

**Phytoprostane F₁-
eine neue Klasse Prostaglandin-ähnlicher
Verbindungen in Pflanzen**

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

vorgelegt von
Ruth Imbusch
aus Vechta

Würzburg, 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. M. Riederer

Tag des Promotionskolloquiums:

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 04.11.2001

Ruth Imbusch

Meinen Eltern
und
Klaus

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. Einleitung | 1 |
| I.1 Prostaglandine | 2 |
| I.1.1 Vorkommen und Struktur der Prostaglandine | 2 |
| I.1.2 Biosynthese der Prostaglandine | 4 |
| I.1.3 Übertragung des Prostaglandinsignals | 6 |
| I.1.4 Physiologische Rolle der Prostaglandine | 7 |
| I.2 Isoprostane | 9 |
| I.2.1 Vorkommen der Isoprostane | 9 |
| I.2.2 Biosynthese und Struktur der Isoprostane | 9 |
| I.2.2.1 Synthese der Isoprostane nach dem Endoperoxidmechanismus | 9 |
| I.2.2.2 Synthese der Isoprostane nach dem Dioxetanmechanismus | 11 |
| I.2.2.3 PGH-Synthase induzierte Synthese des $iPF_{2\alpha}$ -III (8-iso-PGF _{2α}) | 12 |
| I.2.2.4 Nomenklatur der Isoprostane | 13 |
| I.2.3 Bedeutung und mögliche Funktion der Isoprostane | 15 |
| I.2.3.1 Entstehung und Metabolisierung freier Radikale im tierischen Organismus | 15 |
| I.2.3.2 Physiologische Bedeutung von Reaktiven Sauerstoffspezies | 16 |
| I.2.3.3 Isoprostane als Marker für Lipidperoxidation | 16 |
| I.2.3.4 Biologische Aktivität der Isoprostane im Säugetier | 17 |
| I.2.3.5 Einfluß der Isoprostane auf Membranen | 18 |
| I.3 Jasmonate | 19 |
| I.3.1 Entdeckung, Vorkommen und Struktur der Jasmonate | 20 |
| I.3.2 Biosynthese der Jasmonate | 21 |
| I.3.3 Regulierung und Kompartimentierung der Jasmonsäurebiosynthese | 23 |
| I.3.4 Funktion der Jasmonate in Pflanzen | 25 |
| I.3.5 Biologische Aktivität der 12-Oxo-Phytodiensäure | 26 |
| I.3.6 Signaltransduktion | 26 |
| I.4 Phytoprostane: Prostaglandin-ähnliche Verbindungen in Pflanzen | 28 |
| I.4.1 Hypothetische Synthesemechanismen der Phytoprostane | 28 |
| I.4.2 Phytoprostane E ₁ in Pflanzen | 30 |
| I.4.3 Ziele der vorliegenden Arbeit | 31 |

| | |
|---|---------------|
| II. Material | 33 |
| II.1. Pflanzenmaterial | 33 |
| II.1.1 Zellsuspensionskulturen | 33 |
| II.1.2 Frische Pflanzenorgane | 33 |
| II.1.3 Teedrogen | 34 |
| II.2. Geräte | 34 |
| II.3. Chemikalien | 36 |
| II.4. Verbrauchsmaterialien | 36 |
| III. Methoden | 37 |
| III.1 Reinigung der Linolensäure | 37 |
| III.2 Derivatisierung freier Fettsäuren und deren Derivate | 37 |
| III.2.1 Herstellung von Diazomethan | 37 |
| III.2.2 Methylierung freier Fettsäurederivate mit Diazomethan | 37 |
| III.2.3 Herstellung von Pentafluorbenzylestern | 38 |
| III.2.4 Herstellung von Trimethylsilylethern | 38 |
| III.2.5 Herstellung von 4'-Bromoacetophenonestern | 38 |
| III.3 Reduktion mit Natriumborhydrid | 38 |
| III.4 Katalytische Hydrierung | 39 |
| III.5 Versuche mit pflanzlichen Zellsuspensionskulturen | 39 |
| III.5.1 Elicitierung von pflanzlichen Zellsuspensionskulturen | 39 |
| III.5.2 PPF ₁ -Zugabe zu pflanzlichen Zellkulturen in Multiwellschalen | 40 |
| III.5.2.1 <i>Eschscholzia californica</i> -Testsystem | 40 |
| III.5.2.2 <i>Crotalaria cobalticola</i> -Testsystem | 41 |
| III.5.2.3 <i>Thalictrum tuberosum</i> -Testsystem | 41 |
| III.6 Chromatographische Methoden | 42 |
| III.6.1 Dünnschichtchromatographie (DC) | 42 |
| III.6.2 Festphasenextraktion (SPE) | 42 |
| III.6.3 Präparative Säulenchromatographie | 43 |
| III.6.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) | 43 |
| III.6.4.1 Trennung von Phytoprostanen F ₁ | 43 |
| III.6.4.2 Trennung der 4'-Bromoacetophenonester von Fettsäurederivaten | 44 |
| III.6.5 Gaschromatographie (GC) | 45 |
| III.7 Radioaktivitätsmessungen | 46 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| III.8 | Spektroskopische Methoden..... | 46 |
| | III.8.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR) | 46 |
| | III.8.2 Massenspektrometrie (MS) | 46 |
| IV. | Ergebnisse | 48 |
| IV.1 | Isoprostane in niederen Pflanzen..... | 48 |
| | IV.1.1 Autoxidation von Arachidonsäure | 48 |
| | IV.1.2 Autoxidation von <i>Marchantia polymorpha</i> -Zellkulturen | 49 |
| IV.2 | Herstellung und analytische Charakterisierung von PPF₁ Typ I und II..... | 51 |
| IV.3 | Herstellung und Isolierung von PPF₁..... | 53 |
| | IV.3.1 Herstellung von PPF ₁ durch Autoxidation von α -Linolensäure | 53 |
| | IV.3.2 Herstellung von [¹⁸ O] ₃ PPF ₁ durch Autoxidation von α -Linolensäure | 55 |
| | IV.3.3 Isolierung reiner PPF ₁ -Regioisomere | 55 |
| IV.4 | Charakterisierung von PPF₁..... | 56 |
| | IV.4.1 Dünnschichtchromatographie | 56 |
| | IV.4.2 UV-Spektren der PPF ₁ -Regioisomere Typ I und II und des iPF _{1α} -III | 57 |
| | IV.4.3 Massenspektrometrie (MS) | 57 |
| | IV.4.3.1 Elektronenstoßionisation (EI) | 58 |
| | IV.4.3.2 Positive Chemische Ionisation (PCI) | 60 |
| | IV.4.3.3 Negative Chemische Ionisation (NICI) | 61 |
| | IV.4.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR) | 62 |
| IV.5 | Quantifizierung der PPF₁..... | 68 |
| | IV.5.1 Quantifizierung reiner PPF ₁ -Regioisomere über RP-HPLC | 68 |
| | IV.5.2 Quantifizierung von PPF ₁ -Isomerengemischen mittels GC-NICI-MS | 69 |
| | IV.5.2.1 Quantifizierung eines [¹⁸ O] ₃ PPF ₁ -Isomerengemisches | 70 |
| | IV.5.2.2 Quantifizierung von [¹⁶ O] ₃ PPF ₁ -Isomerengemischen | 71 |
| IV.6 | Verlauf der Autoxidation von α-Linolensäure..... | 72 |
| | IV.6.1 Verlauf der Autoxidation von α -Linolensäure in Tetrachlorkohlenstoff | 72 |
| | IV.6.2 Autoxidation von 13-Hydroperoxylinolensäure zu PPF ₁ | 73 |
| IV.7 | PPF₁ in fetten Ölen..... | 76 |
| IV.8. | Isolierung und Quantifizierung von PPF₁ aus Pflanzenmaterial..... | 77 |
| | IV.8.1 Bestimmung von PPF ₁ | 77 |
| | IV.8.1.1 Bestimmung frei vorliegender PPF ₁ | 77 |
| | IV.8.1.2 Bestimmung freier und veresterter PPF ₁ | 79 |
| | IV.8.1.3 Aufarbeitungsparameter und Validierung | 80 |
| | IV.8.2 PPF ₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen | 81 |
| | IV.8.3 PPF ₁ in intakten Pflanzen | 82 |
| | IV.8.4 PPF ₁ in getrocknetem Pflanzenmaterial | 83 |

| | |
|--|----------------|
| IV.8.4.1 PPF ₁ in Teedrogen | 83 |
| IV.8.4.2 PPF ₁ in Teezubereitungen | 84 |
| IV.8.5 PPF ₁ in Pollen | 84 |
| IV.9 Induktion der PPF₁-Akkumulation in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen | 88 |
| IV.9.1 Behandlung von <i>Eschscholzia californica</i> -Zellsuspensionskulturen mit <i>tert</i> -Butylhydroperoxid | 89 |
| IV.9.2 Behandlung von <i>Eschscholzia californica</i> -Zellsuspensionskulturen mit Kupfer(II)acetat | 90 |
| IV.9.3 Behandlung von <i>Eschscholzia californica</i> -Zellsuspensionskulturen mit Eisen(II)sulfat | 91 |
| IV.9.4 Behandlung von <i>Eschscholzia californica</i> -Zellsuspensionskulturen mit Paraquat | 92 |
| IV.9.5 Behandlung von <i>Nicotiana tabacum</i> -Zellsuspensionskulturen mit Quecksilber(II)chlorid | 93 |
| IV.10 Induktion der PPF₁-Akkumulation in intakten Pflanzen | 94 |
| IV.10.1 Induktion der PPF ₁ -Akkumulation in frischen Pfefferminzblättern durch Verwundung | 94 |
| IV.10.2 Induktion der PPF ₁ -Akkumulation in Bohnen nach Besprühen mit Paraquat | 95 |
| IV.11 Messung der Sekundärstoffakkumulation in pflanzlichen Zellkulturen nach Zugabe von PPF₁ | 96 |
| IV.11.1 Induktion der Benzophenanthridinalkaloidproduktion in <i>Eschscholzia californica</i> -Zellsuspensionskulturen | 96 |
| IV.11.2 Induktion der Isobavachalkonsynthese in <i>Crotalaria cobalticola</i> -Zellsuspensionskulturen | 99 |
| IV.11.3 Induktion der Isochinolinalkaloidbiosynthese in <i>Thalictrum tuberosum</i> -Zellsuspensionskulturen | 101 |
| V. Diskussion | 104 |
| V.1 Vorkommen von Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen in Pflanzen | 104 |
| V.2 Phytoprostane: Marker von Lipidperoxidation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 106 |
| V.3 Induzierbarkeit und mögliche Signalfunktion der PPF₁ | 112 |
| V.4 Biologische Aktivität im Tier | 118 |
| V.5 Ausblick | 120 |

| | |
|---------------------------------------|------------|
| VI. Zusammenfassung | 121 |
| VI. Summary | 123 |
| VII. Literaturverzeichnis..... | 125 |
| Publikationsliste..... | 137 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| [U- ¹³ C] | uniform ¹³ C-markiert |
| 13-HPOTE | 13(<i>S</i>)-Hydroperoxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-oktadekatriensäure (13-Hydroperoxid der Linolensäure) |
| BHT | Butylhydroxytoluol |
| BSTFA | <i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid |
| C ₁₈ ec | endcapped Oktadecyl |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DIEA | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FG | Feuchtgewicht |
| GC | Gaschromatographie |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPLC | Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography) |
| HR-MS | hochauflösende Massenspektroskopie |
| iP | Isoprostane |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| LOX | Lipoxygenase |
| <i>m/z</i> | Verhältnis Masse zu Ladung |
| MS | Massenspektroskopie |
| NADPH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat |
| NICI | negative chemische Ionisation (engl.: negative ion chemical ionisation) |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance) |
| O ^{2•-} | Superoxidanion |
| OH [•] | Hydroxylradikal |
| PCI | positive chemische Ionisation (engl.: positive chemical ionisation) |
| PFB- | Pentafluorbenzyl- |
| PFB-Br | Pentafluorbenzylbromid (α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol) |
| PG | Prostaglandine |
| PP | Phytprostane |
| PPAR | Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (engl.: peroxisome-proliferator-activated receptors) |
| R _f | relative Laufstrecke zur Front |
| ROO [•] | Peroxid-Radikale |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RP- | reversed phase |

| | |
|---------|--|
| RT | Raumtemperatur |
| SiOH- | Silica- |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| SPE | Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction) |
| t | Zeitpunkt |
| t-BuOOH | <i>tert</i> -Butylhydroperoxid |
| TG | Trockengewicht |
| TMS- | Trimethylsilyl- |
| TPP | Triphenylphosphin |
| UV | ultravioletter Bereich des Lichtes |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| VIS | sichtbarer Bereich des Lichtes |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

I. Einleitung

Fettsäuren sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich von essentieller Bedeutung: sie dienen als Energielieferant, als Energiespeicher und sind am Membranaufbau beteiligt. Als wesentlicher Bestandteil von Biomembranen beeinflussen Fettsäuren die Membranfluidität sowie die Barrierefunktion von Membranen. Zudem sind Membranlipide Ausgangspunkt für die Biosynthese einer Vielzahl verschiedener Signalstoffe. Eine der bedeutendsten Gruppen derartiger Signalstoffe stellen Cyclopentanverbindungen dar. Im folgenden werden bekannte Cyclopentanverbindungen des tierischen und pflanzlichen Organismus vorgestellt. Gegenstand der Arbeit ist eine neue Klasse von Cyclopentanverbindungen in Pflanzen, die Phytoprostane.

