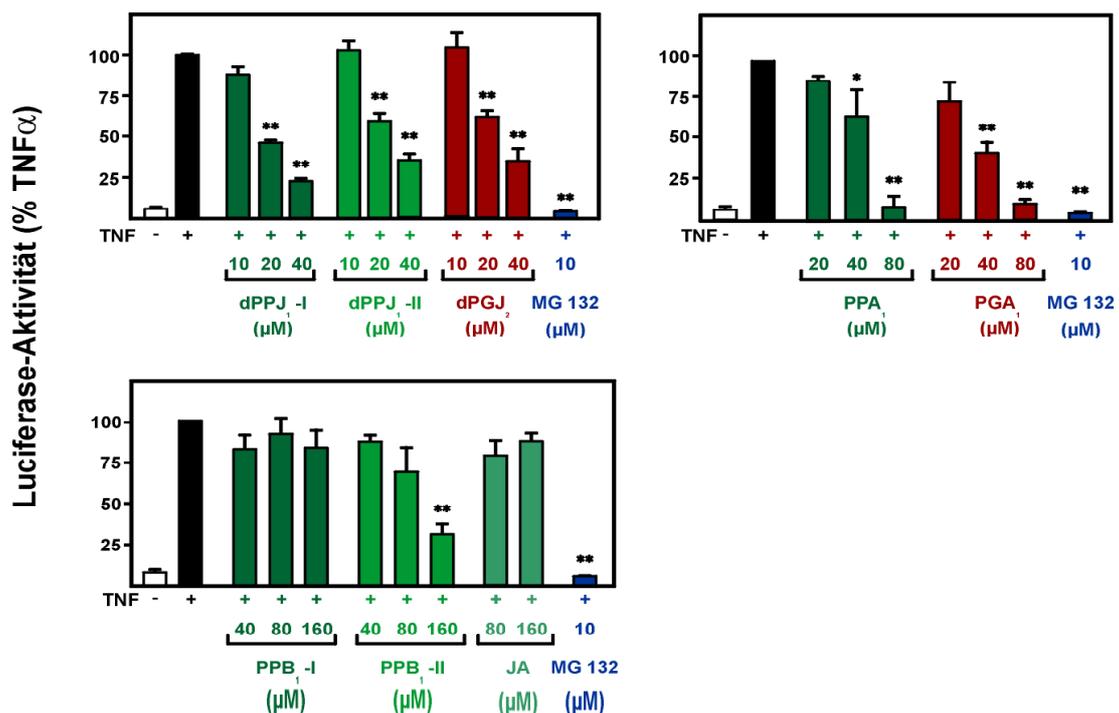


Abb. 52: Inhibition der TNF- α induzierten Aktivierung von NF- κ B durch Phytoprostane und Prostaglandine. NF- κ B-Transaktivierungs-Assay mit transfektierten HEK 293-Zellen: HEK 293-Zellen wurden transient mit einem NF- κ B Luciferase Reporter-Plasmid transfektiert und mit Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen (μ M) oder MG132 (10 μ M, Positivkontrolle) für 2h vorbehandelt und dann mit 1 ng/ml TNF- α über 6h stimuliert. Die Daten werden als % Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den mit nur TNF- α allein behandelten Zellen dargestellt (Mittelwert \pm S.D., Dreifachbestimmung). Sternchen * deuten signifikante Unterschiede an. Ergebnisse von Dr. V. Dirsch, veröffentlicht in Karg et al. (zur Publikation angenommen).

MG 132 inhibierte die TNF α -induzierte NF- κ B-Transaktivierung vollständig. Bei den Phytoprostanen konnten abhängig von den unterschiedlichen Ringsystemen bei den verwendeten Konzentrationen unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte beobachtet werden. PPA₁ konnte dosisabhängig (20-80 μ M) die Transaktivierung von NF- κ B in einem zu PGA₁ vergleichbarem Ausmaß inhibieren. DPPJ₁ I und II zeigten dosisabhängige Effekte sogar in niedrigen Konzentrationen (10-40 μ M), welche sehr gut mit den Effekten von dPGJ₁ korrelierten. PPB₁ jedoch waren in niedrigen Dosen gar nicht aktiv und lediglich Typ II zeigte bei 160 μ M einen signifikanten Effekt. Im Gegensatz dazu erwies sich das Cyclopentanon Jasmonsäure (JA) als noch weniger wirksam und führte bei 160 μ M nur zu einem geringen Effekt.

In einem weiteren Versuch wurde die Hemmung der Expression eines NF- κ B-abhängigen Gens, der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), in einer murinen Makrophagenzelllinie (RAW 264,7) untersucht. Dafür wurden die Zellen in Gegenwart der Testsubstanzen (0-160 μ M) mit bakteriellem Lipopolysaccharid (1 μ g/ml LPS) stimuliert. Nach 20h wurde das gebildete NO über das im Zellüberstand akkumulierte Sekundärprodukt Nitrit bestimmt, welches mit der Griess-Reaktion quantifiziert wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 53 dargestellt.

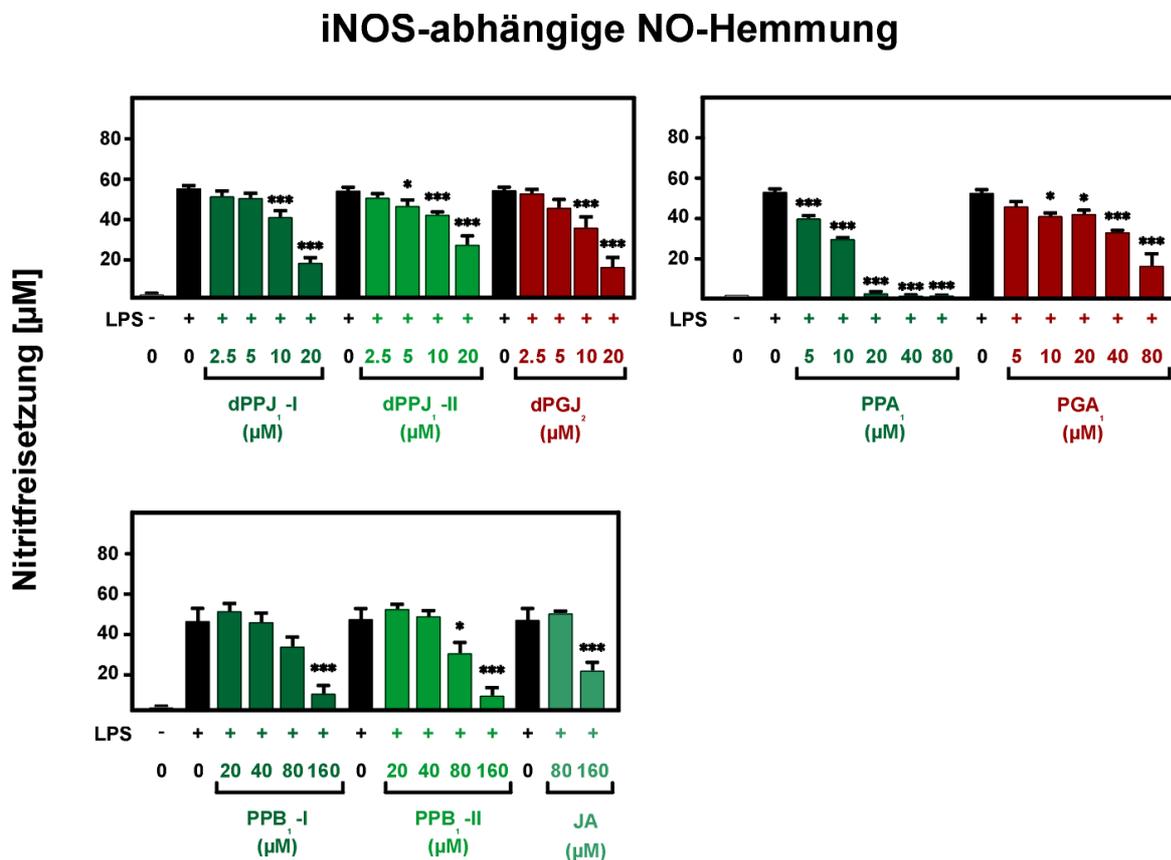


Abb. 53: Inhibition der durch NF- κ B-induzierten Genexpression durch Phytoprostane und Prostaglandine. Hemmung der Genexpression für iNOS in mit LPS-stimulierten RAW264,7-Makrophagen. RAW264,7-Maus-Makrophagen wurden mit Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen (μ M) und LPS (1 mg/ml) für 20h inkubiert. Als Indikator für die NO-Synthese wurde Nitrit, ein stabiles Abbauprodukt von NO, bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der gefundenen Nitritmenge [μ M] \pm S.D., Dreifachbestimmung). Sternchen * deuten signifikante Unterschiede an. Ergebnisse von Dr. V. Dirsch, veröffentlicht in Karg et al. (zur Publikation angenommen).

Wie in Abb. 53 ersichtlich, vermochten die getesteten Cyclopentenone in Konzentrationen ab 10 μM die NO-Synthese zu hemmen. PPA₁ erwies sich als die potenteste der getesteten Verbindungen und war bereits ab Konzentrationen von 5 μM wirksam. Die IC₅₀-Werte von PPA₁, dPPJ₁-I, dPPJ₁-II und dPGJ₁ befanden sich in der Größenordnung von 10-20 μM , wohingegen die IC₅₀-Werte von PGA₁ und PPB₁ im Bereich > 40 μM lagen. Die B₁-Phytosterane PPB₁-I und PPB₁-II waren in diesem Assay erst ab Konzentrationen von 160 bzw. 80 μM aktiv. JA zeigte ebenfalls erst ab 160 μM eine geringe Wirkung.

PPA₁ und dPPJ₁ können also sowohl die durch TNF- α induzierte Transaktivierung von NF- κB in HEK 293-Zellen als auch in murinen RAW264.7 Makrophagen die NF- κB -abhängige Bildung von NO durch die induzierbare NO-Synthase hemmen. In beiden Zellsystemen waren PPA₁ und dPPJ₁ mindestens so potent wie die entsprechenden Prostaglandine PGA₁ und deoxy-PGJ₁ und in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 50 μM aktiv.

V.3.3.3 Anti-Tumor-Wirkung der Cyclopentenon-Phytosterane

Cyclopentenon-Prostaglandine können in verschiedenen Zelltypen Apoptose verursachen (Clay et al., 1999; Kondo et al., 1999; Levonen et al., 2001; Emi und Maeyama, 2004; Erl et al., 2004). Deshalb wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe V. Dirsch untersucht, ob auch Cyclopentenon-Phytosterane im gleichen Ausmaß wie Cyclopentenon-Prostaglandine Apoptose von Tumorzellen verursachen können. Dafür wurden menschliche Jurkat-T-Zellen (Klon J16, Gabe von Dr. P. Kramer, DKFZ Heidelberg) mit Phytosteranen, Prostaglandinen und Jasmonsäure behandelt und der dabei erzielte Effekt verglichen. Als Positivkontrolle diente Etoposid. Die Apoptose wurde über die Zellmorphologie und die Visualisierung von apoptotischen Nuclei im Fluoreszenzmikroskop nach Anfärben mit Hoechst 33342 abgeschätzt und die apoptotische Zelldichte durch Bestimmung der DNA-Fragmentierung ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 54 dargestellt.

Auch bei der Induktion von Apoptose in Jurkat-Zellen waren PPA₁ und PPB₁ wie PGA₁ und deoxy-PGJ₁ im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 μM aktiv. Wie in Abbildung 50 ersichtlich, konnten J₁-Phytosterane ähnlich wie J₂-Prostaglandine im Konzentrationsbereich von 20 – 40 μM Apoptose induzieren, wobei beide Substanzklassen gleich wirksam waren. PPA₁-I war im selben Konzentrationsbereich wie PGA₁ (10-40 μM) aktiv, erzeugte allerdings einen stärkeren Effekt (60 % Apoptose im Vergleich zu 33 %). Dabei war von PPA₁ der Typ I wesentlich aktiver als Typ II, und PPA₁-II zeigt erst ab 80 μM deutliche Wirkung. Im Gegensatz dazu erwiesen sich PPB₁-I und PPB₁-II in diesem Assay selbst in Konzentrationen 80 μM als inaktiv. Auch durch JA in der Konzentration von 40 μM konnte kein signifikanten Effekt erzielt werden.

Tumorzell-Apoptose

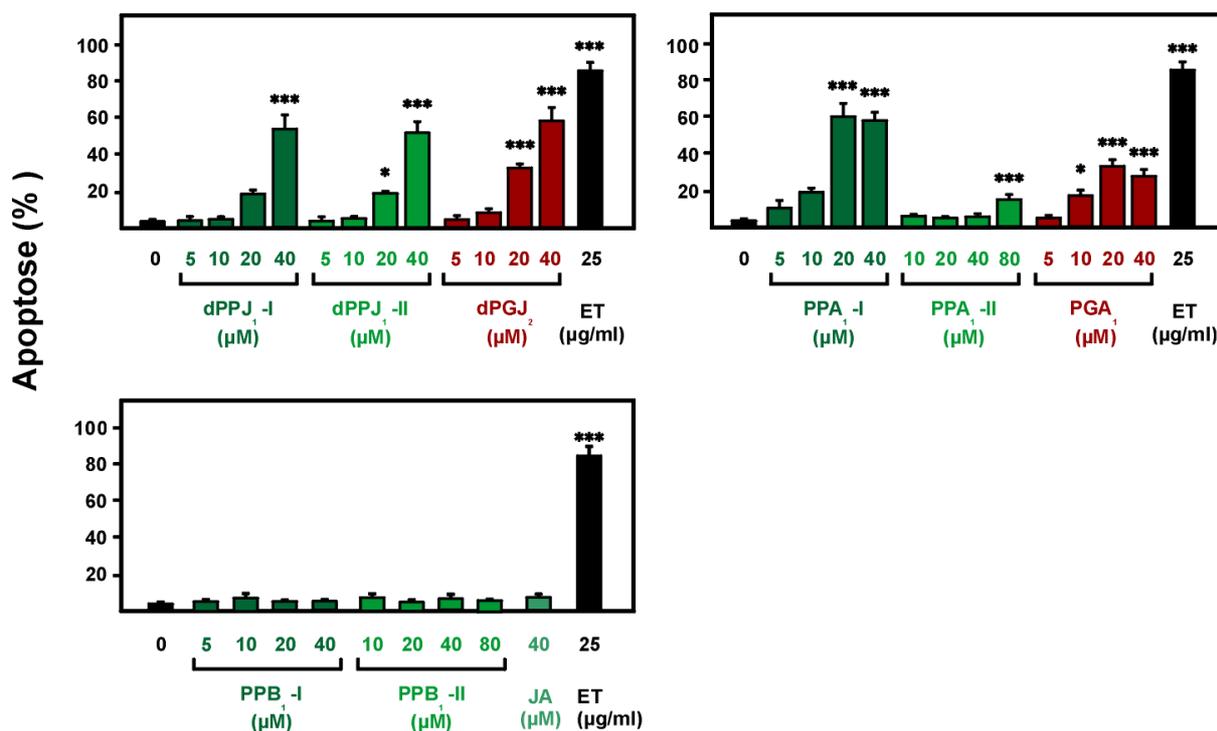


Abbildung 54: Induktion von Apoptose in Jurkat-T-Zellen durch Phytoprostane und Prostaglandine. Die Zellen wurden mit Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen (μM) oder Etoposid (25 $\mu\text{g/ml}$, Positivkontrolle) inkubiert und nach 12h mittels Flusszytometrie analysiert. Nuclei links des ‚G1-Peaks‘, welche einen sub-diploiden DNA-Gehalt zeigten wurden als apoptotisch beurteilt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm S.D. Sternchen * deuten signifikante Unterschiede an. Ergebnisse von Dr. V. Dirsch, veröffentlicht in Karg et al. (zur Publikation angenommen).

Im Blut des Menschen sind die Plasmaspiegel von freien Cyclopentenon-Prostaglandinen und Cyclopentenon-Isoprostanen entweder nicht detektierbar oder mehrere Größenordnungen unterhalb dieser wirksamen Konzentration. Bemerkenswerterweise liegen die Konzentrationen von freiem PPA₁ in frischem Pflanzenöl (0,1 – 2,3 μM) höher als die Cyclopentenon-Prostanoide in sämtlichen bisher untersuchten biologischen Materialien. Außerdem können die veresterten PPA₁ (bis zu 20 μM) durch die Lipase freigesetzt werden. Demnach liegen die Cyclopentenon-Konzentrationen in frischem Pflanzenöl nahe an dem Konzentrationsbereich, welcher in verschiedenen Bioassays Aktivität vermitteln kann. In der Praxis könnten biologisch relevante Konzentrationen durch Verwendung von partiell oxidierten Speiseölen im Haushalt erreicht werden.

V.3.3.4 Direkte Cytotoxizität der Phytoprostane

Um auszuschließen, dass die in V.3.3.2 und V.3.3.3 beobachteten Effekte auf eine direkte Cytotoxizität der getesteten Phytoprostane zurückzuführen sind, wurde von Dr. V. Dirsch die

Viabilität der HEK-Zellen und der RAW 264,7-Zellen nach Zugabe der Phytoprostane untersucht. In den mit pRSV- β -gal transformierten HEK 293-Zellen wurde Zellviabilität anhand der gemessenen β -Glaktosidase-Aktivität ermittelt. In den RAW 267,4-Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die Zellviabilität anhand der Zellrespiration untersucht, welche über die Mitochondrien-abhängige Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolizumbromid = MTT zu Formazan bestimmt wurde. Dabei konnten im Vergleich zu den mit TNF- α oder LPS aktivierten Zellen keine toxischen Effekte durch die Phytoprostane dPPJ₁, PPA₁ und PPB₁ in Konzentrationen bis 160 μ M festgestellt werden. Das bedeutet also, dass die Phytoprostane selbst in höheren Konzentrationen per se keine Cytotoxizität besitzen und die beobachteten apoptotische Wirkung der Phytoprostane auf zellspezifische Effekte zurückzuführen sind.

V.3.4 Potentielle Wirkung von Phytoprostanen im Menschen

Prinzipiell stellen oxidierte Fettsäuren aus der Nahrung ein atherogenes Risiko dar, da sie in Lipoproteine eingebaut werden und von dort aus in den Blutgefäßen immunologische Reaktionen hervorrufen könnten (Penumetcha et al., 2000). Der atherosklerotische Prozess beginnt mit einer Ablagerung von verändertem Cholesterin in den Arterienwänden. Hier ist vor allem Cholesterin in oxidiertem LDL von Bedeutung, denn im Gegensatz zu nativem LDL wird oxidiertes LDL schnell von Monozyten/Makrophagen akkumuliert und bildet zusammen mit diesen lipidreiche Schaumzellen. Außerdem aktiviert oxidiertes LDL Endothelzellen, indem es eine Produktion von Entzündungsmediatoren in Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur induziert, die Adhäsion von Leukozyten an Kapillarendothelzellen stimuliert und die Differenzierung von Monozyten verursacht (Lynch et al., 1994; Waddington et al., 2003). Dabei scheint weniger die chronische Entzündung allgemein, sondern vor allem die gebildeten Thromboxane entscheidend für die Entwicklung der Krankheit zu sein. Eine Behandlung von Atherosklerose-Frühsstadien mit TP-Inhibitoren zeigte mehr Wirkung als die Behandlung mit COX-1 oder COX-2 Hemmern (Egan et al., 2005). Allerdings kann der TP-Rezeptor nicht nur von Thromboxanen, sondern auch gut von E₂- und F₂-Isoprostanen ligiert werden. Diese könnten also mit an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sein. In Blut- und Urinproben von Patienten mit Atherosklerose oder mit Risikofaktoren (Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Diabetes, Adipositas) wurden erhöhte Spiegel an iPF_{2 α} -III gefunden (Praticó et al., 1997; Morrow, 2005). Dennoch sind Isoprostane im Vergleich zu anderen oxidierten Lipiden im atherosklerotischen Plaque nur in sehr geringer Menge vorhanden. Die Konzentrationen anderer Autoxidationsprodukte der Arachidonsäure (15-HETE, 11-HETE, 11-oxo-ETE) und der Linolsäure (HODEs, 9-oxoODE, 13-oxo-ODE) sind ebenfalls erhöht und übersteigen die Konzentrationen der F₂-Isoprostane um das 20 bis 40fache (Waddington et al., 2003). Es wird diskutiert, dass auch oxidierte Lipide aus der Nahrung das Atheroskleroserisiko erhöhen können. Allerdings stellen Phytoprostane nur einen kleinen Anteil an den gesamten oxidierten Lipiden dar.

Einige der getesteten Speiseöle enthalten Phytoprostane in mikromolaren Konzentrationen, einem Konzentrationsbereich, in welchem die Cyclopentenon-Phytoprostane (PPA₁, PPB₁ und dPPJ₁) und PPE₁ biologische Aktivität zeigen. Biologisch relevante Plasmakonzentrationen an Phytoprostanen werden jedoch nach oraler Aufnahme von Speiseölen nicht erreicht.

Die bestimmten PPF₁-Spiegel im Blutplasma nach einer lipidreichen Mahlzeit betragen maximal 1 nM. Phytoprostane werden vermutlich schnell metabolisiert und ausgeschieden, so dass die in vivo erreichten Konzentrationen zu niedrig sind. Dagegen sind die Phytoprostan-Konzentrationen im Magen-Darm-Trakt möglicherweise ausreichend hoch, um biologische Wirkungen auszulösen. Untersucht wurde dies jedoch nicht, so dass darüber keine Aussage getroffen werden kann.

Der Konsum von phytoprostanreichem Speiseöl könnte dazu beitragen, Entzündungen im Magen-Darm-Trakt zu mindern. So wird Leinsamen innerlich zur Behandlung von Gastritis und Enteritis eingesetzt. Äußerlich wurde frisch gemahlener Leinsamen als Umschlag bei Hautentzündungen und Geschwüren eingesetzt. Als Heilmittel wurde er schon in den hippokratischen Schriften aufgeführt. Hildegard von Bingen, Bock und Matthiolus berichteten von seiner entzündungswidrigen und schmerzstillenden Wirkung. Die entzündungshemmende Wirkung von 15 ml Leinöl oder 2 g Linolensäure pro Tag ist gut belegt (Rallidis et al., 2003; Thies et al., 2001), wenn auch die zugrunde liegenden Mechanismen noch diskutiert werden. Weiterhin ist es denkbar, dass die für PPE₁ in vitro beobachtete Modulation des Immunsystems (V.3.3.1) auch in vivo mit Phytoprostanen aus der Nahrung stattfinden kann. In einigen Versuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass durch Verzehr bestimmter Speiseöle die Polarisierung der T-Zellen beeinflusst werden kann: N-3 PUFAS können die Produktion der Th1-abhängigen Cytokine IL-2 und IFN- γ durch die in der Milz ansässigen Lymphozyten inhibieren (Wallace et al., 2001). Dabei führt oxidiertes Sojaöl zu einer höheren Th2-Polarisierung als frisches Sojaöl (Lin et al., 2000). Dieser durch die Ernährung ausgelöste Effekt könnte möglicherweise auf im Futter vorhandene wirksame PPE₁ zurückzuführen sein. Öle, welche reich an Linolensäure sind, enthalten immer eine gewisse Menge an Phytoprostanen. Oxidiertes Sojaöl sollte mehr Phytoprostane besitzen als frisches. Auch für Olivenöl, welches trotz seines äußerst geringen Gehalts an α -Linolensäure relativ viele Phytoprostane enthält, wurde eine positive Wirkung bei entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen (wie rheumatoide Arthritis) beobachtet. Der hierbei stattfindende Mechanismus ist allerdings noch unbekannt (Alarcon de la Lastra, 2001).

Daneben ist es denkbar, dass die in den Ölen enthaltenen PPE₁ analog zu PGE₁ und PGE₂ gastroprotektive Wirkung ausüben können (vgl. Abschnitt I.2.4.1). Durch Ligation des EP-Rezeptors der Belegzellen des Magens wird eine Inhibition der Sekretion von Magensäure ausgelöst (Bertaccini und Coruzzi, 1988). Deshalb wird in der Gastroenterologie das PGE₁-Analogon Misoprostol zur Behandlung von Magenschleimhautschädigungen und der Therapie von akuten Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren eingesetzt. Tatsächlich übt eine Olivenöl-reiche Ernährung einen positiven Einfluss auf die Heilung von Magengeschwüren und ulcerativer Colitis aus (Alarcon de la Lastra, 2001; Nieto et al., 2002). Auch dieser Wirkmechanismus ist bislang ungeklärt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass nichtresorbierte A₁-Phytoprostane Apoptose von Dickdarmkrebszellen hervorrufen und Speiseöle so einen antikanzerogenen Effekt vermitteln können. Ein Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Entstehung von Dickdarmkrebs ist jedenfalls schon lange bekannt (Willett, 2000). In Versuchen mit Ratten wurde bereits in vivo die protektive Wirkung einer Diät mit 5 % Olivenöl (Bartolí et al., 2000) oder 15 % Leinöl (Dwivedi et al., 2005) gegen die Entstehung von Dickdarntumoren gezeigt. Im Vergleich dazu förderten Diäten, welche reich an Omega-6-Fettsäuren (z.B. Weizenkeimöl, Färberdistelöl) waren, das Tumorstadium. Welche Faktoren an dieser Wirkung beteiligt sind, ist allerdings noch unklar.