Im tierischen Organismus leiten sich Cyclopentanverbindungen, wie z.B. Prostaglandine, von Arachidonsäure (C₂₀:4), der mengenmäßig dominierenden ungesättigten Fettsäure in Phospholipiden ab (Abb. 1). Prostaglandine zählen ebenso wie die Arachidonsäure-abkömmlinge Thromboxan, Prostacyclin und Leukotriene zu den Eikosanoiden und spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie beispielsweise Regulation des Wasserhaushaltes, Initiierung von Entzündungsprozessen, Wundheilung und Reproduktion.

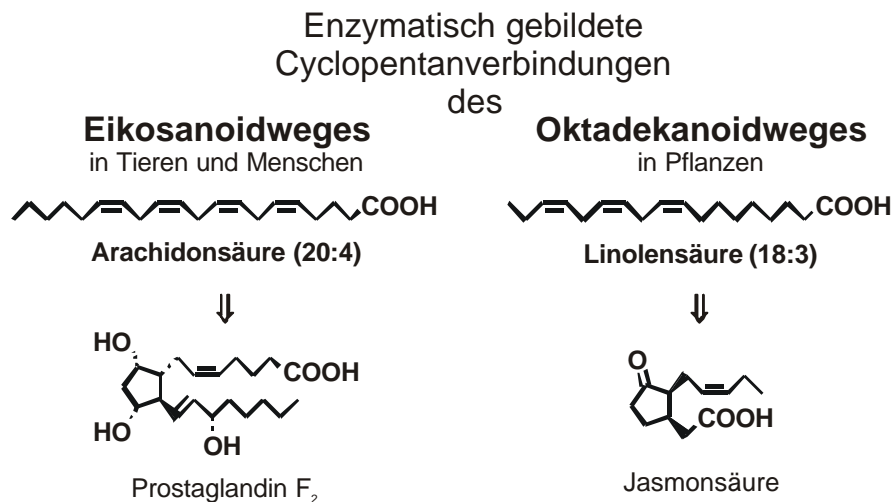


Abb. 1: Aus Fettsäuren abgeleitete Signalstoffe des tierischen und pflanzlichen Organismus.

In höheren Pflanzen kommt Arachidonsäure nicht vor. An deren Stelle tritt Linolensäure (C₁₈:3), die enzymatisch zu Oktadekanoiden umgesetzt werden kann (Abb. 1). Eine wichtige Gruppe dieser Oktadekanoide sind Jasmonate, die wie Prostaglandine im Tier ein Cyclopentanringssystem als Strukturelement besitzen. Jasmonate sind Pflanzenhormone, die zum einen bei Abwehrreaktionen nach Verwundung oder Pathogenbefall und zum anderen bei der Reproduktion essentiell sind (Bergey *et al.*, 1996; Hamberg und Gardner, 1992).

Es war eine große Überraschung als Morrow und Roberts 1990 erstmals nicht-enzymatisch gebildete Cyclopentanverbindungen im menschlichen Plasma entdeckten (Morrow *et al.*, 1990a), von denen später gezeigt werden konnte, daß sie eine biologische Aktivität aufweisen (Fukunaga *et al.*, 1993b; Sinzinger *et al.*, 1997; Takabashi *et al.*, 1992). Da diese Verbindungen Isomere der enzymatisch gebildeten Prostaglandine darstellen, werden sie als Isoprostane bezeichnet. Eine gesteigerte Isoprostanakkumulation kann bei verschiedenen Erkrankungen und Intoxikationen beobachtet werden, bei denen vermehrt freie Radikale auftreten (z.B. Alzheimer, Arthritis, Tetrachlorkohlenstoffintoxikation) (Burk *et al.*, 1995; Gniwotta *et al.*, 1997; Morrow *et al.*, 1992b; Mueller, 1998).

Isoprostane sind Endprodukte der Radikal-katalysierten Oxidation von Arachidonsäure und konnten als zuverlässige Marker für die Schädigung von Geweben durch reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) etabliert werden. Im Gegensatz zu den klassischen Markern, wie Malondialdehyd, sind Isoprostane chemisch stabil. Darüber hinaus können Sie nicht-invasiv bestimmt werden, da Isoprostane und ihre Metabolite über den Harn ausgeschieden werden (Burke *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1996; Roberts und Morrow, 2000; Walter *et al.*, 2000).

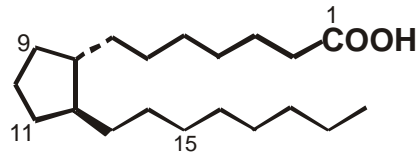
Nachdem es gelungen war einige der Isoprostane synthetisch herzustellen, konnten diese in biologischen Testsystemen eingesetzt werden. Dabei zeigte sich, daß einige dieser Verbindungen bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich potente Vaso- und Bronchokonstriktoren sind (siehe I.2.2.4). Aufgrund dieser Befunde werden Isoprostane heute als Mediatoren der oxidativen Zellverletzung im Tier diskutiert (Morrow und Roberts, 1997).

In Tieren stellen Isoprostane mit einer sogenannten F-Ringstruktur (Abb. 5) die quantitativ bedeutendsten und darüber hinaus die chemisch stabilsten Isoprostane dar, weswegen sie als Marker für „oxidativen Stress“ bevorzugt werden. In höheren Pflanzen können Isoprostane F grundsätzlich nicht gebildet werden, da höheren Pflanzen Arachidonsäure als Vorstufe für die Isoprostansynthese fehlt. Theoretisch können jedoch Isoprostan F-ähnliche Verbindungen durch Oxidation von Linolensäure in Pflanzen entstehen.

I.1 Prostaglandine

I.1.1 Vorkommen und Struktur der Prostaglandine

Prostaglandine wurden erstmals 1934 von van Euler beschrieben. Sie erhielten den Namen Prostaglandine, da man ursprünglich annahm, sie würden in der Prostata gebildet werden. Die Struktur der Prostaglandine leitet sich von Prostansäure ab, einer monocyclischen C20-Fettsäure, die in der Natur nicht existiert (Abb. 2). Prostaglandine kommen in allen tierischen Geweben vor, können jedoch nicht von allen Zelltypen gebildet werden (Michal, 1998).



Prostansäure

Abb. 2: Grundgerüst und Kohlenstoff-Numerierung der Prostansäure.

Abbildung 3 zeigt Arachidonsäure und die von ihr abgeleiteten Prostaglandine (PG). Der Buchstabe, der der Abkürzung PG nachgestellt ist, kennzeichnet die Art der Sauerstoffsubstitution des Cyclopentanrings (z.B. PGF), während der numerische Index die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten angibt. Im Falle von PGF_2 findet sich noch der zusätzliche Index α bzw. β , der die Stellung der Hydroxygruppe an C9 wiedergibt. Bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ stehen beide Hydroxygruppen unterhalb der Ringebene, während bei $\text{PGF}_{2\beta}$ die Hydroxygruppe am C11 unterhalb und am C9 oberhalb der Ringebene steht.

Neben Säugetieren sind auch einige Invertebraten in der Lage Prostaglandine zu synthetisieren, so beispielsweise die Korallen *Plexaura homomalla* und *Gersemia fruticosa* (Varvas *et al.*, 1999). *Gersemia fruticosa* synthetisiert 15S-Prostaglandine, also Prostaglandine mit der Konfiguration der Prostaglandine im Säugetier, während *Plexaura homomalla* 15R-Prostaglandine synthetisiert (Valmsen *et al.*, 2001).

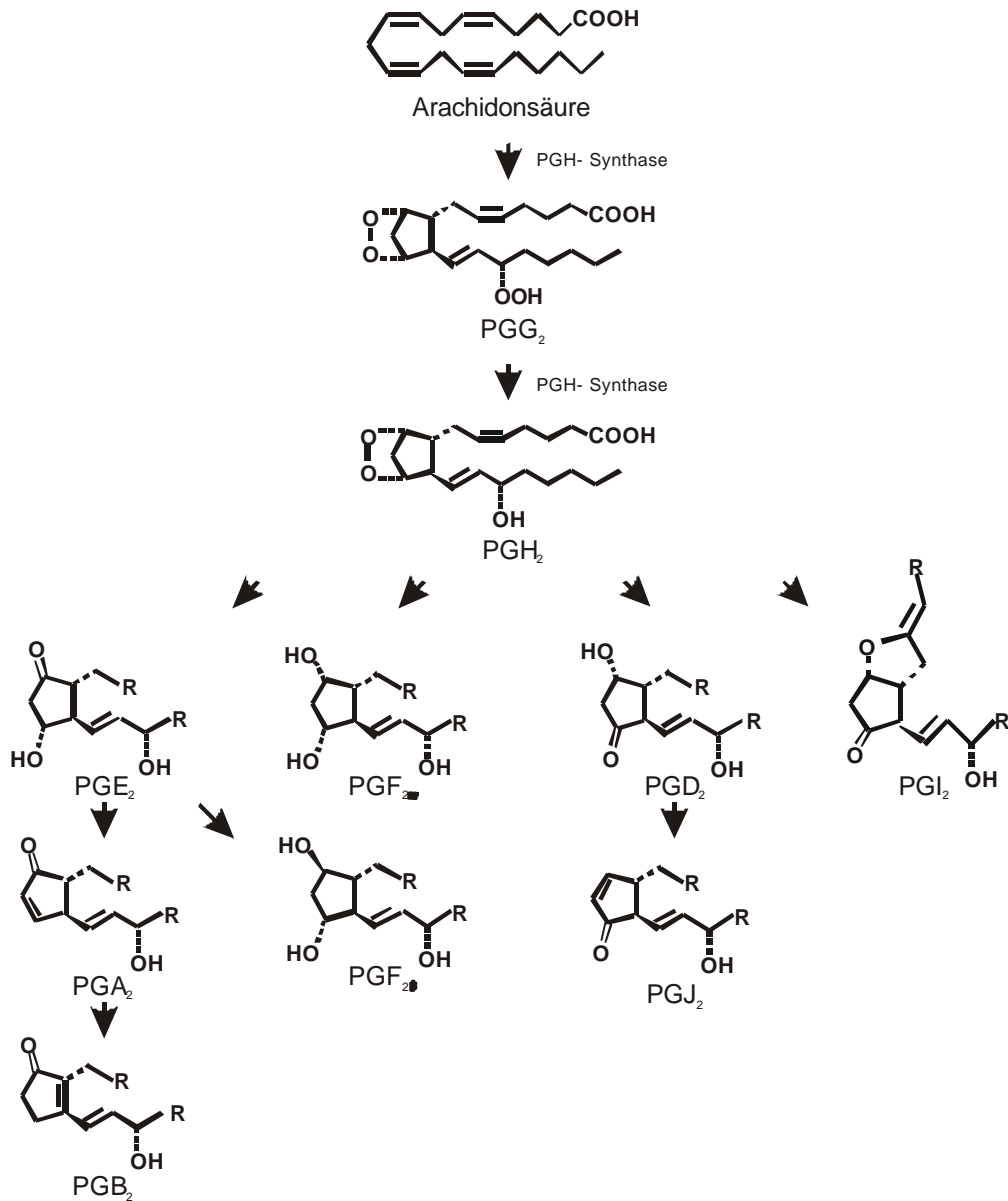


Abb. 3: Ringstrukturen verschiedener Prostaglandinklassen. Prostaglandine G₂, H₂, E₂, F_{2α}, D₂ und I₂ sind enzymatisch gebildete Prostaglandine des tierischen Organismus. PGF_{2β} ist ein Metabolit des PGE₂, der ebenfalls im tierischen Organismus vorkommt. PGA₂, B₂ und J₂ sind nicht enzymatische Abbauprodukte, deren Vorkommen *in vivo* noch nicht eindeutig bewiesen ist.