V.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Phytoprostane in mikromolaren Mengen in Lebensmitteln enthalten sind und zum Teil unverändert resorbiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach einer lipidreichen Mahlzeit Phytoprostane in nanomolaren Mengen im menschlichen Blutkreislauf vorkommen. Verschiedene Experimente gaben Rückschluss auf eine gewisse biologische Aktivität von Phytoprostanen im Säugetier. Durch die Versuche von Traidl-Hoffmann und Dirsch konnten *in vitro* definierte biologische Wirkungen der Phytoprostane (Modulation der Funktion von Immunzellen, Hemmung von Entzündungsvorgängen, Induktion von Apoptose) nachgewiesen werden. Jedoch zeigt die Erfahrung mit der biologischen Aktivität der Isoprostane, dass die beobachteten Wirkungen meist nur auf bestimmte Isomere zutreffen und andere weniger aktiv oder wirkungslos sind. Das nächste Versuchsziel muss hier neben einer generellen Erweiterung des Wissens über die biologische Aktivität der Phytoprostane die Spezifizierung der Wirkung auf bestimmte Regio- und Stereoisomere sein. Weiterhin muss die für eine biologische Aktivität erforderliche Konzentration und Wirkung einer Mischung aller Phytoprostane, wie sie im Lebensmittel vorliegt, näher bestimmt werden, denn bisher wurden nur einzelne Vertreter untersucht. Ferner muss überprüft werden, ob die in Lebensmitteln vorkommenden natürlichen Phytoprostan-Konzentrationen ausreichend hoch sind, um biologische Wirkungen *in vivo* auszulösen.

Vor kurzem sind verschiedene Phytoprostane durch Totalsynthese zugänglich geworden, darunter die PPF₁-I (Fangour et al., 2003), PPE₁-I (Rodriguez und Spur, 2003), PPB₁-I und PPB₁-II (Durand et al., 2004) sowie dPPJ₁-I und dPPJ₁-II (Iqbal et al., 2005). Dies ermöglicht eine vertiefte Untersuchung ihrer Wirkung, da nun nicht mehr die Anwesenheit störender Nebenprodukte aus der Autoxidation befürchtet werden muss. Hier werden die wichtigsten Fragestellungen sein, welche Rezeptoren (Prostaglandin-, Thromboxan-, Isoprostanrezeptor oder PPAR-Subtypen) und Proteine durch die Phytoprostane beeinflusst werden und ob ihr Wirkungsspektrum dem der Isoprostane ähnelt.

Des Weiteren kann durch Synthese und Fütterung radioaktiv markierter Verbindungen die Absorption und der Metabolismus von Phytoprostanen in Tieren quantitativ bestimmt werden. Dann können auch andere Phytoprostane außer PPF₁ untersucht werden. Erst dann kann wirklich eine exakte Aussage darüber getroffen werden, in welchem Ausmaß die Phytoprostane aus der Nahrung in den menschlichen Körper gelangen können und die durch die Nahrung aufgenommenen Phytoprostane können eindeutig von endogen gebildeten Phytoprostanen unterschieden werden.

VI Zusammenfassung

Durch freie, radikalkatalysierte Oxidation von Linolensäure können *in vitro* und *in vivo* mehrere Klassen von Phytoprostanen gebildet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Phytoprostane in Pflanzenmaterial (Blättern, Blütenpollen), Speiseölen sowie in menschlichen Körperflüssigkeiten (Blut und Urinproben) untersucht. Dabei wurden die vorhandenen Methoden so optimiert, dass sämtliche Phytoprostan-Klassen aus unterschiedlichem Probenmaterial bestimmt werden können. Zusätzlich wurden neue Methoden entwickelt, um Phytohormone sowie verschiedene Metabolite des pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsels zusammen mit einer gemeinsamen Aufarbeitung erfassen und bestimmen zu können.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Blütenpollen enthalten mehrere mmol/g an Phytoprostanen, darunter PPA₁/PPB₁, PPE₁ und PPF₁. Physiologisch relevant sind jedoch nur die Mengen, die sich nach Extraktion in einem wässrigen Puffer wiederfinden lassen. Deshalb wurden hier erstmals wässrige Extrakte von Birkenpollen untersucht. In diesen befanden sich durchschnittlich 60 nmol PPE₁ und 10 nmol PPF₁ pro g extrahiertem Pollen.
2. Pflanzenöle enthalten α -Linolensäure bis zu einem Gewichtsanteil von 56 % (m/m). In Speiseölen aus ausgesuchten Pflanzenarten (Leinöl, Sojaöl, Olivenöl), Walnussöl, Traubenkernöl) und parenteraler Nahrung (Intralipid) wurden die Phytoprostanklassen A₁, B₁, D₁, E₁, F₁ und deoxy-J₁ nachgewiesen und quantifiziert. In frischen Ölen wurden große Mengen an Phytoprostanen (0,4 – 101 mg/g Öl) gefunden, welche teilweise frei und teilweise verestert vorlagen. Leinöl und Sojaöl enthielten mit 26 μ g/g und 29 μ g/g insgesamt die größten Mengen an Phytoprostanen. Der absolute Phytoprostangehalt der Öle nahm in folgender Reihe ab: Leinöl \approx Sojaöl > Olivenöl > Walnussöl > Rapsöl \gg Traubenkernöl. Überraschenderweise korrelierte der Phytoprostangehalt der Öle nicht mit ihrem Linolensäuregehalt und auch nicht mit der Menge an enthaltenem Vitamin E (α -Tocopherol). In allen untersuchten Ölen dominierten entweder PPE₁ oder PPF₁ als häufigste Phytoprostanklasse. PPA₁ und PPB₁ waren lediglich als untergeordnete Bestandteile enthalten. PPD₁ konnte nur in sehr geringen Mengen gefunden werden; dPPJ₁ konnte nur im Bio-Sojaöl detektiert werden.
3. Wenn ein Öl bei längerer Lagerung autoxydiert, können die Gehalte an oxidierten Fettsäuren um ein Vielfaches ansteigen. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Autoxydation von Speiseölen weitere Phytoprostane entstehen und die Konzentrationen von PPE₁ und PPF₁ im Öl bis auf das 10-fache ansteigen können. Weiterhin wurde dabei die Bildung von detektierbaren Mengen dPPJ₁ nachgewiesen. Die Kinetik der Phytoprostanbildung folgte dem für andere Autoxydationsprodukte typischem zeitlichen Verlauf und erst nach Überschreiten einer Induktionsperiode traten vermehrt Phytoprostane auf. Zugabe von Wasser und intensiver Kontakt mit Luftsauerstoff führte zu einer Beschleunigung der Phytoprostanbildung. Bei Lagerung von Bio-Sojaöl bei 50 °C (Modellversuch zur Oxidationsbereitschaft) trat hingegen eine deutliche Zerset-

zung der gebildeten PPE₁ und dPPJ₁ ein; lediglich die Menge an PPF₁ nahm unter diesen Bedingungen deutlich zu.

4. Im menschlichen Verdauungstrakt sind Phytoprostane chemisch stabil. Allerdings können im sauren Milieu des Magens (pH 0-2) Dehydratisierungen auftreten: Nach Inkubation von PPE₁ in 0,1 M HCl waren nach 3 h noch 97 % intakt, wohingegen 3 % nichtenzymatisch zu PPA₁ konvertiert waren. Unter den gleichen Bedingungen wurden 19 % der inkubierten PGD₁ zu dPGJ₁ dehydratisiert.
5. In den Pflanzenölen veresterte PPF₁ wurden mit Schweinepankreas-Lipase innerhalb 1 h zu 44 bis 100 % hydrolysiert. Raffinierte Speiseöle, welche fast ausschließlich aus Triacylglyceriden zusammengesetzt sind, wurden die veresterten PPF₁ sogar zu fast 100 % hydrolysiert.
6. Weiterhin konnte erstmals gezeigt werden, dass Phytoprostane nach oraler Aufnahme resorbiert werden können und anschließend mit dem Urin ausgeschieden werden. Nach Verzehr von Pflanzenölen (Sojaöl, Olivenöl, Traubenkernöl) wurden die Spiegel von PPF₁ in Blut und Urin bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Phytoprostangehalt der Öle und dem Gehalt in den Blut- und Urinproben: Nach Konsum von Oliven- oder Sojaöl konnten innerhalb von 24 h PPF₁ in Blut und Urin wiedergefunden werden, wohingegen der Konsum von Traubenkernöl in den untersuchten Zeiträumen weder im Blut noch im Urin zu detektierbaren PPF₁-Mengen führte. Im Blut lag PPF₁ verestert vor: Im Serum von Olivenöl-Konsumenten konnten durchschnittlich 1,22 nmol/l PPF₁ gefunden werden. Das Serum eines Sojaöl-Konsumenten enthielt 0,97 nmol PPF₁/l. Die Ausscheidung von unmetabolisierten PPF₁ mit dem Urin erfolgte fast vollständig innerhalb der ersten 8 h, nach 8 bis 24 h konnten im Urin nur noch sehr geringe Mengen PPF₁ detektiert werden. In den Urinproben der Konsumenten von Olivenöl oder Sojaöl konnten nach 0-4 h durchschnittlich 2,02 bzw. 0,43 pmol PPF₁/mg Kreatinin und nach 4-8 h 1,39 bzw. 0,68 pmol PPF₁/mg Kreatinin gefunden werden.
7. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, welche die simultane Bestimmung von Phytohormonen, Oxylipinen und Fettsäuren ermöglicht. Deren Probenvorbereitung beruht auf Abtrennung von flüchtigen Substanzen in der Gasphase und vermag ein breites Spektrum an derivatisierten Analyten von vielen Begleitstoffen und Matrixkomponenten abzutrennen. Eine hohe Empfindlichkeit bis in den Picogramm-Bereich wird durch GC/MS-Messung im NCI-Modus gewährleistet.
8. Weiterhin wurden Methoden zur Metabolit-Analytik entwickelt, mit welchen Konzentrationsunterschiede zwischen zwei Proben direkt verglichen werden können. Dabei wurde der Extrakt der einen Probe mit unmarkierten Reagenzien derivatisiert und der andere Extrakt mit deuterierten Reagenzien umgesetzt. Bislang können etliche Fettsäuren und Aminosäuren gemeinsam aufgearbeitet und bestimmt werden.
9. Zur Markierung von Oxylipinen, sauren Phytohormonen und Aminosäuren mit ¹⁸O-Sauerstoff in der Carboxylgruppe wurden allgemein anwendbare Methoden entwickelt. Die [¹⁸O]₂-markierten Verbindungen erwiesen sich als stabil und eigneten sich als interner Standard in der GC-MS und HPLC-MS Analytik.

VI Summary

Free radical catalyzed oxidation of linolenic acid leads to the formation of several classes of phytoprostanes, which can occur *in vitro* and *in vivo*. In the present thesis, phytoprostanes have been determined in plant material (leaves, pollen), fatty oils and human body fluids (blood and urine samples). Within this work, existing methods were optimized in order to detect all phytoprostane classes in various materials. In addition, new methods for simultaneous detection and quantification of phytohormones and other plant primary and secondary metabolites together in one sampling procedure were developed.

The following results were obtained:

1. Pollen grains contain phytoprostanes in amounts of some mmol/g, among them PPA₁/PPB₁, PPE₁ und PPF₁. However, only the concentrations that can be achieved after extraction with water are physiologically relevant. Therefore, the quantity of phytoprostanes that can be extracted with aqueous buffer was examined. In aqueous birch pollen extract, considerable amounts of PPE₁ and PPF₁ have been found, ranging around 60 nmol PPE₁ and 10 nmol PPF₁ per gram extracted pollen.
2. Vegetable oils contain α -linolenic acid in concentrations up to 50% (m/m). In edible oils from selected plant species (linseed oil, soybean oil, olive oil, walnut oil, grape-seed oil) and parenteral nutrition (intralipid) the phytoprostane classes A₁, B₁, D₁, E₁, F₁ and deoxy-J₁ were identified and quantified. High levels of phytoprostanes (0,4 – 101 mg / g oil) in both free and esterified form were found even in apparently fresh oils. Linseed oil and soybean oil contained the highest levels of phytoprostanes (26 μ g /-g and 29 μ g-/g, respectively). The absolute phytoprostane content of the oil declined in the following order: Linseed oil \approx soybean oil > olive oil > walnut oil > rapeseed oil >> grape seed oil. Surprisingly, the total amount of phytoprostanes did not correlate well with the linolenic acid content and the content of vitamin E (α -tocopherole). In all oils, either PPE₁ or PPF₁ was the dominant phytoprostane class. PPA₁ and PPB₁ were only minor components. PPD₁ was found in very small amounts whereas dPPJ₁ could exclusively be detected in natural soybean oil.
3. Moreover, levels of oxidized lipids dramatically increase when oils become autoxidized upon prolonged storage. It was shown that during autoxidation of edible oils the levels of PPE₁ and PPF₁ may raise 10-fold. Furthermore, the formation of detectable amounts of dPPJ₁ was demonstrated. The formation of phytoprostanes showed the kinetics typical for all autoxidation products and the amount of oxylipin increased after an induction period. Addition of water and intensive contact with air lead to an increase of phytoprostane synthesis. Incubation of natural soybean oil at 50 °C (a common model for determining the oxidizability of oils) leads to decomposition of PPE₁ and dPPJ₁. Under these conditions, only the amounts of PPF₁ strongly increased.
4. In the human gastrointestinal tract, phytoprostanes are chemically stable. Indeed, exposed to the acidic conditions in the stomach (pH 0-2), dehydration reactions may take place. After incubation of PPE₁ in 0,1 M HCl for 3 h, 97% remained intact while 3%

were non-enzymatically converted to PPA₁. Under the same conditions, 19% of the incubated PGD₁ were converted into dPGJ₁.

5. Pancreatic lipase released 44 to 100 % of PPF₁ esterified in the plant oils within 1 h. Refined oils that consist almost completely of triacylglyceroles were hydrolyzed nearly by 100 %.
6. Furthermore, absorption of phytoprostanes from the human intestinal tract and excretion into urine could be demonstrated for the first time. After oral consumption of 100 ml of a vegetable oil (olive oil, soybean oil or grape seed oil) PPF₁ levels were determined in blood and urine. A strong correlation could be found between the amount of phytoprostanes in the oil and the PPF₁-content of the blood and urine samples. Within 24 hours after consuming olive or soybean oil, PPF₁ were found in the examined body fluids, whereas after the intake of grape seed oil, PPF₁ could be detected neither in blood nor in urine. In blood, PPF₁ occurred esterified and the collected blood samples of olive oil consumers contained 1,22 nmol/l PPF₁ on average while in the blood of one consumer of soybean oil 0,97 nmol PPF₁/l could be detected. Excretion of the unmetabolized PPF₁ in urine occurred nearly completely during the first 8 hours and 8 to 24 hours after the oil intake only very small amount of PPF₁ were still measured. 0-4 h after the oil consumption the urine of olive or soybean oil consumers contained on average 2,02 and 0,43 pmol PPF₁/mg creatinine and after 4-8 h 1,39 and 0,68 pmol PPF₁/mg creatinine, respectively.
7. A method that allows the simultaneous determination of phytohormones, oxylipins and fatty acids was developed. Sample preparation was based on collecting volatilized analytes in the gas phase. This gives the possibility of separating a broad spectrum of selectively derivatized analytes from non-volatile matrix compounds. High sensitivity up to the picogram range was achieved by GC/MS in the negative chemical ionization mode.
8. Additionally, methods were developed that enable a direct comparison of two different samples in a sum of metabolites. One extract was derivatized with unlabeled reagents while the other was derivatized with deuterated reagents, which lead to the formation of triply deuterated derivates. These methods were shown to be suitable for the determination of fatty acids and amino acids.
9. For the labeling of oxylipins, acidic phytohormones and amino acids with ¹⁸O in the carboxyl group general methods were established. The [¹⁸O₂]-labelled compounds are stable and suitable as internal standards for GC/MS and HPLC/MS analysis.

VII Anhang

VII.1 Publikationsliste

Traidl-Hoffmann, C.; Mariani, V.; Hochrein, H.; Karg, K.; Wagner, H.; Ring, J.; Mueller, M.J.; Jakob, T.; Behrendt, H. (2005): Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper cell 2 polarization. *Journal of Experimental Medicine* 201, 627-635.

Mueller, M.J.; Mène-Saffrané, L.; Grun, C.; Karg, K.; Farmer, E.E. (2006): Oxylipin analysis methods. *Plant Journal* 45, 472-489.

Karg, K.; Dirsch, V.; Vollmar, A.M.; Crakowski, J.-L.; Laporte, F.; Mueller, M.J. Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and lipid nutrition. *Free Radical Research*, zur Publikation angenommen.

VII.2 Literatur

Abramovitz, M.; Adam, M.; Boie, Y.; Carriere, M.; Denis, D.; Godbout, C.; Lamontagne, S.; Rochette, C.; Sawyer, N.; Tremblay, N.M.; Belley, M.; Gallant, M.; Dufresne, C.; Gareau, Y.; Ruel, R.; Juteau, H.; Labelle, M.; Ouimet, N.; Metters, K.M. (2000): The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1483, 285-293.

Aizawa, Y.; Yamada, K. (1976): Determination of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_2 contents in human cerebrospinal fluid by the radioisotope dilution method. *Prostaglandins* 11/1, 43-50.

Alarcon de la Lastra, C.; Barranco, M.D.; Motilva, V., Herrerias, J.M. (2001): Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr. Pharm. Des.* 7/10, 933-950.

Allegra, J.; Trautlein, J.; Demers, L.; Field, J.; Gillin, M. (1976): Peripheral plasma determinations of prostaglandin E in asthmatics. *J. Allergy Clin. Imm.* 58/5, 546-550.

Aly, A. (1987): Prostaglandins in clinical treatment of gastroduodenal mucosal lesion: a review. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 137, 43-49.

Ambring, A.; Friberg, P.; Axelsen, M.; Laffrenzen, M.; Taskinen, M.-R.; Basu, S.; Johansson, M. (2004): Effect of a Mediterranean-inspired diet on blood lipids, vascular function and oxidative stress in healthy subjects. *Clin. Sci.* 106, 519-525.

Armstrong, R.A. (1996): Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol. Ther.* 72/3, 171-191.

D'Arrigo, M.; Hoz, L.; Lopez-Bote, C.J.; Cambero, I.; Pin, C.; Ordóñez (2002): effect of dietary linseed oil on hepatic tissue fatty acid composition and susceptibility to lipid peroxidation. *Nutr. Res.* 22, 1189-1196.

Audoly, L.P., Rocca, B.; Fabre, J.-E.; Koller, H., Thomas, D.; Loeb, A.L.; Coffman, T.M.; FitzGerald, G.A. (2000): Cardiovascular responses to the isoprostanes $iPF_{2\alpha}$ -III und iPE_2 -III are mediated via the thromboxane A_2 receptor in vivo. *Circulation* 101, 2833-2840.

Von Aulock, S.; Hermann, C.; Hartung, Th. (2003): Determination of the eicosanoid response to inflammatory stimuli in whole blood and its pharmacological modulation ex vivo. *J. Imm. Meth.* 277, 53-63.

Baba, N.H.; Ghossoub, Z.; Habbal, Z. (2000): Differential effects of dietary oils on plasma lipids, lipid peroxidation and adipose tissue lipoprotein lipase activity in rats. *Nutr. Res.* 20/8, 1113-1123.

Bartolí, R.; Fernández-Banarez, F.; Navarro, E.; Castellà, E.; Mané, J.; Alvarez, M.; Pastor, C.; Cabré, E.; Gassull, M.A. (2000): Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: Modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E₂ synthesis. *Gut* 46, 191-199.

Beal, M.H.; Ward, J.L. (1998): Jasmonates: key players in plant defense. *Nat. Prod. Rep.*, 533-548.

Behrendt, H.; Kasche, A.; Ebener von Eschenbach, C.; Risse, U.; Huss-Marp, J.; Ring, J. (2001): Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124, 121-125.

Belitz, H.-D.; Grosch, W. (1992): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani, M. (2004): Polyunsaturated fatty acids: Biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J. Am. Coll. Nutr.* 23/4, 281-302.

Bertaccini, G.; Coruzzi, G. (1988): Regulation of receptors on parietal cells on acid secretion. *Scand. J Gastroenterol. Suppl.* 146, 22-33.

Beveridge, T.H.J.; Girard, B.; Kopp, T.; Drover, J.C.G. (2005): Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1799-1804.

Bielski, B.H.J.; Arudi, R.L.; Sutherland, M.W. (1982): A study on the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258/8, 4759-4761.

Birkenmeyer, C.; Kolasa, A.; Kopka, J. (2003): Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi targeted profiling of the major phytohormones. *J. Chromatography A* 993, 89-102.

Bishop-Bailey, D.; Hla, T. (1999): Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *J. Biol. Chem.* 274/24, 17042-17048.

Bishop-Bailey, D.; Wray, J. (2003): Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Lipid Med.* 71, 1-22.

Blechert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, Z.-Q.; Zenk, M.H. (1995): The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4099-4105.

Bloedon, L.T.; Szapary, P.O. (2004): Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews* 62/1, 18-27.

Bogaards, J.J.; Venekamp, J.C.; van Bladeren, P.J. (1997): Stereoselective conjugation of prostaglandin A₂ and prostaglandin J₂ with glutathione, catalyzed by the human glutathion S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem. Res. Toxicol.* 10/3, 310-317.

Bos, C.-L.; Richel, D.J.; Ritsema, T.; Peppelenbosch, M.P.; Versteeg, H.H. (2004): Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1187-1205.

Boyault, S.; Simonin, M.-A.; Bianchi, A.; Compe, E.; Liagre, B.; Mainard, D.; Bécuwe, P.; Dauca, M.; Netter, P.; Terlain, B.; Bordji, K. (2001): 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, but not troglitazone, modulates IL-1 β effects in human chondrocytes by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation pathways. *FEBS Letters* 501, 24-30.

- Brame, C.J.; Salomon, R.G.; Morrow, J.D.; Roberts, L.J.** (1999): Identification of extremely reactive gamma-ketoaldehydes (isolevuglandins) as product of the isoprostane-pathway and characterization of their lysyl protein adducts. *J. Biol. Chem.* 274, 3139-3145.
- Burke, A.; Lawson, J.A.; Meagher, E.A.; Rockach, J.; FitzGerald, G.A.** (2000): Specific analysis in plasma and urine of 2,3-dinor-5,6-dihydro-isoprostane F_{2α}-III, a metabolite of isoprostane F_{2α}-III and an oxidation product of γ-linolenic acid. *J. Biol. Chem.* 275/4, 2499-2504.
- Bygdeman, M.** (2003): Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Practice Res. Clin. Obst. Gyn.* 17/5, 707-716.
- Cagen, L.M.; Pisano, J.J.** (1979): The glutathione conjugate of prostaglandin A is a better substrate than prostaglandin E for partially purified avian prostaglandin E-9-ketoreduktase. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)* 573/3, 5547-5551.
- Cernuda-Morollón, E.; Pineda-Molina, E.; Canada, F.J.; Pérez- Sala, D.** (2001): 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibition of NF-κB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276/38, 35530-35536.
- Chao, P.-M.; Chao, C.-Y.; Lin, F.-J.; Huang, C.-J.** (2001): Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P₄₅₀4A1 genes in rats and activates PPARα. *J. Nutr.* 231, 3166-3174.
- Chen, Y.; Morrow, J.D.; Roberts 2nd, J.L.** (1999): Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *Jour. Biol. Chem.* 274/16, 10863-10868.
- Cheng, F.-C.; Jen, J.-F.; Tsai, T.-H.** (2002): Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J. Chromatogr. B* 781, 481-496.
- Cheong, Y.H.; Chang, H.-S.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T.; Luan, S.** (2002): Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 129, 661-667.
- Chiabrando, C.; Rivalta, C.; Bagnati, R.; Valagussa, A.; Durand, T.; Guy, A.; Villa, P.; Rossi, J.-C.; Fanelli, R.** (2002): Identification of metabolites from type III F₂-isoprostane diastereomers by mass spectrometry. *Jour. Lip. Res.* 43, 495-509.
- Christie, W.W.** (1982): Lipid Analysis. 2nd Edition, Pergamon Press.
- Clarke, D.L.; Belvisi, M.G.; Hardacker, E.; Newton, R.; Giembycz, M.A.** (2005): E-ring 8-isoprostanes are agonists at the EP₂- and EP₄-prostanoid receptors on human airway smooth muscle cells and regulate the release of colony-stimulating factors by activating cAMP-dependant protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 67/2, 383-393.
- Clay, C.E.; Namen, A.M.; Atsumi, G.; Willingham, M.C.; High, K.P.; Kute, T.E.; Trimboli, A.J.; Fonteh, A.N.; Dawson, P.A.; Chilton, F.H.** (1999): Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20/10, 1905-1911.
- Conconi, A.; Miquel, M.; Browse, J.A.; Ryan, C.A.** (1996): Intracellular levels of free linolenic acid increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111, 797-803.
- Cracowski, J.-L.; Durand, Th.; Bessard, G.** (2002): Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharm. Sci.* 23/8, 360-366.
- Cracowski, J.-L.** (2004): Isoprostanes: an emerging role in vascular pharmacology and disease? *Trends Chem. Phys. Lipids* 128, 75-83.
- Curry, S.; Brick, P.; Franks, N.P.** (1999): Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 131-140.