I.1.2 Biosynthese der Prostaglandine

Die Prostaglandinbiosynthese umfaßt drei Schritte: die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranen, die Konversion von Arachidonsäure zu PGH₂ durch die PGH-Synthase und die anschließende Umsetzung zu den verschiedenen Prostaglandinklassen (PGE₂, PGF₂, PGD₂ oder PGI₂), wobei jede dieser Synthesen durch eine spezifische Synthase katalysiert wird.

Prostaglandine werden nicht gespeichert, sondern nach Zellstimulation *de novo* synthetisiert (Marks und Fürstenberger, 1999). Nach einem hormonellen oder anderen Reiz (z.B. Lipopolysaccharide) wird Arachidonsäure durch eine Phospholipase aus der Zellmembran

herausgelöst. Anschließend wird Arachidonsäure von der PGH-Synthase über PGG_2 zu PGH_2 umgesetzt (Abb. 4). Die PGH-Synthase ist an der Membrannenseite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und stellt ein bifunktionales Enzym dar, welches eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidaseaktivität aufweist (Marks und Fürstenberger, 1999).

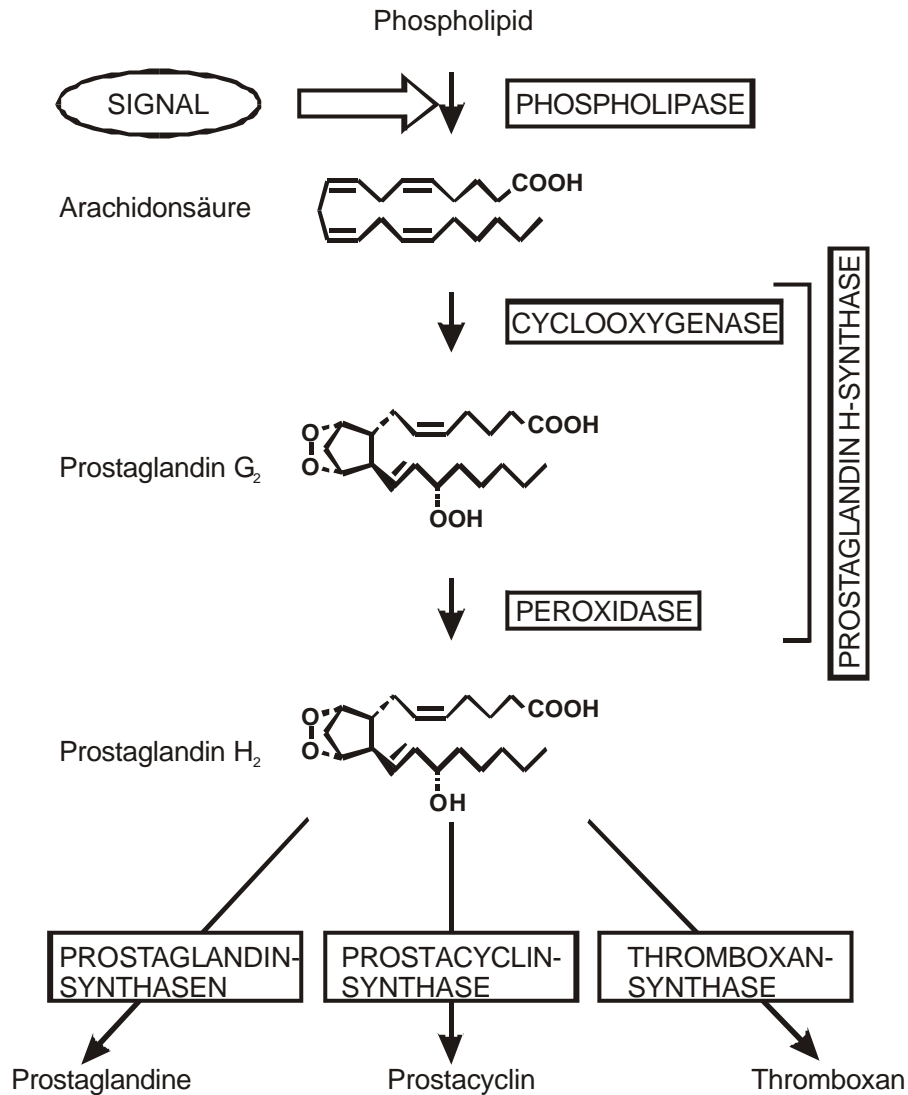


Abb. 4: Entstehung von Eikosanoiden in tierischen Geweben [Abbildung nach (Marks und Fürstenberger, 1999)].

Im ersten Schritt der Biosynthese wird von der Cyclooxygenase das 13-pro-S-Wasserstoffradikal der Arachidonsäure abstrahiert. Danach kommt es zur Anlagerung eines Sauerstoffmoleküls an Position 11 und zum Ringschluß. Anschließend reagiert ein zweites Sauerstoffmolekül mit dem Endoperoxid-Alkylradikal an Position 15 und das vorher abstrahierte Wasserstoffradikal wird wieder hinzugefügt, so daß dann ein Hydroperoxy-Endoperoxid (PGG_2) vorliegt. Das so entstandene PGG_2 wird anschließend durch die Peroxidaseaktivität der PGH-Synthase zum PGH_2 reduziert.

Die PGH-Synthase kommt in zwei Isoformen vor, der sogenannten PGH-Synthase-1, welche auch als COX-1 bezeichnet wird, und der PGH-Synthase-2 bzw. COX-2. Die Isoformen unterscheiden sich darin, daß die PGH-Synthase-1 konstitutiv in tierischen Geweben exprimiert und als eine Art „housekeeping enzyme“ betrachtet wird, während die PGH-Synthase-2 als „immediate early response protein“ eingestuft wird. Die PGH-Synthase-2-codierende-mRNA ist in den meisten nicht stimulierten Zellen kaum detektierbar, während ihre Konzentration wenige Minuten nach Zellstimulation mit einem Mitogen dramatisch ansteigt (Lim *et al.*, 1987).

Beide Enzyme sind durch nicht-steroidale-Antirheumatika, wie z.B. Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin®), in ihrer katalytischen Aktivität hemmbar, was zur Unterdrückung der Prostaglandinbildung führt.

Das über die PGH-Synthase-1 bzw. -2 entstandene PGH₂ kann anschließend, je nach Enzymausstattung der jeweiligen Zelle, zu Prostaglandinen (PGD₂, PGE₂ oder PGF₂), Prostacyclin (PGI₂) oder Thromboxan (in Abbildung 3 nicht dargestellt) umgesetzt werden (Abb. 3 und Abb. 4).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß in den Korallen *Gersemia fructicosa* und *Plexaura homomalla* ebenfalls eine PGH-Synthase vorkommt (Koljak *et al.*, 2000; Valmsen *et al.*, 2001). Diese besitzt eine 80%ige Homologie auf Aminosäureebene verglichen mit der PGH-Synthase aus Säugetieren. Es wird daher vermutet, daß es eine Art „Ur-PGH-Synthase“ gab, von der die heute bekannten PGH-Synthasen aus Säugetieren und Invertebraten abgeleitet sind.

I.1.3 Übertragung des Prostaglandinsignals

Prostaglandine werden nach ihrer Synthese durch Carrier aus dem Zellinneren in den Interzellularraum transportiert (Kanai *et al.*, 1995). Dort binden Prostaglandine an membranständige Rezeptoren von Zielzellen, woraufhin durch intrazelluläre „second messenger“ eine Vielzahl von physiologischen Funktionen geregelt wird (Tab. 1) (Marks und Fürstenberger, 1999).

Prostaglandine sind bereits in nanomolaren Konzentrationsbereichen wirksam. PGE₂ muß in einer Konzentration von mindestens 1-10 nM vorliegen, um wirksam zu werden, während die Konzentration des PGF_{2α} mindestens 125 nM betragen muß. Die Blutplasmaspiegel der meisten Eikosanoide liegen jedoch nicht höher als 1 nM und somit weit unterhalb ihrer Wirkkonzentration (Marks und Fürstenberger, 1999). Diese können erst nach Zellstimulation (z.B. durch Cytokine) lokal erreicht werden. Prostaglandine erzielen systemisch keinen Effekt, da sie vom Interzellularraum in die Zellen zurücktransportiert werden, wo sie dann sofort metabolisiert werden (Itoh *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2000). Die Hauptmetabolisierungsschritte sind die Oxidation an C15 durch die 15-Hydroxy-Prostaglandin-Dehydrogenase,

die Hydrierung der Doppelbindung an Position 13, die Oxidation des Alkanendes zur Carboxyfunktion und der Abbau der Seitenketten durch β -Oxidation, wobei unter anderem C18- und C16-Prostanoide entstehen können.

Bislang wurden 8 membranständige Rezeptoren für Prostaglandine gefunden, die alle zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Tab. 1) (Austin und Funk, 1999).

| Rezeptor | Ligand | second messenger | Vorkommen des Rezeptors |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------|---|
| EP ₁ | PGE ₂ | DAG und IP ₃ | Glatter Muskel, Niere und ZNS |
| EP ₂ | PGE ₂ | cAMP | Weitverbreitet |
| EP ₃ | PGE ₂ | DAG, IP ₃ und cAMP | Weitverbreitet |
| EP ₄ | PGE ₂ | cAMP | Weitverbreitet |
| DP | PGD ₂ | cAMP | Ileum, Thrombozyten, Leukozyten und Gehirn |
| FP | PGF _{2α} | DAG und IP ₃ | Corpus luteum, weitverbreitet |
| IP | PGI ₂ | cAMP | Thrombozyten und Glatter Muskel (Lunge und Aorta) |
| TP | TXA ₂ | DAG und IP ₃ | Thrombozyten und Glatter Muskel (Lunge und Aorta) |

Tab. 1: Rezeptorvermittelte Wirkungen verschiedener Prostaglandine. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), DAG (Diacylglycerol), IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) (Marks und Fürstenberger, 1999).

Für die Cyclopentenon-Prostaglandine (PGA₂ und PGJ₂) konnten bislang keine membranständigen Rezeptoren gefunden werden. Jedoch konnte gezeigt werden, daß diese Prostaglandine an intrazelluläre Zielproteinen binden, so z.B. an Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (engl.: peroxisome-proliferator-activated receptors, PPAR) (Bernardo *et al.*, 2000; Heneka *et al.*, 2000). Nach Bindung an PPAR's modulieren sie Genaktivitäten.

I.1.4 Physiologische Rolle der Prostaglandine

Prostaglandine sind essentielle Mediatoren für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. Die rezeptorvermittelten Wirkungen der Prostaglandine sind komplex und können sich in verschiedenen Geweben desselben Organismus unterscheiden. Tabelle 2 gibt eine kurze Übersicht über die biologischen Aktivitäten von Prostaglandinen im Menschen.

I. Einleitung

| Eikosanoid | Wichtige Stoffwechselwirkung beim Menschen |
|------------------|--|
| PGD ₂ | <ul style="list-style-type: none">• DP-Rezeptor vermittelt: Inhibierung der Blutplättchenaggregation, Relaxation glatter Muskeln, Vasodilatation in der Niere, erhöhte Wasserresorption im Dünndarm |
| PGE ₂ | <ul style="list-style-type: none">• EP₁-Rezeptor vermittelt: Inhibierung der Blutplättchenaggregation• EP₂-Rezeptor vermittelt: Verstärkung der Blutplättchenaggregation, Relaxation der glatten Muskulatur, Vasodilatation, Aktivierung sensorischer Nerven, Inhibierung der Mediatorfreisetzung bei der Entzündung• EP₃-Rezeptor vermittelt: Inhibierung der autonomen Freisetzung von Neurotransmittern, Inhibierung der Lipolyse in Adipozyten, Inhibierung der Wasserreabsorption in der Nierenmedulla, Unterdrückung der Säurefreisetzung im Magen, Kontraktion der glatten Muskulatur, Potenzierung der Blutplättchenaggregation• EP₄-Rezeptor vermittelt: ? |
| PGF ₂ | <ul style="list-style-type: none">• FP-Rezeptor vermittelt: Zunahme des Muskeltonus im Uterus, Kontraktion der Bronchialmuskulatur, Inhibierung der Wasserreabsorption im Dünndarm |
| PGI ₂ | <ul style="list-style-type: none">• IP-Rezeptor vermittelt: Vasodilatation, Inhibierung der Blutplättchenaggregation, Zunahme der Wasserreabsorption im Dünndarm, Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren |
| TXA ₂ | <ul style="list-style-type: none">• TXA-Rezeptor vermittelt: Vasokonstriktion, Einleitung der Blutplättchenaggregation, starke Kontraktion der Bronchialmuskulatur |

Tab. 2: Übersicht über die Stoffwechselwirkungen von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxan im menschlichen Organismus [verändert nach (Michal, 1998)].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Prostaglandine im Säugetier essentielle Signalstoffe der Abwehrantwort und Wundreaktionen (Serhan *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1998), der Reproduktion (Nguyen *et al.*, 1997; Sugimoto *et al.*, 1997) und verschiedener Entwicklungsprozesse (Morham *et al.*, 1995) sind.

I.2 Isoprostane

I.2.1. Vorkommen der Isoprostane

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die im Gegensatz zu Prostaglandinen nicht enzymatisch gebildet werden, sondern über Radikal-katalysierte Oxidation aus Arachidonsäure entstehen (Morrow *et al.*, 1990b; Nugteren *et al.*, 1967). Es konnte gezeigt werden, daß Isoprostane in allen tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommen (Roberts und Morrow, 1997), wobei ihre Konzentration die der Prostaglandine um mindestens den Faktor 10 übersteigt (Litu *et al.*, 1998).

I.2.2 Biosynthese und Struktur der Isoprostane

Eines der wichtigen strukturellen Unterscheidungsmerkmale von Prostaglandinen und Isoprostanen ist die unterschiedliche Orientierung der Seitenketten. Sowohl bei der enzymatischen Synthese der Prostaglandine, als auch bei der Radikal-katalysierten Bildung der Isoprostane treten radikalische Zwischenstufen auf. Während jedoch im ersten Fall die Arachidonsäure durch die PGH-Synthase derart gefaltet wird, daß eine *trans*-Orientierung der Seitenketten erzwungen wird, entstehen bei der Radikal-katalysierten Oxidation fast ausschließlich *cis*-orientierte Seitenketten.

Es existieren zwei vorgeschlagene Reaktionsmechanismen, wie Isoprostane gebildet werden, die jeweils nach einem darin vorkommenden Zwischenprodukt benannt wurden: der Endoperoxid- und der Dioxetanmechanismus.

I.2.2.1 Synthese der Isoprostane nach dem Endoperoxidmechanismus

Abbildung 5 zeigt die Synthese von Isoprostanen nach dem Endoperoxidmechanismus. Im ersten Schritt der Synthese wird eines der beiden bis-allylischen Wasserstoffatome radikalisch abgespalten. Es entstehen Pentadienylradikale, welche mit molekularem Sauerstoff zu Peroxylradikalen reagieren. Diese können sich dann zu bicyclischen Endoperoxiden umlagern und anschließend ein weiteres Sauerstoffmolekül aufnehmen. Da die Cyclisierung der Endoperoxide nach den Woodward-Hoffmann-Regeln disrotatorisch erfolgt, sind die Seitenketten fast ausschließlich *cis*-orientiert (ca. 97%) (Corey *et al.*, 1984; O'Connor *et al.*, 1984; Porter *et al.*, 1984). Die so gebildeten Bicyclo-Endoperoxyradikale können nun z.B. von einer Fettsäure Wasserstoff abstrahieren, wobei PGG₂-ähnliche Verbindungen entstehen, die analog zu den Prostaglandinen als Isoprostane G₂ (iPG₂) bezeichnet werden. iPG₂ stellen die zentralen Vorstufen aller Isoprostane dar, da aus dem G-Ringsystem alle anderen Prostaglandin-Ringsysteme auf nicht-enzymatischen Wege

hervorgehen können (ausgenommen das Prostacyclinringsystem). Im wäßrigen Milieu lagern sich iPG_2 spontan zu den Isoprostanen E_2 (iPE_2) und D_2 (iPD_2) um (Morrow *et al.*, 1994; Stehle, 1982) (in Abbildung 5 nicht dargestellt), während durch direkte Reduktion der Peroxide Isoprostane F_2 (iPF_2) entstehen.

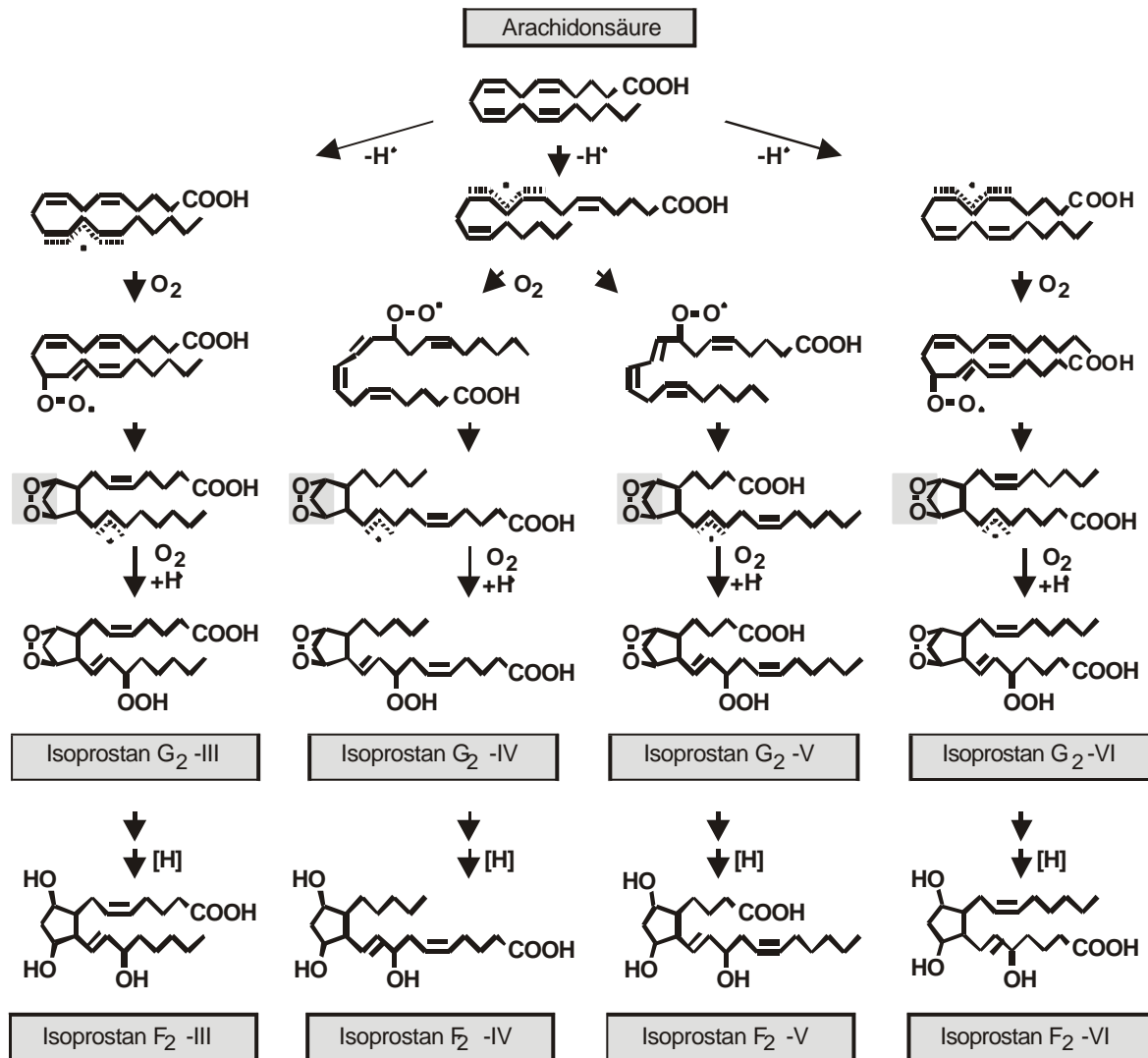


Abb. 5: Endoperoxidmechanismus: postulierte Synthese von Isoprostanen aus Arachidonsäure. Als Intermediat tritt ein Endoperoxid auf (grau unterlegt). Theoretisch können vier regioisomere Verbindungen gebildet werden (Typ III-VI, Nomenklatur siehe I.2.2.4), die jeweils aus 16 Isomeren bestehen.

Strukturelle Voraussetzung für die Synthese eines Cyclopentanrings sind drei Doppelbindungen, die jeweils durch eine Methylengruppe voneinander getrennt sind. Im folgenden Text wird diese Struktureinheit als 1,4,7-Oktatrieneinheit bezeichnet. Die beiden Substituenten der 1,4,7-Oktatrieneinheit sind beliebig und so können aus Arachidonsäure, die zwei 1,4,7-Oktatrieneinheiten besitzt (Abb. 7), insgesamt vier verschiedene Regioisomere entstehen. Diese werden mit den römischen Ziffern III bis VI bezeichnet (siehe I.2.2.4)

(Rokach *et al.*, 1997b). Jedes dieser Regioisomere besitzt vier Chiralitätszentren, so daß theoretisch acht Diastereomerenpaare (insgesamt 64 Isomere) gebildet werden können. Im Fall von iPF werden die zwei Chiralitätszentren des Cyclopentanringes, die mit Hydroxygruppen substituiert sind, als eines gerechnet, da sie aus einem Endoperoxid entstanden sind und so die gleiche räumliche Orientierung (beide oberhalb oder unterhalb der Zeichenebene) besitzen.

I.2.2.2 Synthese der Isoprostane nach dem Dioxetanmechanismus

Einen alternativen Mechanismus über den Isoprostane entstehen können, den Dioxetanmechanismus, stellten Corey und Wang 1994 vor (Abb. 6) (Corey und Wang, 1994). Die Synthese startet mit der Peroxylradikalbildung am äußeren Kohlenstoffatom einer 1,4,7-Oktatrieneinheit einer ungesättigten Fettsäure, beispielsweise Arachidonsäure, wobei sich ein Dioxetan bildet. Im weiteren Verlauf der Synthese wird ein zweites Sauerstoffmolekül angelagert, was zur Entstehung eines cyclischen Endoperoxides und anschließendem Ringschluß führt. Umlagerungen resultieren in der Öffnung des Dioxetans und es entsteht ein Bicyclo-Endoperoxyradikal, das nach Aufnahme eines Wasserstoffradikals die PGG-Ringstruktur aufweist.

Die Substituenten der 1,4,7-Oktatrieneinheit sind mechanistisch gleichwertig, so daß diese Reaktion auch mit anderen mindestens dreifach ungesättigten Fettsäuren ablaufen kann.

Dieser Syntheseweg führt zu denselben Regioisomeren wie der Endoperoxidmechanismus (Abb. 5), jedoch entstehen auch Isoprostane, deren Seitenketten trans orientiert sind. Das Verhältnis der trans-konfigurierten Produkte zu den cis-konfigurierten Produkten beträgt 1:3, während beim Endoperoxidmechanismus nur ca. 3% der trans-Verbindungen entstehen (O'Connor *et al.*, 1984).