- Cuzzocrea, S.; Di Poala, R.; Mazzon, E.; Genovese, T.; Muià, C.; Centorrino, T.; Caputi, A.P.** (2004): Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator activated receptors alpha (PPAR- α) in the development of inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* 84, 1643-1654.
- Daray, F.M.; Minivielle, A.I.; Puppo, S.; Rothlin, R.** (2004): Vasoconstrictor effects of 8-iso-Prostaglandin E₂ und 8-iso-prostaglandin F_{2 α} on human umbilical vein. *Eur. J. Pharm.* 499, 189-195.
- Davì, G.; Falco, F.; Patrono, C.** (2004): Determinants of F₂-isoprostane biosynthesis and inhibition in man. *Chem. Phys. Lipids* 128, 149-163.
- Decker, E.A.; Warner, K.; Richards, M.P.; Shahidi, F.** (2005): Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4303-4310.
- Desikan, R.; Mackerness, S.A.-H.; Hancock, J.T.; Neill, S.J.** (2001): Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127, 159-172.
- Doares, S.H.; Syrovets, T.; Weiler, E.W.; Ryan, C.A.** (1995): Oligogalacturonides and chitosan activate plant defense genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4095-4098.
- Dorn, G.W.; Davis, M.G.; D'Angelo, D.** (1997): Structural determinants for agonist binding affinity to thromboxane/prostaglandin endoperoxide (TP) receptors. *J. Biol. Chem.* 272/19, 12399-12405.
- Duffield, P.H.; Netting, A.G.** (2001): Methods for the quantification of abscisic acid and its precursors from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 289, 251-259.
- Durand, T.; Guy, A.; Henry, O.; Roland, A.; Bernad, S.; El Fangour, S.; Vidal, J.-P.; Rossi, J.-C.** (2004): The total synthesis of iso-, neuro-, phytoprostanes: new insight in lipid chemistry. *Chem. Phys. Lipids* 128, 15-33.
- Dussault, I.; Forman, B.M.** (2000): Prostaglandins and fatty acids regulate transcriptional signaling via the peroxisome proliferator activated receptor nuclear receptors. *Prostaglandins Lipid Med.* 62, 1-13.
- Dwivedi, C.; Natarajan, K.; Matthees, D.P.** (2005): Chemopreventive effects of dietary flaxseed oil on colon tumor cancer development. *Nutr. Cancer* 51/1, 52-58.
- Dworski, R.; Murray, J.J.; Roberts 2nd, L.J.; Oates, J.A.; Morrow, J.D.; Fisher, L.; Sheller, J.R.** (1999): Allergen-induced synthesis of F₂-isoprostanes in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1947-1951.
- Egan, K.M.; Wang, M.; Lucitt, M.B.; Zukas, a.M.; Puré, E.; Lawson, J.A.; FitzGerald, G.A.** (2005): Cyclooxygenases, thromboxane and arteriosclerosis. *Circulation.* 111, 334-342.
- Egg, D.; Herold, M.; Rumpl, E.; Günther, R.** (1980): Prostaglandin F_{2 α} levels in human cerebrospinal fluid in normal and pathological conditions. *J. Neur.* 222/4, 1432-1459.
- Emi, M.; Maeyama, K.** (2004): the biphasic effects of cyclopentenone prostaglandins, prostaglandin J₂ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ on proliferation and apoptosis in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1259-1267.
- Erl, W.; Weber, C.; Zerneck, A.; Neuzil, J.; Vosseler, C.A.; Kim, H.J.; Weber, P.C.** (2004): Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Eur. J. Immunol.* 34, 241-250.
- Evans, R.M.** (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Evers, R.; Cnubben, N.H.P.; Wijnholds, J.; v. Deemter, L.; van Bladeren, P.J.; Borst, P.** (1997): Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Letters* 419, 112-116.

- Fam, S.S.; Murphey, L.J.; Terry, E.S.; Zackert, W.E.; Chen, Y.; Gao, L.; Pandalai, S.; Milne, G.L.; Roberts, L.J.; Porter, N.A.; Montine, Th.J.; Morrow, J.D.** (2002): Formation of highly reactive A-ring and J-ring Isoprostane-like compounds (A₄/J₄-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic Acid. *Jour. Biol. Chem.* 277/39, 36076-36084.
- Fangour, S.E.; Guy, A.; Vidal, J.-P.; Rossi, J.-C.; Durand, T.** (2003): Total synthesis of phytoprostane F₁ and its epimer. *Tetrahedron Lett.* 44, 2105-2108.
- Farmer, E.E.; Ryan, C.A.** (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134.
- Farmer, E.E.; Ryan, C.A.** (1992): Octadecanoid derived signals in plants. *TRENDS Cell Biol.* 2, 236-241.
- Feillet-Coudray, C.; Choné, F.; Michel, F.; Rock, E.; Thiéblot, P.; Rayssiguer, Y.; Tauveron, I.; Mazur, A.** (2002): Divergence in plasmatic and urinary isoprostane levels in type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta* 324, 25-30.
- Ferry, G.; Bruneau, V.; Beauverger, P.; Goussard, M.; Rodriguez, M.; Lamamy, V.; Dromaint, S.; Canet, E.; Galizzi, J.-P.; Boutin, J.A.** (2001): Binding of prostaglandins to PPAR γ : tool assessment and new natural ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 417, 77-89.
- Fischer, S.M.** (1997): Prostaglandins and cancer. *Front Biosc.* 2, 482-500.
- Fontana, L.; Giagulli, C.; Cominacini, L.; Pasini, A.F.; Minuz, P.; Lechi, A.; Sala, A.; Laudanna, C.** (2002): β_2 integrin dependent neutrophil adhesion induced by minimally modified low-density lipoproteins is mainly mediated by F₂-isoprostanes. *Circulation* 106, 2434-2441.
- Forman, B.M.; Tontonoz, P.; Chen, J., Brun, R.P.; Spiegelmann, B.M.; Evans, R.M.** (1995): 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83, 803-812.
- Fiehn, O.** (2002): Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155-171.
- Fitzpatrick, F.A.; Wynalda, M.A.** (1983): Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂. *J. Biol. Chem.* 258/19, 11713-11718.
- Fitzpatrick, F.A.; Ligget, W.F.; Wynalda, M.A.** (1983): Albumin-eicosanoid-interactions. *J. Biol. Chem.* 259/5, 2722-2727.
- Frankel, E.N.** (1996): Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry* 57/1, 51-55.
- Frankel, E. N.** (1998): Lipid oxidation. *The Oily Press Ltd.*, Dundee.
- Fukunaga, M.; Takahashi, K.; Badr, K.F.** (1993a): Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-Isoprostaglandin E₂, an E₂-Isoprostane. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 195/2, 507-515.
- Fukunaga, M.; Makita, N.; Roberts 2nd, L.J.; Morrow, J.D.; Takahashi, K.; Badr, K.F.** (1993b): Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 264/6Pt1, 1619-1624.
- Fukusaki, E.; Kobayashi, A.** (2005): Plant Metabolomics: potential for practical operation. *J Bioscience and Bioengineering* 100/4, 347-354.
- Fukushima, M.** (1992): Biological activities and mechanisms of action of PGJ₂ and related compounds: an update. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 47, 1-12.
- Gao, L.; Zackert, W.E.; Hasford, J.J.; Danekis, M.E.; Milne, G.L.; Remmer, C.; Reese, J.; Yin, H.; Tai, H.-H.; Dey, S.K., Porter, N.A.; Morrow, J.D.** (2003): Formation of prostaglandins E₂ and D₂ via the isoprostane pathway. *J. Biol. Chem.* 278/31, 28479-28489.

- Gibson, S.I.** (2004): Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* 55/395, 253-264.
- Gopaul, N.K.; Nourooz-Zadeh, J.; Mallet, A.I.; Änggard, E.E.** (1994a): Formation of PGF₂-Isoprostanes during the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200/1, 338-343.
- Gopaul, N.K.; Nourooz-Zadeh, J.; Mallet, A.I.; Änggard, E.E.** (1994b): Formation of F₂-isoprostanes during aortic endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Letters* 348, 297-300.
- Gopaul, N.K.; Zacharowski, K.; Halliwell, B.; Änggard, E.E.** (2000): Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F₂-isoprostane levels. *Free Rad. Biol. Med.* 28/5, 806-814.
- Gopaul, N.K.; Halliwell, B.; Änggard, E.E.** (2000): Measurement of plasma F₂-isoprostanes as an index of lipid peroxidation does not appear to be confounded by diet. *Free Rad. Res.* 33, 115-127.
- Goleb, M.; Zia, P.; Matsuno, M.; Horton, R.** (1975): Metabolism of prostaglandins A₁ and E₁ in man. *J. Clin. Inv.* Vol.56, 1404-1410.
- Goulet, J.; Lamarche, B.; Nadeau, G.; Lemieux, S.** (2003): Effect of a nutritional intervention promoting the Mediterranean food pattern on plasma lipids, lipoproteins and body weight in healthy French-Canadian women. *Atherosclerosis* 170, 115-124.
- Gray, W.M.** (2004): Hormonal regulation of plant growth and development. *PLOS Biology* 2/9, 1270-1273.
- Green, K.; Steffenrud, S.** (1976): Method for quantitative analysis of PGA₂ from plasma using deuterated carrier and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 76/2, 606-614.
- Grose, R.; Werner, S.** (2002): An APPARently protective mechanism for keratinocytes in wounded skin. *TRENDS Mol. Med.* 8/4, 149-181.
- Habib, A.; Badr, K.F.** (2004): Molecular pharmacology of isoprostanes in vascular smooth muscle. *Chem. Phys. Lipids* 128, 69-73.
- Hall, R.D.** (2006): Plant metabolomics: from holistic hope to hype, to hot topic. *New Phytologist* 169, 453-468.
- Hamberg, M.; Samuelsson, B.** (1971): On the metabolism of prostaglandins E₁ and E₂ in man. *J. Biol. Chem.* 246/22, 6713-1971.
- Hanasaki, K.; Arita, H.** (1989): A common binding site for primary prostanoids in vascular smooth muscles: a definitive discrimination of the binding for thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor agonist from its antagonist. *Biochim. Biophys. Acta* 1013/1, 28-35.
- Hansen, H.; Grossmann, K.** (2000): Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Phys.* 124, 1437-1448.
- Hansen, W.R.; Keelan, J.A.; Skinner, S.J.M.; Mitchell, M.D.** (1999): Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues: A review. *Prostaglandins Lipid Med.* 57, 243-257.
- Harrison, K.A.; Murphy, R.C.** (1995): Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. *Jour. Biol. Chem.* 270/29, 17237-17287.
- Hashinuma, T.; Nakamura, H.; Itoh, K.; Ohyama, Y.; Ishibashi, M.; Mizugaki, M.** (1995): Microdetermination of the prostaglandin B₁ in human plasma by gas chromatography / selected ion monitoring using [¹⁸O]prostaglandin B₁ as an Internal Standard. *Prostaglandins* 49, 239-246.
- Hata, A.N.; Breyer, R.M.** (2004): Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharm. Ther.* 103, 147-166.

Helli, P.B.; Catalli, A.; Janssen L.J. (2004): The bronchodilators 8-iso-prostaglandin E₂ and prostaglandin E₂ induce K⁺ current suppression via thromboxane A₂ receptors in porcine tracheal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 501, 179-184.

Helmersson, J.; Basu, S. (1999): F₂-Isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins, Leukotrienes Ess. Fatty Acids* 61/3, 203-205.

Helmersson, J.; Basu, S. (2001): F₂-Isoprostane and prostaglandin F_{2α} metabolite excretion rate and day to day variation in healthy humans. *Prostaglandins, Leukotrienes Ess. Fatty Acids* 65/2, 99-102.

Helmersson, J.; Larson, A.; Vessby, B.; Basu, S. (2005): Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F_{2α}, interleukin-6 and F₂-isoprostane formation in elderly men. *Arteriosclerosis* 181, 201-207.

Herold, D.A.; Smith, B.J.; Ross, R.M.; Redpath, G.; Arlinghaus, A.; Wills, M.R.; Savory, J. (1987): Measurement of prostaglandin F₂ alpha using capillary gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Annal. Clin. Lab. Sci.* 17/5, 300-305.

Hinz, B.; Brune, K.; Pahl, A. (2003): 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-γ-independent mechanism. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 302, 415-420.

Hoffmann, S.W.; Moore, S.; Ellis, E.F. (1997): Isoprostanes: Free radical generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* 28, 844-849.

Hou, X.; Roberts 2nd, L.J.; Taber, D.F.; Morrow, J.D.; Kanai, K.; Gobeil, F., Jr.; Beauchamp, M.H.; Bernier, S.G.; Lepage, G.; Varma, D.R.; Chemtob, S. (2001): 2,3-Dinor-5,6-Dihydro-15-F_{2t}-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281, R391-R400.

Hou, X.; Roberts 2nd, L.J.; Gobeil, F., Jr.; Taber, D.F.; Kanai, K.; Abran, D.; Brault, S.; Checchin, D.; Sennlaub, F.; Lachapelle, P.; Varma, D.R.; Chemtob, S. (2001): Isomer-specific contractile effects of a series of F₂-isoprostanes on retinal and cerebral microvasculature. *Free Radical Biol. Med.* 36/2, 163-172.

Huang, H.-Y.; Appel, L.J.; Croft, K.D.; Miller 3rd, E.R.; Mori, T.A.; Puddey, I.B. (2001): effects of vitamin C and E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J. Clin. Nutr.* 76, 549-555.

Huber, J.; Bochkov, V.N.; Binder, B.R.; Leitinger, N. (2003): The isoprostane 8-iso-PGE₂ stimulates endothelial cells to bind monocytes via cyclic AMP-and p38 MAP kinase dependent signaling pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 5/2, 163-169.

Ikai, K.; Ujihara, M.; Kashihara, M.; Fukushima, M. (1987): Inhibition of the proliferation of transformed epidermal cells in culture by various prostaglandins. *J. Invest. Dermatol.* 89/1, 69-72.

Imbusch, R.; Mueller, M.J. (2000a): Formation of isoprostane F₂-like compounds (phytoprostanes F₁) from α-linolenic acid in plants. *Free Rad. Biol. Med.* 28/5, 720-726.

Imbusch, R.; Mueller, M.J. (2000b): Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinorisoprostane F₁ (phytoprostanes F₁) in plants. *Plant Physiology*, 124, 1293-1303.

Iqbal, M.; Evans, P.; Lledó, A.; Verdaguer, X.; Pericàs, M.A.; Riera, A.; Loeffler, C.; Sinha, A.K.; Mueller, M.J. (2005): Total synthesis and biological activity of 13,14-dehydro-12-oxo-phytodienoc acids (deoxy-J₁-phytoprostanes). *ChemBioChem* 6, 276-280.

Iuliano, L.; Colavita, A.R.; Leo, R.; Praticò, D.; Violi, F. (1997): Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radical Biol. Med.* 22/6, 999-1006.

Israelian-Konarakis, Z.; Reaven, P.D. (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Cardiology* 103, 1-9.

- Issemann, I.; Green, S.** (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.
- Janssen, L.J.** (2001): Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L1067-L1082.
- Janssen, L.J.; Tazzeo, T.** (2002): Involvement of the TP and EP₃ receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301/3, 1060-1065.
- Janssen, L.J.; Premji, M.; Netherton, S.; Catalli, A.; Cox, G.; Keshavjee, S.; Crankshaw, D.** (2004): Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. *J. Pharm. Exp. Ther.* 281, R391-R400.
- Jourdan, K.B.; Evans, T.W.; Goldstraw, P.; Mitchell, J.A.** (1999): Isoprostane and PGE₂ production in human isolated pulmonary artery smooth muscle cells: concomitant and differential release. *FASEB J.* 13, 1025-1029.
- Kalinski, P.; Viera, P.L.; Schuitemaker, J.H.N.; de Jong, E.C.; Kapsenberg, M.L.** (2001): Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97, 3466-3469.
- Kanner, J.; Lapidot, T.** (2001): The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Rad. Boil. Med.* 31/11, 1388-1395.
- Keaney, J.F.; Larson, M.G.; Vasan, R.S.; Wilson, P.W.F.; Lipinska, I.; Corey, D.; Massaro, J.M.; Sutherland, P.; Vita, J.A.; Benjamin, E.J.** (2003): Obesity and systemic oxidative stress. Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 434-439.
- Keelan, J.A.; Sato, T.A.; Marvin, K.W.; Lander, J.; Gilmour, R.S.; Mitchell, M.D.** (1999): 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, a ligand for peroxisome proliferator activated receptor- γ , induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262, 579-585.
- Kinsella, B.T.; O'Mahony, D.J.; FitzGerald, G.A.** (1997): The human thromboxane A₂ receptor α isoform (TP α) functionally couples to the G Proteins G_q and G₁₁ in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi-prostaglandin F_{2 α} . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281/2, 957-964.
- Kliwer, S.A.; Umesono, K.; Noonan, D.J.; Heyman, R.A.; Evans, R.M.** (1992): Convergence of cis-retinoic acid and peroxisome-proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Kobayashi, T.; Narumiya, S.** (2002): Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Lipid Med.* 68/69, 557-573.
- Kondo, M.; Shibata, T.; Kumagai, T.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Sasaki, S.; Iwata, M.; Noguchi, N.; Uchida, K.** (2002): 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *PNAS* 99/11, 7367-7372.
- Kunapuli, P.; Lawson, J.A.; Rockach, J.; FitzGerald, G.A.** (1997): Functional characterization of the ocular prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) receptor. *J. Biol. Chem.* 272/43, 27147-27154.
- Kunapuli, P.; Lawson, J.A.; Rockach, J.; Meinkoth, J.L.; FitzGerald, G.A.** (1998): Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) and the isoprostane 8,12-iso-isoprostane F_{2 α} -III induce cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 273/35, 22442-22452.
- Krischke, M.; Loeffler, C.; Mueller, M.J.** (2003): Biosynthesis of 14,15-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones in via the phytoprostane D₁ pathway. *Phytochemistry* 62/3, 351-358.

Lamb, C.; Dixon, R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48, 251-275.

Lahaie, I.; Hardy, P.; Hou, X.; Hasséssian, H.; Asselin, P.; Lachapelle, P.; Almazan, G.; Varma, D.R.; Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L.J.; Chemtob, S. (1998): A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F_{2α} on retinal vessels. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp.* 274, R1406-R1416.

Léon, P.; Sheen, J. (2003): Sugar and hormone connections. *TRENDS Plant Sci.* 8/3, 110-116.

Levonen, A.-L.; Landar, A.; Ramachandran, A.; Caeser, E.K.; Dickinson, D.A., Zanoni, G.; Morrow, J.D.; Darley-Usmar, V.M. (2004): Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378, 373-382.

Lin, B.-F.; Lai, C.-C.; Lin, K.-W.; Chiang, B.-L. (2000): Dietary oxidized oil influences the levels of type 2 T-helper cell-related antibody and inflammatory mediators in mice. *Brit. J. Nutrition* 84, 911-917.

Loeffler, C.; Berger, S.; Guy, A.; Durand, T.; Bringmann, G.; Dreyer, M.; von Rad, U.; Durner, J.; Mueller, M.J. (2005): B1-Phytosteranes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiology* 137, 328-340.

De Lorgeril, M.; Renaud, S.; Salen, P.; Monjaud, I.; Mamelle, N.; Martin, J.L.; Guidollet, J.; Touboul, P.; Delaye, J. (1994): Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343/8911, 1454-1459.

De Lorgeril, M.; Salen, P.; Martin, J.-L.; Mamelle, N.; Monjaud, I.; Touboul, P.; Delaye, J. (1996): Effect of a mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. *JACC* 28/5, 1103-1108.

Lukaszewicz, M.; Szopa, J.; Krasowska, A. (2004): Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. *Food Chem.* 88, 225-231.

Lynch, S.M.; Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L.J.; Frei, B. (1994): Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-Isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *J. Clin. Invest.* 93, 998-1004.

Magee, W.E.; Armour, S.B.; Miller, O.V. (1972): Absorption of prostaglandins by the intestine and vagina of the rat. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 306/2, 270-282

Marks, F. (2000): Der Stoffwechsel der Arachidonsäure. *Biologie i. u. Zeit* 6, 342-353.

Marlière, S.; Cracowski, J.-L.; Durand, Th.; Chavanon, O.; Bessard, J.; Guy, A.; Stanke-Labesque, F.; Rossi, J.-C., Bessard, G. (2002): The 5-series of F₂-isoprostanes possess no vasomotor effects in the rat thoracic aorta, the human internal mammary area and the human saphenous vein. *Brit. J. Pharm.* 135, 1276-1280.

Marquez, C.D.; Weintraub, S.T.; Smith, P.C. (1994): Femtomole detection of amino acids and dipeptides by gas chromatography-negative-ion-chemical ionization mass spectrometry following alkylation with pentafluorobenzylbromide. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 658/2, 213-221.

Márquez-Ruiz, G.; Dobarganes, M.C. (1995): Assessments of the digestibility of oxidized compounds from [1-¹⁴C]linoleic acid using a combination of chromatographic techniques. *J. Chrom. B* 675, 1-8.

Martinez-Force, E.; Ruiz-Lopez, N.; Garcés, R. (2004): The determination of asymmetrical stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols. *Anal. Biochem.* 334, 175-182.

Marx, N.; Duez, H.; Fruchart, J.-C.; Staels, B. (2004): Peroxisome proliferator-activated receptors and arterogenesis. *Circ. Res.* 94, 1168-1178.

- Meagher, E.A.; Barry, O.P.; Burke, A.; Lucey, M.R.; Lawson, J.A.; Rockach, J.; FitzGerald, G.A.** (1999): Alcohol-induced generation of lipid-peroxidation products in humans. *Jour. Clin. Invest.* 104/6, 805-813.
- Meagher, E.A.; Barry, O.P.; Lawson, J.A.; Rockach, J.; FitzGerald, G.A.** (2001): Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA* 285, 1178-1182.
- Meuwly, P.; Métraux, J.-P.** (1993): Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214, 500-505.
- Milne, G.L.; Gao, L.; Porta, A.; Zanoni, G.; Vidari, G.; Morrow, J.D.** (2005): Identification of the major urinary metabolite of the highly reactive cyclopentenone isoprostane 15-A(2t)-isoprostane in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 25178-25184.
- Mitragotri, S.** (2003): Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Contr. Rel.* 86, 69-92.
- Miwa, M.; Saura, R.; Hirata, S.; Hayashi, Y.; Itoh, H.** (2000): Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E₂ through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 17-24.
- Mohler, E.R.; Franklin, M.T.; Adam, L.P.** (1996): Intracellular signalling by 8-epi-Prostaglandin F₂ α is mediated by thromboxane A₂/Prostaglandin Endoperoxide receptors in porcine carotid arteries. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 225, 915-923.
- Monneret, G.; Li, H.; Vasilescu, J.; Rockach, J.; Powell, W.S.** (2002): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandins D₂ and J₂ are potent activators of human eosinophils. *J. Immunol.* 168, 3563-3569.
- Montuschi, P.; Barnes, P.J.; Roberts 2nd, L.J.** (2004): Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1791-1800.
- Moore, K.P.; Darley-Usmar, V.; Morrow, J.; Roberts 2nd, L.J.** (1995): formation of F₂-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circulation Res.* 77, 335-341.
- Morrow, J.D.; Hill, K.E.; Burk, R.F.; Nammour, T.M.; Badr, K.F.; Roberts 2nd, L.J.** (1990): A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free-radical catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9383-9387.
- Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L.J.** (1992): The F₂-Isoprostane, 8-epi-prostaglandin F₂ α , a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 44/2, 144-163.
- Morrow, J.D.; Awad, J.A.; Boss, H.J.; Blair, I.A.; Roberts 2nd, L.J.** (1992): Non-cyclooxygenase-derived prostanoids are formed (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10721-10725.
- Morrow, J.D.; Minton, T.A.; Mukundan, C.R.; Campbell, M.D.; Zackert, W.E.; Daniel, V.C.; Badr, K.F.; Blair, I.A.; Roberts 2nd, L.J.** (1994): Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. *Jour. Biol. Chem.* 269/6, 4317-4326.
- Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L.J.** (1996): The isoprostanes. Current knowledge and directions for the future. *Biochim. Pharmacol.* 51, 1-9.
- Morrow, J.D.; Awad, J.A.; Wu, A.; Zacker, W.E.; Daniel, V.C.; Roberts, L.J.** (1996b): Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 23185-23190.
- Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L.J.** (1997): The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid Res.* 36/1, 1-27.

Morrow, J.D.; Roberts, L.J.; Daniel, V.C.; Awad, J.A.; Mirochnitchenko, O.; Swift, L.L.; Burk, R.F. (1998): Comparison of formation of D₂/E₂-Isoprostanes and F₂-isoprostanes in vitro and in vivo – effects of oxygen tension and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, 160-171.

Morrow, J.D.; Minton, T.A.; Roberts 2nd, L.J. (2000): Measurement of F₂-Isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 505-513.