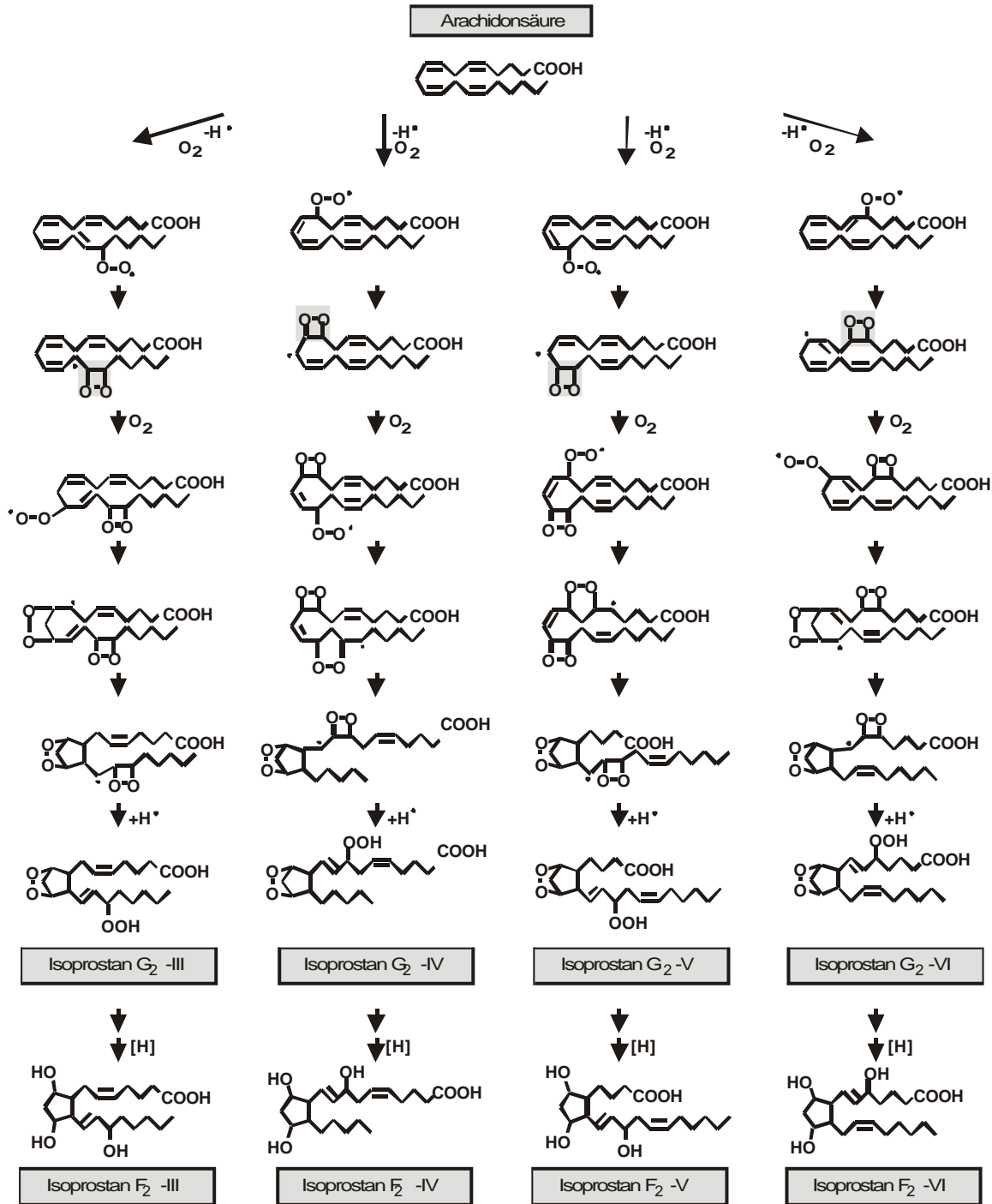


Abb. 6: Dioxetanmechanismus: ein weiterer Syntheseweg zur Darstellung von Isoprostanen durch Radikal-katalysierte Oxidation. Als Intermediat tritt ein Dioxetan auf (grau unterlegt), nach dem dieser Mechanismus benannt wurde.

I.2.2.3 PGH-Synthase-induzierte Synthese des iPF_{2α}-III (8-iso-PGF_{2α})

Isoprostane werden generell über Radikal-katalysierte Oxidation gebildet. Es gibt jedoch eine Ausnahme: iPF_{2α}-III (frühere Schreibweise: 8-iso-PGF_{2α}).

Pratico konnte 1995 zeigen, daß die PGH-Synthase-1 und -2 nicht absolut stereospezifisch arbeiten: als Nebenprodukt der Enzymaktivität entstand ein einziges Isoprostan, $iPF_{2\alpha}$ -III, dessen Seitenketten im Gegensatz zu $PGF_{2\alpha}$ *cis*-orientiert sind. Dabei konnte eine Synthese von $iPF_{2\alpha}$ -III sowohl in aktivierten Thrombozyten (enthalten PGH-Synthase-1) als auch in Monozyten (enthalten PGH-Synthase-2) beobachtet werden (Pratico und FitzGerald, 1996; Pratico *et al.*, 1995).

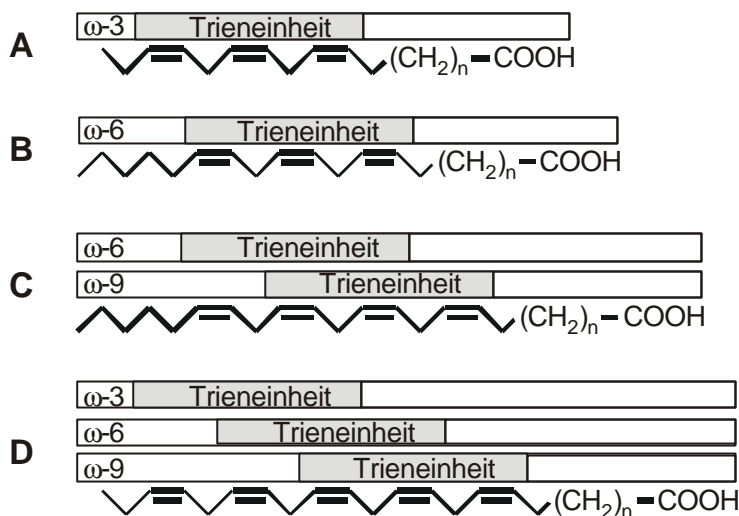
Die Menge des $iPF_{2\alpha}$ -III betrug jedoch nur ~0.05-0.01% bzw. ~0.5-0.8% der enzymatisch gebildeten Produkte. Heute geht man davon aus, daß der enzymatisch entstandene Anteil an $iPF_{2\alpha}$ -III gegenüber dem nicht-enzymatisch gebildeten $iPF_{2\alpha}$ -III bedeutungslos ist. Somit kann $iPF_{2\alpha}$ -III prinzipiell als Marker für Lipidperoxidation eingesetzt werden (Mueller, 1998).

I.2.2.4 Nomenklatur der Isoprostane

Isoprostane (iP) werden wie Prostaglandine je nach Art der Substitution des Cyclopentanringes in verschiedene Klassen eingeteilt, die durch nachgestellte Buchstaben gekennzeichnet sind (z.B. iPF). Zusätzlich wird durch einen numerischen Index die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten angegeben (z.B. iPF_2).

Um Isoprostane eindeutig bezeichnen zu können, reicht die Prostaglandin-Nomenklatur nicht aus. Im Falle der Prostaglandine wird nur ein Isomer gebildet, wohingegen im Falle der Isoprostane vier Regioisomere mit jeweils 16 Isomeren gebildet werden können (Abb. 5 und 6). Darüber hinaus können auch aus anderen mindestens dreifach ungesättigten Fettsäuren Prostaglandin-ähnliche Verbindungen synthetisiert werden, aus denen wiederum mindestens zwei regioisomere Strukturen hervorgehen können. Daher empfahl Rokach 1997 eine Nomenklatur für Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, welche die Moleküle nach der Länge der Seitenkette zwischen dem terminalen Kohlenstoffatom und der 1,4,7-Oktatrieneinheit, die die Cyclopentan-Struktur bildet, in die Typen I-VI einteilt (Abb. 7) (Rokach *et al.*, 1997).

Ungesättigte Fettsäure



Klassifizierung der Isoprostanoid-Regioisomere

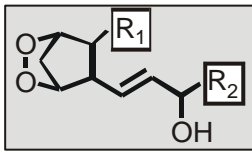
| Trienderivate | Substituenten | Typ |
|--|------------------|-----|
|  | $R_2 = \omega-3$ | I |
| | $R_1 = \omega-3$ | II |
| | $R_2 = \omega-6$ | III |
| | $R_1 = \omega-6$ | IV |
| | $R_2 = \omega-9$ | V |
| | $R_1 = \omega-9$ | VI |

Abb. 7: Isoprostanoid-Klassifizierung. Exemplarische Beispiele: α -Linolensäure (A, $n = 6$), γ -Linolensäure (B, $n = 3$), Arachidonsäure (C, $n = 2$) und Eikosapentaensäure (D, $n = 2$) [Abbildung nach (Mueller, 1998)].

Arachidonsäure beispielsweise besitzt zwei 1,4,7-Oktatrieneinheiten (Abb. 7 C), wobei aus jeder Trieneinheit zwei regioisomere Strukturen hervorgehen können (Abb. 5 und 6). Betrachtet man nun die Isoprostane, die aus der ω -6-Trieneinheit gebildet werden, so können die Typen III und IV entstehen. Dabei hängt die Bezeichnung von der Position des Methylendes der Struktur ab: ist das Methylende an Position R_1 , so handelt es sich um Typ IV, ist es an Position R_2 um Typ III (Abb. 7). Aus der ω -9-Trieneinheit entstehen auf analoge Weise Typ V und VI.

I.2.3 Bedeutung und mögliche Funktion der Isoprostane

I.2.3.1 Entstehung und Metabolisierung freier Radikale im tierischen Organismus

Die Isoprostanbildung wird durch Radikale initiiert und propagiert. Eine wichtige Gruppe dieser Radikale bilden reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die beim Zusammentreffen von Radikalen mit molekularem Sauerstoff entstehen.

Eine der reaktivsten ROS ist das Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), das u.a. durch Nebenreaktionen von Oxidasen (z.B. Xanthinoxidase) oder Elektronenüberträgern in der Atmungskette entstehen kann. $O_2^{\bullet-}$ kann in Membranen zu Lipidperoxidation führen, wenn es nicht rasch genug metabolisiert wird. Diese Funktion übernimmt eine Superoxid-Dismutase (SOD), welche $O_2^{\bullet-}$ in das ebenfalls toxische aber weniger reaktive Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umsetzt (Abb. 8). Diese Reaktion läuft auch spontan ab.

ROS werden jedoch nicht nur als unerwünschte Nebenprodukte einiger Oxidasen gebildet, sondern im Falle von Entzündungsreaktionen erzeugen aktivierte Makrophagen $O_2^{\bullet-}$ auch als Abwehrgens, beispielsweise gegen Pathogene. In diesem Fall wird $O_2^{\bullet-}$ durch eine NADPH-Oxidase gebildet und mittels SOD in H_2O_2 überführt. Darüber hinaus kann H_2O_2 von verschiedenen Oxidasen, die z.B. in Peroxisomen oder im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, gebildet werden. Die Toxizität von H_2O_2 beruht einerseits auf der direkten Inaktivierung von Enzymen, andererseits auf der Erzeugung von Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) bei der Reaktion mit Semichinonen oder Schwermetallen. Das OH^{\bullet} ist die reaktivste und kurzlebigste ROS, welche mit fast allen Molekülen einer Zelle reagieren kann. $O_2^{\bullet-}$ oder OH^{\bullet} können beispielsweise Alkane angreifen und diese zu Alkylradikalen oxidieren. Durch die Umsetzung von molekularem Sauerstoff mit Alkylradikalen entstehen Peroxid-Radikale (ROO^{\bullet}). ROO^{\bullet} sind Zwischenprodukte der Lipidperoxidation. Sie können Wasserstoffradikale von ungesättigten Fettsäuren abstrahieren und so die Lipidperoxidation propagieren.

Zellen können sich durch enzymatische und nicht-enzymatische Entgiftungsmechanismen teilweise gegen ROS schützen. $O_2^{\bullet-}$ kann durch SOD in H_2O_2 überführt werden, welches dann durch Katalasen und verschiedene Peroxidasen (z.B. Glutathion-Peroxidase) zu Wasser reduziert werden kann. Abbildung 8 zeigt drei wichtige Metabolisierungsreaktionen von Sauerstoffradikalen bzw. Peroxiden.

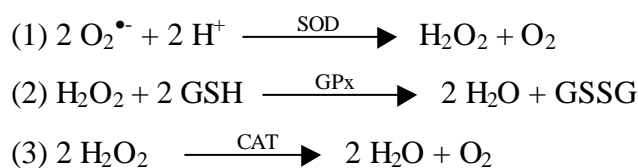


Abb. 8: Enzymkatalysierte Metabolisierungsreaktionen von Radikalen bzw. Peroxiden: (1) Abbau von Superoxidanionen durch die Superoxid-Dismutase (SOD); (2) Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Glutathion-Peroxidase (GPx); (3) Abbau von Wasserstoffperoxid durch Katalase (CAT); GSH/GSSG (reduziertes/oxidiertes Glutathion).

Neben enzymatischen Mechanismen zur Begrenzung von ROS in einer Zelle gibt es auch antioxidative Moleküle, wie Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Phenole und Glutathion. Radikalfänger wie das Vitamin E können die Radikalkettenreaktion stoppen, indem sie selbst oxidiert werden und langlebige Radikale bilden, die dann mit einem weiteren Radikal oder mit physiologischen Antioxidantien (z.B. Ascorbat) zu nicht-radikalischen Produkten reagieren.

Können die Abwehrmechanismen die ROS-Konzentration in einer Zelle nicht begrenzen, kann es zu Strukturschädigungen der Zelle, wie z.B. Lipidperoxidation, kommen. Ausgeprägte Strukturschäden können zum Zelltod führen.

I.2.3.2 Physiologische Bedeutung von Reaktiven Sauerstoffspezies

In der Zelle laufen ständig oxidative und antioxidative Prozesse ab, die in einem Gleichgewicht zueinander stehen. Eine Verschiebung des oxidativen/antioxidativen Verhältnisses zur oxidativen Seite wird häufig als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Sehr häufig wird dieses Phänomen mit Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, bei deren Auftreten eine erhöhte Konzentration an ROS zu beobachten ist, wie z.B. Entzündungen, Arteriosklerose, Vergiftungserscheinungen durch Xenobiotika oder Metalle, sowie Reperfusionsschäden (siehe V.2). Die genauen Zusammenhänge zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der Entstehung bzw. Entwicklung pathologischer Zustände sind bisher allerdings noch unklar.