Morrow, J.D. (2005): Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 279-286.

Müller, A.; Düchting, P.; Weiler, E.W. (2002): A multiplex GC-MS / MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 44-56.

Mueller, M.J.; Brodschelm, W. (1994): Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography – negative chemical-ionization – mass spectrometry. *Annal. Biochem.* 218, 425-435.

Mueller, M.J. (1998): Radically novel isoprostanes in animals and plants: the isoprostanes. *Chem. Biol.* 5, R323-333.

Mueller, M.J. (2004): Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 441-448.

Murphy, R.C.; Clay, K.L. (1979): Synthesis and back exchange of 18O-labelled amino acids for use as internal standards with mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 6/7, 309-314.

Murphy, R.C.; Clay, K.L. (1990): Preparation of labeled molecules by exchange with oxygen-18-water. *Methods Enzymol.* 193, 338-348.

McNamara, P.; Lawson, J.A., Rockach, J.; FitzGerald G.A. (1999): F₂ and E₂ isoprostanes are ligands for peroxisome proliferator activated receptors α and γ . *Prostaglandins Lipid Med.* 59, 32-43.

McNamara, P.; Lawson, J.A., Rockach, J.; FitzGerald G.A. (1999): Isoprostane activation of the nuclear hormone receptor PPAR. *Eicosanoids Bioactive Lip. Cancer Infl. Rad. Inj.* 5, 351-355.

Negishi, M.; Koizumi, T.; Ichikawa, A. (1995): Biological actions of Δ^{12} -prostaglandin J₂. *J. Lipid Med. Cell Signalling* 12, 443-448.

Nencioni, A.; Lauber, K.; Grünebach, F.; van Parijs, L.; Denzlinger, C.; Wesselborg, S.; Brossart, P. (2003): Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *J. Immunol.* 171, 5148-5156.

Neuzil, J.; Darlow, B.A.; Inder, T.E.; Sluis, K.B.; Winterbourn, C.C.; Stocker, R. (1995): Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feeding. *J. Pediatr.* 126/5 Pt1, 747-758.

Nieto, N.; Torres, M.I.; Ríos, A.; Gil, A. (2002): Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J. Nutr.* 123, 11-19.

Nourooz-Zadeh, J.; Gopaul, N.K.; Barrow, S.; Mallet, A.I.; Anggard, E.E. (1995): Analysis of F₂-isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas-chromatography-mass spectrometry: development of a solid-phase extraction procedure. *J. Chromatography B* 667, 199-208.

Nourooz-Zadeh, J.; Halliwell, B.; Anggard, E.E. (1997): Evidence for the formation of F₃-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Biochim. Biophys. Research Commun.* 236, 467-472.

Nourooz-Zadeh, J., Cooper, M.B.; Ziegler, D.; Betteridge, D.J. (2005): Urinary 8-epi-PGF_{2 α} and its endogenous β -oxidation products (2,3-dinor and 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-epi-PGF_{2 α}) as biomarkers of total body oxidative stress. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 330, 731-736.

- Oguogho, A.; Kaliman, J.; Sinzinger, H.** (2000): Eicosanoid generation and responsiveness of human lymphatics in hyperlipoproteinemia. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 62/1, 47-52.
- Ohno, K.; Hirata, M.** (1993): Characterization of the transport system of prostaglandin A₂ in L-1210 murine leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 46/4, 661-670.
- Oien, H.G.; Ham, E.A.; Zanetti, M.E.; Ulm, E.H.; Kuehl, F.A. Jr.** (1976): A 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase specific for prostaglandin A in rabbit kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73/4, 1107-1111.
- Oliveira, L.; Stallwood, N.A.; Crankshaw, D.J.** (2000): Effect of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro. *Brit. J. Pharm.* 129, 509-514.
- Ota, T.; Aihara, M.; Narumiya, S.; Araie, M.** (2005): the effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 46/11, 4159-4163.
- Parchmann, S.; Gundlach, H.; Mueller, M.J.** (1997): Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115, 1057-1064.
- Parchmann, S.; Mueller, M.J.** (1998): Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from α -linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.* 273/49, 32650-32655.
- Parker, J.** (1995): Prostaglandin A₂ protein interactions and inhibition of cellular proliferation. *Prostaglandins* 50, 359-375.
- Parker, J.; Ahrens, P.B.; Ankel, H.** (1994): Antiviral effect of cyclopentenone prostaglandins on vesicular stomatitis virus replication. *Antiviral Research* 26, 83-96.
- Penumetcha, M.; Khan, N.; Parthasarathy, S.** (2000): Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk? *J. Lipid Res.* 41, 1473-1480.
- Pickett, W.C.; Murphy, R.C.** (1980): Enzymatic preparation of carboxyl oxygen-18 labeled prostaglandin F₂ α and utility for quantitative mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 111, 115-121.
- Plötz, S.G.; Traidl-Hoffmann, C.; Feussner, I.; Kasche, A.; Feser, A.; Ring, J.; Jakob, T.; Behrendt, H.** (2004): Chemotaxis and activation of human blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 1152-1160.
- Polet, H.; Levine, L.** (1975): Metabolism of prostaglandins E, A, and C in serum. *J. Biol. Chem.* 250/2, 351-357.
- Praticò, D.; Smyth, E.M.; Violi, F.; FitzGerald, G.A.** (1996): Local amplification of platelet function by 8-epi-prostaglandin F₂ α is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 271/25, 14916-14924.
- Praticò, D.; Iuliano, L.; Mauriello, A.; Spagnoli, L.; Lawson, J.A.; Maclouf, J.; Violi, F.; FitzGerald, G.A.** (1997): Localization of distinct F₂-Isoprostanes in human arterosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2028-2034.
- Pryor, W.A.; Stanley, J.P.; Blair, E.** (1975): Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11, 370-379.
- Rallidis, L-S.; Paschos, G.; Liakos, G.K.; Velissaridou, A.H.; Anastasiadis, G.; Zampelas, A.** (2003): Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 167, 237-242.
- Reich, E.E.; Montine, T.J.; Morrow, J.D.** (1999): Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Lipid Med.* 59, 137-141.

- Richelle, M.; Turini, M.E.; Guidox, R.; Tavazzi, I.; Métrairon, S.; Fay, L.B.** (1999): Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Letters* 459, 259-262.
- Rival, Y.; Benéteau, N.; Taillandier, Th.; Pezet, M.; Dupont-Passelaigue, E.; Patoiseau, J.-F.; Junquéro, D.; Colpaert, F.C.; Delhon, A.** (2002): PPAR α and PPAR δ activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of VCAM-1 in Eahy926 endothelial cells. *Eur. J. Pharm.* 435, 143-151.
- Robert, A.; Magee, W.E.; Miller, O.V.; Nezamis, J.E.** (1974): Intestinal absorption of prostaglandin F $_{2\alpha}$, 15(S)-15-methyl prostaglandin F $_{2\alpha}$ and their methyl esters in the dog. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 348/2, 269-278
- Roberts 2nd, L.J., Moore, K.O.; Zackert, W.E.; Oates, J.A.; Morrow, J.D.** (1996): Identification of the major urinary metabolite of the F $_{2}$ -isoprostane 8-iso-prostaglandin F $_{2\alpha}$ in humans. *J. Biol. Chem.* 271/34, 20617-20620.
- Roberts 2nd, L.J.; Montine, T.J.; Markesberry, W.,R.; Tapper, A.R.; Hardy, P.; Chemtob, S.; Dettbarn, W.D.; Morrow, J.D.** (1998): Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Jour. Biol. Chem.* 273/22, 13605-13612.
- Robertson, R.P.** (1975): Differential in vivo pulmonary degradation of prostaglandins E $_1$, B $_1$, and A $_1$. *Am J Physiol* 288, 68-70.
- Rocca, B.; Fitzgerald, G.A.** (2002): Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharm.* 2, 603-630.
- Rockach, J.; Khanapure, S.P.; Hwang, S.-W.; Adiyaman, M.; Lawson, J.A.; FitzGerald, G.A.** (1997): Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 54, 853-873.
- Rodriguez, A.R.; Spur, B.W.** (2003): First total synthesis of the E type I phytprostanes. *Tetrahedron Lett.* 44, 7411-7415.
- Rosell, M.S.; Lloyd-Wright, Z.; Appleby, P.N.; Sanders, T.A.B.; Allen, N.E.; Key, T.J.** (2005): Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in British meat-eating, vegetarian, and vegan man. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 327-334.
- Russell, P.T.; Eberle, A.J.; Cheng, H.C.** (1975): The prostaglandins in clinical medicine. A developing role for the clinical chemist. *Clin. Chem.* 21/6, 653-666.
- Sametz, W.; Hennerbichler, S.; Glaser, S.; Wintersteiger, R.; Juan, H.** (2000): Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ and 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, in some isolated smooth muscle preparations. *Brit. J. Pharmacol.* 130, 1903-1910.
- Santoro, M.G.; Benedetto, A.; Carruba, G.; Garaci, E.; Jaffe, B.M.** (1980): Prostaglandin A compounds as antiviral agents. *Science* 209, 1032-1034.
- Santoro, M.G.; Amici, C.; Elia, G.; Benedetto, A.; Garaci, E.** (1989): Inhibition of virus protein glycosylation as the mechanisms of the antiviral action of prostaglandin A in Sendai virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 70/Pt4, 789-800.
- Sarabi, M.; Vessby, B.; Basu, S.; Millgard, J.; Lind, L.** (1999): Relationships between endothelium-dependent vasodilation, serum vitamin E and plasma-isoprostane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ levels in healthy subjects. *J. Vasc. Res.* 36, 486-491.
- Satue, M.T.; Huang, S.-W.; Frankel, E.N.** (1995): effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached, and deodorized olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72/10, 1131-1137.
- Schaller, F.** (2001): Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* 52/354, 11-23.

- Schenk, P.M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J.P.; Richmond, T.; Somerville, S.C.; Manners, J.M.** (2000): Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *PNAS* 97/21, 11655-11660.
- Scher, J.U.; Pillinger, M.H.** (2005): 15d-PGJ₂: The anti-inflammatory prostaglandin? *Clin. Immunol.* 114, 100-109.
- Schmelz, E.A.; Engelberth, J.; Alborn, H.T.; O'Donnell, P.; Sammons, M.; Toshima, H.; Tumlinson, J.H.** (2003): Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. *Plant J.* 39, 790-808.
- Schmelz, E.A.; Engelberth, J.; Tumlinson, J.H.; Block, A.; Alborn, H.T.** (2004): The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J.* 39, 790-808.
- Schmitt, W.** (2000): Parenterale Ernährung – vom reinen Nährstoff zum metabolic support beim Intensivpatienten. *Ellipse* 16/4, 107-112.
- Schuster, V.L.** (1998): Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 221-241.
- Schuster, V.L.; Itoh, S.; Andrews, S.W.; Burk, R.M.; Chen, J.; Kedzie, K.M.; Gil, D.W.; Woodward, D.F.** (2000): Synthetic modification of prostaglandin F_{2α} indicates different structural determinants for binding to the prostaglandin F receptor versus the prostaglandin transporter. *Mol. Pharmacol.* 58, 1511-1516.
- Schuster, V.L.** (2002): Prostaglandin transport. *Prostaglandins Lipid Med.* 68/69, 633-647.
- Shibata, T.; Kondo, M.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Uchida, K.** (2002): 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂. *J. Biol. Chem.* 277/12, 10459-10466.
- Showler, A.T.** (2002): Effects of water deficit stress, shade, weed competition, and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulation in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.). *J. Chem. Ecol.* 28/3, 631-651.
- Siems, W.G.; Sommerburg, O.; Mayer, H.; Grune, T.** (1998): Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharmazeut. Ztg.* 19, 11-25.
- Simpson, J.T.; Torok, D.S.; Markey, S.P.** (1995): Pentafluorobenzyl chloroformate derivatization for enhancement of detection of amino acids or alcohols by electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 525-528.
- Sinzinger, H.; Oguogho, A.; Kaliman, J.** (1997): Isoprostane 8-epi-prostaglandin F₂ alpha is a potent contractor of human peripheral lymphatics. *Lymphology* 30/3, 155-159.
- Soccio, M.; Toniato, E.; Evangelista, V.; Carluccio, M.; De Caterina, R.** (2005): Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 305-314.
- Spoel, S.H.; Koorneef, A.; Claessens, C.; Korzelius, J.P.; Van Pelt, J.A.; Mueller, M.J.; Buchala, A.J.; Métraux, J.-P.; Brown, R.; Kazan, K.; Van Loon, L.C.; Dong, X.; Pieterse, C.M.J.** (2003): NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and Jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760-770.
- Staprans, I.; Rapp, J.H.; Pan, X.M.; Kim, K.Y.; Feingold, K.R.** (1994): Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipids in chylomicrons. *Arterioscler. Thromb.* 14/12, 1900-1905.
- Staprans, I.; Rapp, J.H.; Pan, X.M.; Kim, K.Y.; Feingold, K.R.** (1994): Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoproteins in rats. *J. Lipid Res.* 37/2, 420-430.
- Strassner, J.; Schaller, F.; Frick, U.B.; Howe, G.A.; Weiler, E.W.; Amrhein, N.; Macheroux, P.; Schaller, A.** (2002): Characterization and cDNA-microarray expression of analysis of 12-oxophytodienoate reductases

reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant Journal* 32, 585-601.