Um diese Zusammenhänge zu klären, bedarf es zunächst einer Quantifizierungsmöglichkeit für ROS. Da ROS hochinstabile Verbindungen sind, werden gewöhnlich verschiedene Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation vermessen. Diese sind jedoch meist selbst metabolisch oder chemisch instabil (Malondialdehyd, Peroxide, konjugierte Diene) oder flüchtig (Ethan) (siehe V.2, Tab. 10). Die Entdeckung der Isoprostane eröffnete die Möglichkeit einen chemisch stabilen Marker für Lipidperoxidation zu etablieren.

I.2.3.3 Isoprostane als Marker für Lipidperoxidation

In den letzten Jahren haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, daß Isoprostane zuverlässige und sensitive Marker für Lipidperoxidation sind (Morrow und Roberts, 1996), die mit klassischen Markern sehr gut korrelieren (Longmire *et al.*, 1994; Mueller, 1998).

Die besten Voraussetzungen, um als Marker eingesetzt zu werden, besitzen iPF_2 , da sie chemisch sehr stabil sind. iPF_2 werden vorwiegend in den Membranen gebildet (Morrow *et al.*, 1992a), wo sie nach ihrer Bildung nur langsam metabolisiert werden und daher als Langzeitmarker für Lipidperoxidation dienen können. Isoprostane können auch im Plasma und Urin detektiert werden, wobei die Konzentration der Isoprostane mit dem Ausmaß der

systemischen Lipidperoxidation korrelieren. Mit dem Nachweis der Isoprostane im Urin wurde eine genaue, nicht-invasive Messung von Lipidperoxidation im tierischen Organismus möglich. In den meisten Untersuchungen wurde $iPF_{2\alpha}$ -III als Marker bestimmt, wobei seit kurzem auch der Nachweis von $iPF_{2\alpha}$ -VI möglich ist, welches in höheren Konzentrationen im Urin vorkommt (Pratico *et al.*, 1998a). Der Nachweis selbst erfolgt immunologisch mittels ELISA oder durch GC-MS-Analyse.

Es ist auch denkbar, dass Isoprostan-ähnliche Verbindungen, die aus gewebsspezifischen ungesättigten Fettsäuren entstehen, als Marker für Lipidperoxidation bestimmter Gewebe eingesetzt werden. In Frage käme beispielsweise Docosahexaensäure (C20:6). Morrow und Roberts zeigten 1998, daß F_2 -Isoprostan-ähnliche Verbindungen durch Autoxidation von Docosahexaensäure, die vorwiegend im Gehirn vorkommt, *in vitro* entstehen (Roberts *et al.*, 1998). Diese als Neuropropane bezeichneten Verbindungen konnten im Gehirn von Ratten und in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Menschen nachgewiesen werden. Neuropropane könnten somit als Marker für Lipidperoxidation im Gehirn dienen.

I.2.3.4 Biologische Aktivität der Isoprostane im Säugetier

Bislang sind nur wenige Isoprostane als reine Isomere durch chemische Totalsynthese zugänglich. Zu diesen Isoprostanen gehören iPE_2 -III und $iPF_{2\alpha}$ -III, die zu den Hauptprodukten der Autoxidation der Arachidonsäure zählen.

iPE_2 -III und $iPF_{2\alpha}$ -III wirken *in vitro* auf viele Gewebe als potente Vasokonstriktoren, so z.B. in der Niere, wo es zu einer Senkung der glomerulären Filtrationsrate kommt (Fukunaga *et al.*, 1993b; Takabashi *et al.*, 1992). $iPF_{2\alpha}$ -III ist darüber hinaus ein starker Vasokonstriktor in Leber (Marley *et al.*, 1997), Lunge (Kang *et al.*, 1993), Herz (Kromer und Tippins, 1996; Mobert *et al.*, 1997) und Retina (Lahaie *et al.*, 1998).

Interessanterweise zeigten iPE_2 -III und $iPF_{2\alpha}$ -III die gleiche Wirkung, während die korrespondierenden Prostaglandine PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ generell entgegengesetzte Wirkungen haben. So wirkt PGE_2 vasodilatatorisch und $PGF_{2\alpha}$ vasokonstriktorisch.

Die meisten der oben genannten Wirkungen der Isoprostane konnten durch Zugabe eines Thromboxanrezeptorantagonisten aufgehoben werden (Kinsella *et al.*, 1997), was auf Thromboxanrezeptor-vermittelte Vorgänge schließen läßt. Trotzdem wurde immer wieder die Existenz von Isoprostanrezeptoren postuliert, da Rezeptorbindungsstudien andeuteten, daß die Plasmakonzentration des $iPF_{2\alpha}$ -III zu gering sei, um den Thromboxanrezeptor der Blutplättchen zu erregen (Pratico *et al.*, 1996). Darüber hinaus verursachten iPE_2 -III und $iPF_{2\alpha}$ -III eine stärkere Kontraktion der glatten Gefäßmuskeln als einige Thromboxanrezeptoragonisten (Fukunaga *et al.*, 1993a; Fukunaga *et al.*, 1993b). Jedoch konnte anhand von transgenen Mäusen, die Thromboxanrezeptoren in der Gefäßwand überexprimieren, gezeigt werden, daß iPE_2 -III und $iPF_{2\alpha}$ -III ihre Effekte auf Gefäßtonus und Blutplättchen-

funktion über Thromboxanrezeptoren vermitteln und vermutlich nicht über spezifische Isoprostanrezeptoren (Audoly *et al.*, 2000).

Isoprostane können auch an Prostaglandinrezeptoren binden, so beispielsweise aktiviert 12-*iso*-iPF_{2α}-III (frühere Bezeichnung 8,12-*iso*-PGF_{2α}) [EC₅₀ = 5 μM] den PGF_{2α}-Rezeptor am Auge (PGF_{2α} [EC₅₀ = 10 nM]). Andere iPF₂, wie z.B. iPF_{2α}-III, besitzen nur einen geringen oder keinen Effekt auf den PGF_{2α}-Rezeptor.

I.2.3.5 Einfluß der Isoprostane auf Membranen

Freie Radikale verursachen Lipidperoxidation, was wiederum eine Veränderung der physikalischen und funktionalen Eigenschaften von Zellmembranen zur Folge haben kann, z.B. ein Plasmaleck oder veränderte Transporteigenschaften von Carrier- und Kanalproteinen. Unter physiologischen Umständen sind die Atmungskette und Cytochrom-P450-Enzyme eine Quelle von ROS. Daher wurde vermutet, daß am Lokalisationsort dieser Enzymsysteme, also in der Mitochondrienmembran oder der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, eine hohe Konzentration an Isoprostanen in Membranen gefunden wird. Phospholipide, die Isoprostane enthalten, weisen eine stark gewinkelte Struktur auf, die die Fluidität und die Integrität von Membranen stark beeinflussen könnte (Morrow *et al.*, 1992a).

I.3 Jasmonate

Linolensäure (C18:3) ist mit einem Anteil von ca. 40% am Gesamtfettsäuregehalt die in Pflanzen am häufigsten vorkommende ungesättigte Fettsäure. Sie ist neben der Linolsäure das wichtigste Substrat für die Synthese oxygenierter Fettsäurederivate, sogenannter Oxylipine, die in Pflanzen eine Vielzahl von Funktionen besitzen (Blee, 1998). Jedoch sind nur wenige von Fettsäuren abgeleitete Signalstoffe bekannt und sicher etabliert, wie beispielsweise Jasmonsäure (Beale und Ward, 1998; Blee, 1998).

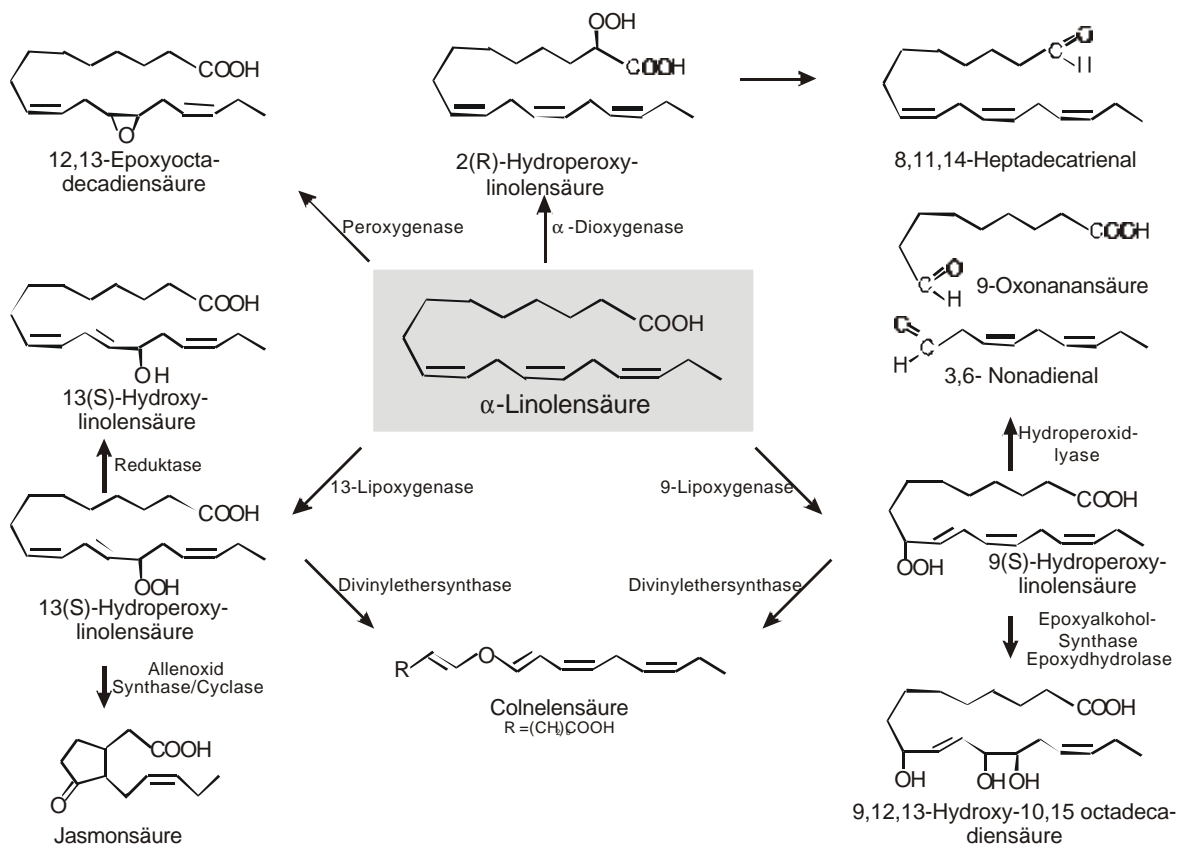


Abb. 9: Auswahl einiger aus Linolensäure entstandener Oxylipine in Pflanzen.

Oxylipine entstehen in Pflanzen beispielsweise durch Umsetzung von Linolensäure durch Lipoxygenasen, α -Dioxygenasen und Monooxygenasen (Abb. 9) (Blee, 1998).

Höhere Pflanzen besitzen keine PGH-Synthase-Aktivität. Bei Untersuchungen zu dem Vorkommen von PGH-Synthasen in Pflanzen wurde eine α -Dioxygenase gefunden, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der PGH-Synthase aufweist (Hamberg *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 1998). Die Produkte der α -Dioxygenase, α -Hydroperoxyfettsäuren, können durch Peroxygenasen in fungizid wirkende Epoxyfettsäuren umgesetzt werden (Hamberg *et al.*, 1999).

Die Produkte der 9- und 13-Lipoxygenasen (LOX) spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr: zum einen können direkt antimikrobiell wirkende Stoffe, wie z.B.

Colnelensäure (hemmt die Germination von Pilzsporen) (Weber *et al.*, 1999), verschiedene Aldehyde und Trihydroxyverbindungen (Croft *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1985) entstehen, zum anderen werden auf diesem Weg Signalmoleküle gebildet, die durch Genaktivierung die Akkumulation von Abwehrproteinen induzieren (Farmer und Ryan, 1990).

Die wohl am besten untersuchte Gruppe dieser Signalstoffe sind die Jasmonate, die aus 13-Hydroperoxylinolensäure durch Umsetzung mit einer Allenoxid-Synthase und -Cyclase entstehen.

Jasmonate weisen sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten zu den in Tieren gebildeten Prostaglandinen auf. In der pflanzlichen Zelle stellen Jasmonate ein essentielles Signal bei Abwehrmechanismen und in der Fortpflanzung dar.

I.3.1 Entdeckung, Vorkommen und Struktur der Jasmonate

Der Begriff Jasmonate leitet sich von Jasmonsäure ab, die als erste cyclische Fettsäure mit regulatorischen Eigenschaften in der Pflanze identifiziert wurde (Weiler *et al.*, 1998). Die Bezeichnung Jasmonate umfaßt nicht nur Jasmonsäure, deren Isomere (Abb. 10) und Methyljasmonat, sondern auch biosynthetische Vorstufen, wie z.B. 12-Oxo-Phytodiensäure, und Metabolite der Jasmonsäure, wie z.B. Tuberonsäure (Abb. 11). Freie Jasmonsäure wurde erstmals 1971 im Filtrat des Pilzes *Botryodiplodia theobromae* (syn.: *Lasiodiplodia theobromae*) entdeckt (Aldridge *et al.*, 1971), während Methyljasmonat bereits 1962 als Hauptduftstoffkomponente des ätherischen Öls von *Jasminum grandiflorum* identifiziert wurde (Demole *et al.*, 1962). Die Forschungen der letzten Jahre zeigten, daß das Vorkommen von Jasmonsäure und Jasmonsäurederivaten im Pflanzenreich weit verbreitet ist (Hamberg und Gardner, 1992).

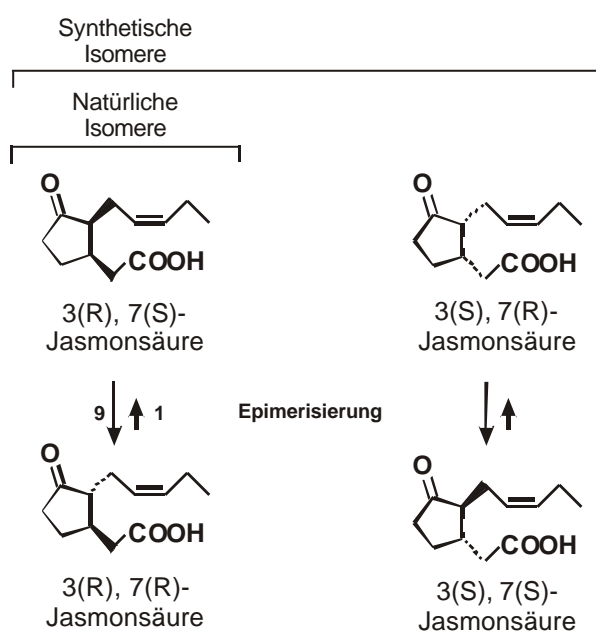


Abb. 10: Stereoisomere der Jasmonsäure.

In vivo kommen nur die 3(*R*)-Stereoisomere der Jasmonsäure (Abb. 10) vor, wobei 3(*R*),7(*S*)-Jasmonsäure (cis-Jasmonsäure) das Produkt des enzymatischen Syntheseweges ist. Durch Epimerisierung kann die thermodynamisch stabilere 3(*R*),7(*R*)-Form (trans-Jasmonsäure) entstehen. Das Verhältnis von cis- zu trans-Jasmonsäure beträgt etwa 1:9 im thermodynamischen Gleichgewicht (Mueller und Brodschelm, 1994). Die in Abbildung 10 dargestellten 3(*S*)-Isomere der Jasmonsäure entstehen nur bei der chemischen Synthese und kommen in Pflanzen nicht genuin vor.

I.3.2 Biosynthese der Jasmonate

Die Biosynthese der Jasmonsäure (Abb. 11) wurde von Vick und Zimmerman zwischen 1978 und 1984 weitestgehend aufgeklärt (Vick *et al.*, 1980; Vick und Zimmerman, 1984; Zimmerman und Feng, 1978). Sie konnten alle Intermediate des Syntheseweges isolieren und identifizieren, mit Ausnahme eines chemisch instabilen Allenoxids, das später von Hamberg und Brash entdeckt wurde (Brash *et al.*, 1988; Hamberg, 1988).

Das Substrat der Jasmonsäurebiosynthese ist freie α -Linolensäure (C18:3), die vermutlich durch Lipasen aus Membranen herausgelöst wird (Weiler *et al.*, 1998). Durch eine 13-LOX wird im weiteren Verlauf der Synthese molekularer Sauerstoff in die Linolensäure unter Bildung eines 13(*S*)-Hydroperoxids eingeführt. Diese Reaktion ist nicht spezifisch für die Jasmonatbiosynthese, da das entstandene Hydroperoxid auch ein Substrat der Hydroperoxidlyase, der Divinylethersynthese und verschiedener Peroxidasen ist (Abb. 9) (Blee, 1998; Göbel *et al.*, 2001).

Die Bildung der 12-Oxo-Phytodiensäure aus 13(*S*)-Hydroperoxylinolensäure ist der erste spezifische Biosyntheseschritt in der Jasmonatkaskade, der über die Allenoxid-Synthase und -Cyclase katalysiert wird (Weiler *et al.*, 1998). Im Anschluß daran wird 12-Oxo-Phytodiensäure durch eine NADPH-abhängige Reduktase zu 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure hydriert, die abschließend der β -Oxidation zugeführt wird.

Vor kurzem konnte 12-Oxo-Phytodiensäure in veresterter Form in Membranen nachgewiesen werden (Stelmach *et al.*, 2001). Bislang ist nicht bekannt, ob veresterte 12-Oxo-Phytodiensäure durch direkte Einwirkung der Enzyme des Oktadekanoidweges *in situ* in Membranen entsteht oder ob 12-Oxo-Phytodiensäure erst nach der Synthese aus freier Linolensäure in Membranen verestert wird (Stelmach *et al.*, 2001).

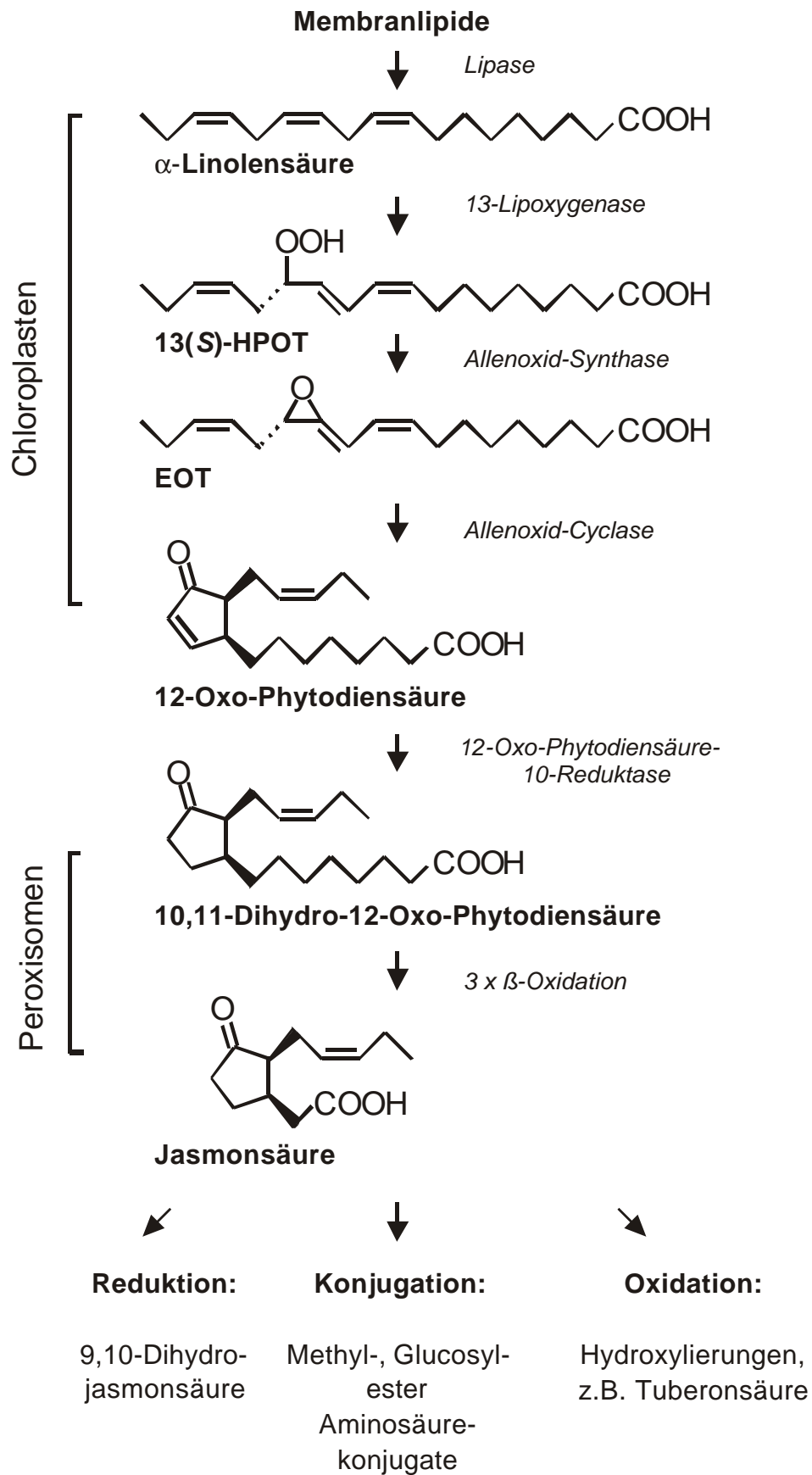


Abb. 11: Biosynthese und Metabolismus der Jasmonsäure. HPOT (Hydroperoxytriensäure), EOT (Epoxytriensäure).

I.3.3 Regulierung und Kompartimentierung der Jasmonsäurebiosynthese

Die Freisetzung der Linolensäure aus Membranlipiden von Plastiden ist wahrscheinlich einer der limitierenden Faktoren der Jasmonsäurebiosynthese (Farmer und Ryan, 1992), wobei Linolensäure vermutlich durch Lipasen aus Membranlipiden herausgelöst wird (Weiler *et al.*, 1998). Narvaéz-Vásquez konnte 1999 einen schnellen und systemischen Anstieg einer Phospholipase A-Enzymaktivität nach Verwundung von Tomatenblättern nachweisen (Narvaéz-Vásquez *et al.*, 1999), wobei noch unklar ist, ob die Phospholipase A auch in die Jasmonatkaskade involviert ist. Bei Befall einer Pflanze durch pilzliche Pathogene scheint es darüber hinaus möglich, daß das Herauslösen von Linolensäure bzw. veresterter 12-Oxo-Phytodiensäure aus den Membranen durch pilzliche Lipasen katalysiert werden kann (Stelmach *et al.*, 2001).

Nach den bislang vorliegenden Untersuchungen findet die Jasmonatbiosynthese in drei Kompartimenten statt: den Chloroplasten, dem Cytosol und den Peroxisomen (Abb. 12).

Die Synthese der 12-Oxo-Phytodiensäure ist vermutlich in Chloroplasten lokalisiert:

Bell konnte 1995 zeigen, daß in *Arabidopsis thaliana* die LOX 2, die für die Steigerung des Jasmonsäurespiegels nach Verwundung verantwortlich ist, im Stroma von Chloroplasten lokalisiert ist (Bell *et al.*, 1995). Das nächste Enzym der Jasmonatkaskade, die Allenoxid-Synthase, konnte ebenfalls in Chloroplasten von Spinatblättern nachgewiesen werden (Vick und Zimmerman, 1987). Die Cyclisierung des Allenoxids zur 12-Oxo-Phytodiensäure wird von der Allenoxid-Cyclase katalysiert, wobei dies ein lösliches Enzym ist (Hamberg, 1988), welches bislang nicht in Chloroplasten nachgewiesen wurde. Jedoch konnte sowohl für die Allenoxid-Synthase als auch für die Allenoxid-Cyclase gezeigt werden, daß sie eine Chloroplasten-Transitsequenz aufweisen (Laudert *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1997).

Die Allenoxid-Synthase ist ein zentraler Kontrollpunkt der Jasmonsäurebiosynthese, da die Konzentration an Allenoxid-Synthase-codierender-mRNA innerhalb weniger Minuten nach Verwundung von *Arabidopsis thaliana*-Blätter ansteigt (Weiler *et al.*, 1998). Die Allenoxid-Synthase nimmt jedoch nicht nur 13-Hydroperoxylinolensäure als Substrat an, sondern auch 13-Hydroperoxylinolsäure (Schaller, 2001), womit sie kein spezifisches Enzym der Jasmonatkaskade ist. Im Gegensatz dazu nimmt die Allenoxid-Cyclase, nur 13-Hydroperoxylinolensäure als Substrat an. Eine unmittelbare Nachbarschaft von Allenoxid-Synthase und -Cyclase kann den Diffusionsweg des instabilen Produktes verkürzen und damit eine nicht-enzymatische Hydrolyse minimieren (Blee, 1998). Es wird sogar die Existenz eines 12-Oxo-Phytodiensäure-Synthasekomplex, bestehend aus Allenoxid-Synthase und -Cyclase, in Chloroplasten diskutiert (Abb. 12) (Weiler *et al.*, 1998).