Stehle, R.G. (1973): Physical chemistry, stability, and a handling of prostaglandins E₂, F_{2α}, D₂ and I₂: A critical summary. *Meth. Enzym.* 86, 436-459.

Stelmach, B.A.; Muller, A.; Henning, P.; Gebhardt, S.; Schubert-Zsilavec, M.; Weiler, E.W. (2001): A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyldiglyceride from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 12832-12838.

Stintzi, A.; Weber, H.; Reymond, P.; Browse, J.; Farmer, E.E. (2001): Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *PNAS* 98/22, 12837-12842.

Stjernschantz, J.W. (2001): From PGF_{2α}-isopropyl ester to latanoprost. A review of the development of xalatan. *IOVS* 42/6, 1134-1136.

Straus, D.S.; Pascual, G.; Li, M.; Welch, J.S.; Ricote, M.; Hsiang, C.-H.; Sengchanthalangsy, L.L.; Ghosh, G.; Glass, C.K. (2000): 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-κB signaling pathway. *PNAS* 97/9, 4844-4849.

Straus, D.S.; Glass, C.K. (2001): Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21/3, 185-210.

Sugimoto, Y.; Narumiya, S.; Ichikawa, A. (2000): Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Progress Lipid Res.* 39, 289-314.

Taber, D.F.; Morrow, J.D.; Roberts 2nd, L. (1997): A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 53, 63-67.

Taki, N.; Sasaki-Sesimoto, Y.; Obayashi, T.; Kikuta, A.; Kobayashi, K.; Ainai, T.; Yagi, K.; Sakurai, H.; Masuda, T.; Takamiya, K.-I.; Shibata, D.; Kobayashi, Y.; Ohta, H. (2005): 12-oxo-phytyldienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 1268-1283.

Tapiero, H.; Nguyen Ba, G.; Couvreur, P.; Tew, K.D. (2002): Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health pathologies. *Biomed Pharmacother.* 56, 215-222.

Thies, F.; Miles, E.A.; Nebe-von-Caron, G.; Powell, J.R.; Hurst, T.L.; Newsholme, E.A.; Calder, P.C. (2001): Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 36/11, 1183-1193.

Thoma, I.; Loeffler, C.; Sinha, A.K.; Gupta, M.; Krischke, M.; Steffan, B.; Roitsch, T.; Mueller, M.J. (2003): Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34, 363-375.

Thoma, I.; Krischke, M.; Loeffler, C.; Mueller, M.J. (2004): The isoprostanoid pathway in plants. *Chem. Phys. Lipids* 128, 135-148.

Traw, M.B.; Kim, J.; Enright, S.; Cipollini, D.F.; Bergelson, J. (2003): Negative cross-talk between salicylate- and Jasmonate-mediated pathways in the Wassilkewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.* 12, 1125-1135.

Turner, J.G.; Ellis, C.; Devoto, A. (2002): The Jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, Supplement 2002, S153-S164.

- Traidl-Hoffmann, C.; Kasche, A.; Jakob, T.; Huger, M.; Plötz, S.; Feussner, I.; Ring, J.; Behrendt, H.** (2002): Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 831-838.
- Traidl-Hoffmann, C.; Mariani, V.; Hochrein, H.; Karg, K.; Wagner, H.; Ring, J.; Mueller, M.J.; Jakob, T.; Behrendt, H.** (2005): Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper cell 2 polarization. *JEM* 201, 627-635.
- Tsai, W.-C.; Li, Y.-H.; Lin, C.-C.; Chao, T.-H.; Chen, J.-H.** (2004): Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clin. Sci.* 106, 315-319.
- Tsikas, D.; Fauler, J.; Frolich, J.C.** (1992): Enzymic preparation of dioxygen-18 labeled leukotriene E4 and its use in quantitative gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 574/2, 181-187.
- Ungrin, M.D.; Carrière, M.-C.; Denis, D.; Lamontagne, S.; Sawyer, N.; Stocco, R.; Tremblay, N.; Metters, K.M.; Abramovitz, M.** (2001): Key structural features of prostaglandin E₂ and prostanoid analogs involved in binding and activation of the human EP₁ prostanoid receptor. *Mol. Pharmacol.* 59, 1446-1456.
- Unmack, M.A.; Ranagachari, P.K.; Skadhauge, E.** (2001): Effects of isoprostanes and prostanoids on porcine small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296/2, 434-441.
- Ushikubi, F.; Hirata, M.; Narumiya, S.** (1995): Molecular biology of prostanoid receptors: An overview. *J. Lipid Mediators Cell Signaling* 12, 343-359.
- Vergès, B.** (2004): Clinical Interest of PPARs ligands. *Diabetes Metab.* 30, 7-12.
- Waddington, E.I.; Croft, K.D.; Sienuarine, K.; Latham, B.; Puddey, I.B.** (2003): Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. *Artherosclerosis* 167, 111-120.
- Wallace, F.A.; Miles, E.A.; Evans, C.; Stock, T.E.; Yaqoob, P.; Calder, P.C.** (2000): Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *J. Leukocyte Biol.* 69, 449-457.
- Wang, J.; Huang, Z.H.; Gage, D.A.; Watson, J.T.** (1994): Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas-chromatography-mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction.
- Wanten, G.J.A.; Roos, D.; Naber, A.H.J.** (2000): Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin. Nutr.* 19/5, 327-331.
- Wanten, G.; Beunk, J.; Naber, A.; Swinkels, D.** (2002): Tocopherol isoforms in parenteral lipid emulsions and neutrophil activation. *Clin. Nutr.* 21/5, 417-422.
- Wasternack, C.; Parthier, B.** (1997): Jasmonate-signalled plant gene expression. *TRENDS Plant Sci.* 2/8, 302-307.
- Widlansky, M.E.; Duffy, S.J.; Hamburg, N.M.; Gokce, N.; Warden, B.A.; Wiseman, S.; Keaney Jr., J.F.; Frei, b.; Vita J.A.** (2005): Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 499-506.
- Wilcox, J.K.; Catignani, G.L.; Roberts 2nd, L.J.** (2003): Dietary flavonoids fail to suppress F₂-isoprostane formation in vivo. *Free Rad. Boil. Med.* 34/7, 795-799.
- Willet, W.C.** (2000): Diet and cancer. *The Oncologist* 5, 393-404.
- Wilson, R.; Lyall, K.; Smyth, L.; Fernie, C.E.; Riemersma, R.A.** (2002): Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: Implication for the measurement of "oxidative stress" in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* 32/2, 162-168.

Wiseman, H.; O'Reilly, J.D.; Adlercreutz, H.; Mallet, A.I.; Bowey, E.A.; Rowland, I.R.; Sanders, T.A.B. (2000): Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F₂-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 395-400.

Wiswedel, I.; Hirsch, D.; Kropf, S.; Gruening, M.; Pfister, E.; Schewe, T.; Sies, H. (2004): Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F₂-isoprostane concentration in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 37/3, 411-421.

Wollin, A.; Code, C.F.; Dousa, P. (1976): Interaction of prostaglandins and histamine with enzymes of cyclic AMP Metabolism from guinea gastric mucosa. *J Clin. Invest.* 57, 1548-1553.

Yang, S.-Y.; Gao, Z.-X. (1999): Determination and clinical significance of plasma levels of prostaglandins in patients with acute brain injury. *Surg. Neurol.* 52, 238-245.

Yin, H.; Havrilla, C.M.; Gao, L.; Morrow, J.D.; Porter, N.A. (2003): Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 278/19, 16270-16275.

Yin, H.; Porter, N.A. (2005): New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxidants & Redox Signalling* 7/1&2, 170-184.

Yokomizo, T.; Kato, K.; Hagiya, H.; Izumi, T.; Shimizu, T. (2001): Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT2. *J. Biol. Chem.* 276/15, 12454-12459.

Yura, T.; Fukunaga, M.; Khan, R.; Nassar, G.N.; Badr, K.F. (1999): Free-radical-generated F₂-isoprostanes stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* 56, 471-478.

Zaks, A.; Klibanow A.M. (1985): Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82, 3192-3196.

Zia, P.; Golub, M.; Horton, R. (1975): A radioimmunoassay for prostaglandin A₁ in human peripheral blood. *J. Clin. End. Met.* 41, 245-252.

Zingarelli, B.; Sheehan, M.; Hake, P.W.; O'Connor, M.; Denenberg, A.; Cokk, J.A. (2003): Peroxisome-proliferator activator receptor- γ ligands, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathway. *J. Immunol.* 171, 6827-6837.

Datenbank der FAO (online): <http://faostat.fao.org/faostat/servlet>, Update Februar 2004

Deutsches Lebensmittelrecht: Leitsätze für Speisefette und Speiseöle – LML Speisefette – vom 17. April 1997, GMBL S. 864, zuletzt geändert am 18.01.2001.

Margarine-Institut für gesunde Ernährung e.V., Bonn, (online): <http://www.margarine-institut.de>

Rote Liste 2000, Herausgeber Rote Liste ® Service GmbH, Frankfurt, Main, Editio cantor Verlag, Aulendorf.

VERA-Schriftenreihe, Band XII: Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme in der Bundesrepublik Deutschland. Ergänzungsband zum Ergänzungsbericht 1992.

VII.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Er hat durch seine fachliche Unterstützung und zahlreiche wertvolle Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine ansteckende Begeisterung lieferten mir immer wieder neuen Ansporn.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen für die fruchtbare Zusammenarbeit bedanken. Dabei gilt mein Dank insbesondere Frau Dr. C. Löffler und Herrn Dr. M. Krischke für die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und inspirierenden fachlichen Diskussionen. Frau Dr. S. Berger danke ich für die Überlassung von mikrobiologischen Kulturen sowie für die Einführung und fachliche Betreuung bei der Infektion von Pflanzen mit Pilzen und Bakterien. Ebenso möchte ich Frau B. Dierich und Frau B. Hilbert für die engagierte und kompetente Unterstützung bei zahlreichen theoretischen Fragestellungen und praktischen Aufgaben danken. Nicht zuletzt trug das gute Verhältnis zu allen Kollegen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jean-Luc Cracowski (Universität Grenoble) für die gute Zusammenarbeit in Rahmen der Etude Biophyto 1. Er übernahm die Durchführung der Studie und überließ mir anschließend die Blut- und Urinproben zur Auswertung. Ebenso möchte ich mich bei den weiteren Kooperationspartnern, Frau Dr. Verena Dirsch (TU München) und Frau Dr. Traidl-Hoffmann (Universität Wien) bedanken, welche interessante Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Phytoprostane durchführten.

Den Institutsgärtnern in Würzburg möchte ich für die Anzucht und Pflege des für die Versuche benötigten pflanzlichen Materials danken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Sonderforschungsbereich 567 (Mechanismen der interspezifischen Interaktion zwischen Organismen) in Würzburg.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Extrem wichtig war auch der Beistand und die Ermutigungen meines Freundes Matthias, der mich durch diese anstrengenden drei Jahre hindurch begleitet und immer wieder motiviert hat.

VII.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kathrin Waltraud Karg
Geburtstag: 03.04.1978
Geburtsort: Nürnberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbesuch

09/1984 – 07/1989 Grundschule Höchstadt / Aisch
09/1989 – 06/1997 Gymnasium Höchstadt / Aisch (mathematisch-naturwissenschaftlich)
27.06.1997 Abitur

Hochschulausbildung

Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg:

10/1997 – 03/1998 Fachsemester im Studiengang Chemie (Diplom)
03/1998 – 04/2002 Studiengang Lebensmittelchemie (Staatsexamen)
18.04.2000 Lebensmittelchemische Vorprüfung
30.04.2002 1. Staatsexamen
12/2005 – 05/2006 lebensmittelchemisches Praktikum am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
31.05.2006 2. Staatsexamen

Promotion

Julius-Maximilians-Universität Würzburg:

07/2002 – 09/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie im Arbeitskreis Prof. Dr. Martin J. Müller
Thema der Promotionsarbeit: Analyse biologisch aktiver, oxidierter Lipide in Pflanzen und Menschen

Berufstätigkeit

seit 07/2006 Lebensmittelchemikerin (Sachbearbeiterin) im Fachzentrum chemische Produktprüfung der LGA QualiTest GmbH in Nürnberg

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Kathrin Karg