Der Befund, daß 12-Oxo-Phytodiensäure nicht nur frei, sondern auch verestert in der sn1-Position von Monogalactosyl-Diacylglycerol-Lipiden vorliegt, deren sn2-Position mit einer Hexadecatriensäure (C16:3) besetzt ist, ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die

Jasmonatbiosynthese bis zur Stufe der 12-Oxo-Phytodiensäure in Chloroplasten lokalisiert ist, denn das Vorhandensein von Hexadecatriensäure in der sn2-Position ist typisch für Plastidenmembranen (Stelmach *et al.*, 2001).

Der nächste Schritt der Jasmonsäurebiosynthese ist die Reduktion der 12-Oxo-Phytodiensäure zur 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure, wobei diese Reaktion von der 12-Oxo-Phytodiensäure- Δ^{10} -Reduktase katalysiert wird. Dieses Enzym ist löslich und weist keine Plastiden-Transitsequenz auf, was die Vermutung zuläßt, daß es sich um ein cytosolisches Enzym handelt (Blee, 1998). Daher muß die in Chloroplasten entstandene 12-Oxo-Phytodiensäure für die weitere Jasmonsäurebiosynthese ins Cytosol gelangen (Schaller und Weiler, 1997). Die postulierte β -Oxidation der 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure zur Jasmonsäure findet vermutlich in Peroxisomen statt (Gerhardt, 1983; Vick und Zimmermann, 1984), in die 12-Oxo-Phytodiensäure möglicherweise über Transporter eingeschleust wird.

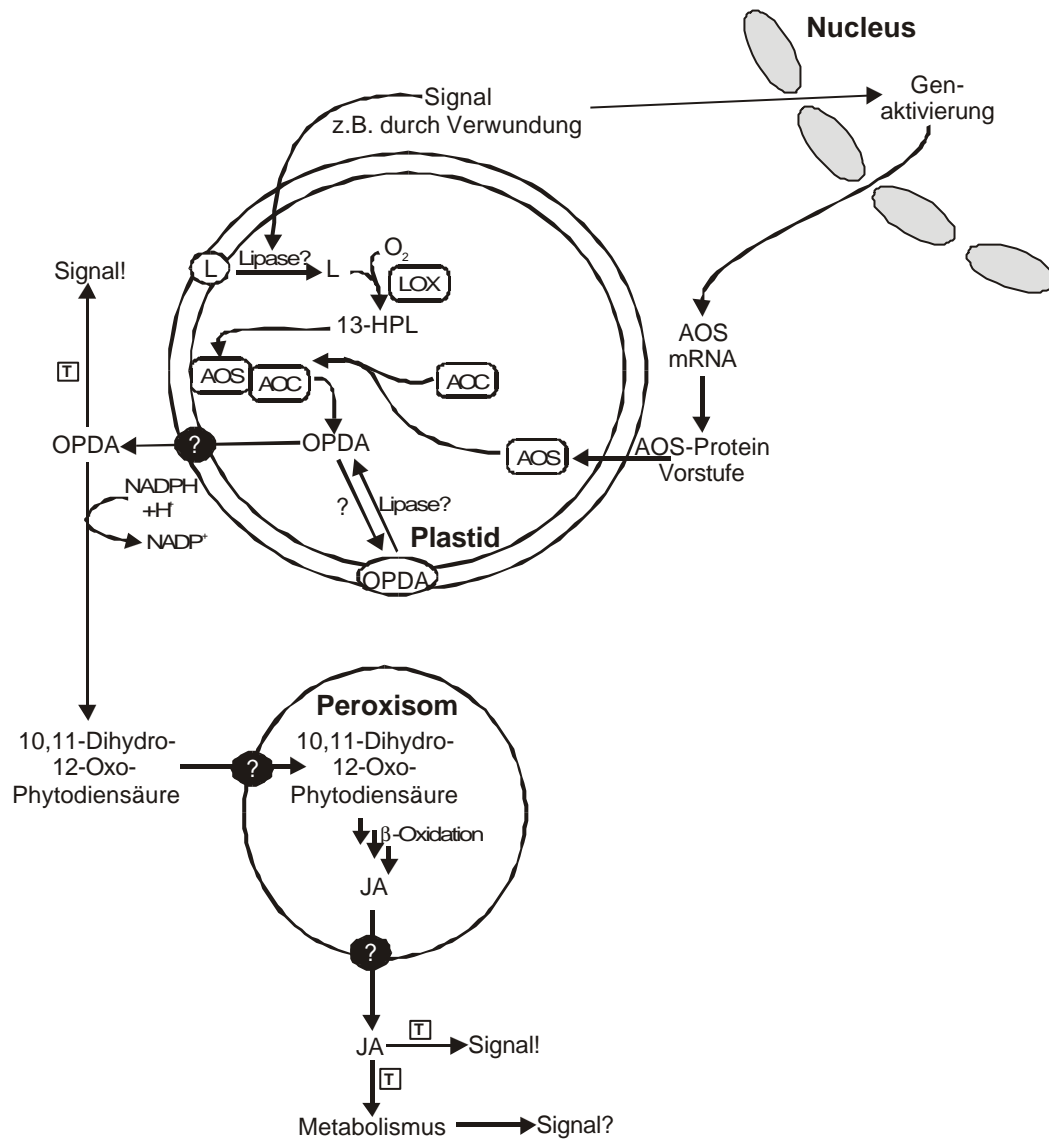


Abb. 12: Kompartimentierung der Jasmonsäurebiosynthese [nach (Weiler *et al.*, 1998), modifiziert]. AOC (Allenoxidcyclase), AOS (Allenoxidsynthase), 13-HPL (13-Hydroperoxylinolensäure), JA (Jasmonsäure), L (Linolensäure), LOX (Lipoxygenase), OPDA (12-Oxo-Phytodiensäure), T mögliche Transportprozesse zwischen Zellen und Geweben.

Interessanterweise sind auch einige Pilze in der Lage 12-Oxo-Phytodiensäure bzw. Jasmonsäure zu synthetisieren. Daher muß eine nicht-plastiditäre Biosynthese zumindest in Pilzen existieren und ein alternativer Syntheseweg in Betracht gezogen werden.

I.3.4 Funktion der Jasmonate in Pflanzen

Jasmonate spielen eine essentielle Rolle bei der pflanzlichen Abwehr und der Fortpflanzung. Daneben regulieren Jasmonate weitere physiologische Prozesse z.B. durch Hemmung von Wachstum, Samenkeimung und Photosynthese der Pflanzen und durch Induktion von Rankenspiralisierung, Proteinspeicherung, Knollenbildung, Fruchtreifung und Samenentwicklung (Creelman und Mullet, 1997; Mueller, 1997).

Farmer und Ryan beobachteten 1990 erstmals, daß Jasmonate einen wichtigen Platz in der pflanzlichen Abwehr einnehmen. Sie konnten zeigen, daß gasförmiges Methyljasmonat eine ähnliche Abwehrantwort in Tomatenpflanzen auslöst wie Verwundung oder ein Befall mit Herbivoren (Farmer und Ryan, 1990). Die Abwehrantwort bestand in der Akkumulation von Proteinaseinhibitoren, die die Verdauung von Proteinen durch den Fraßfeind verhindern, so daß es letztendlich zu einer Unterernährung des Angreifers und dessen Tod kommt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Synthese der Proteinaseinhibitoren und Jasmonsäure konnte mittels einer Tomatenmutante, *defenseless1*, nachgewiesen werden, die 13-Hydroperoxylinolensäure nicht zu 12-Oxo-Phytodiensäure umsetzen kann. Die Konzentration an Jasmonsäure in diesen Pflanzen war deutlich reduziert, was mit einem niedrigen Proteinaseinhibitorgehalt korrelierte. Die Mutanten waren wesentlich stärker durch Herbivorenbefall gefährdet als normale Tomatenpflanzen - ein Phänomen, das durch exogene Gabe von 12-Oxo-Phytodiensäure wieder behoben werden konnte (Howe *et al.*, 1996). Die Funktion der Jasmonate in der pflanzlichen Abwehr wurde durch weitere Untersuchungen untermauert. So sind Jasmonsäure-insensitive *Arabidopsis thaliana*-Mutanten (*coil*) gegenüber Herbivorenbefall anfälliger als Jasmonsäure-sensitive Kontrollpflanzen (Rojo *et al.*, 1998).

Arabidopsis thaliana-Mutanten (*fad3-2fad7-2fad8*), die unfähig sind den Precursor der Jasmonsäurebiosynthese, α -Linolensäure, zu synthetisieren, sind ebenfalls stärker durch Herbivorenbefall gefährdet. Nach Befall durch Larven der Mücke *Bradysia impatiens* starben 80% der Pflanzen, wobei die Sterblichkeit auf 12% zurückging, nachdem Methyljasmonat von außen zugeführt wurde (McConn *et al.*, 1997).

Farmer und Ryan stellten 1992 die Hypothese auf, daß Jasmonate durch Elicitoren, wie z.B. Pilzzellwandfragmente, induziert werden und die eigentliche Abwehrantwort auslösen (Farmer und Ryan, 1992). Diese Hypothese wurde durch Versuche mit pflanzlichen Zellkulturen belegt, da nach Zugabe einer Hefezellwandpräparation die Jasmonatbiosynthese in pflanzlichen Zellkulturen induziert wurde (Gundlach *et al.*, 1992; Mueller *et al.*, 1993) und

der Zusatz von Methyljasmonat zu pflanzlichen Zellkulturen zur Akkumulation von Phytoalexinen (niedermolekulare Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften, die von der Pflanze als Reaktion auf Infektion, Verwundung oder abiotischen Stress gebildet werden) führte (Gundlach *et al.*, 1992).

In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, daß Stimuli wie z.B. Verwundung (Creelman *et al.*, 1992), Systemin und Oligogalacturonide (Doares *et al.*, 1995), Austrocknung (Creelman und Mullet, 1995) und Schwermetalle (Rakwal *et al.*, 1996) ebenfalls eine Steigerung der Jasmonatbiosynthese hervorrufen.

I.3.5 Biologische Aktivität der 12-Oxo-Phytodiensäure

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß nicht nur Jasmonsäure, sondern auch deren biogenetische Vorstufe, 12-Oxo-Phytodiensäure, eine biologische Aktivität in Pflanzen aufweist.

12-Oxo-Phytodiensäure und deren Reduktionsprodukt, Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure, führten bei *Bryonia dioica* zu einer Rankenspiralisierung (Weiler *et al.*, 1993). Der Vorgang der Rankenspiralisierung lief in kürzerer Zeit und bei geringeren Konzentrationen als mit Jasmonsäure ab. Jedoch konnte in diesen Versuchen die Metabolisierung von 12-Oxo-Phytodiensäure zu Jasmonsäure nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden weitere Untersuchungen mit Strukturanaloga der 12-Oxo-Phytodiensäure (Coronatin und Methyl-trihomojasmonsäure) vorgenommen, die nicht zu Jasmonsäure abgebaut werden können. Die Strukturanaloga lösten wie 12-Oxo-Phytodiensäure die Rankenspiralisierung in *Bryonia dioica* aus. Somit ist die Rankenspiralisierung auf 12-Oxo-Phytodiensäure selbst und nicht auf Jasmonsäure zurückzuführen (Blechert *et al.*, 1995; Weiler *et al.*, 1994).

Die Untersuchungen gaben Grund zu der Annahme, daß 12-Oxo-Phytodiensäure und nicht Jasmonsäure der eigentliche Signalstoff aus dem Okatadekanoidweg ist und Jasmonsäure lediglich ein Abbauprodukt mit einer biologischen Restaktivität darstellt. Diese Hypothese wurde jedoch widerlegt, da für die Pollenreifung Jasmonsäure und nicht 12-Oxo-Phytodiensäure verantwortlich ist: männliche Pflanzen einer *Arabidopsis thaliana*-Mutante, denen die 12-Oxo-Phytodiensäurereduktase fehlt, sind steril, es sei denn, man führt ihnen exogen Jasmonsäure während der Pollenreifung zu (Stintzi und Browse, 2000).

I.3.6 Signaltransduktion

Jasmonate induzieren über Genaktivierung die Biosynthese von Abwehrproteinen, Enzymen des Oktadekanoidweges oder von Proteolyse-assoziierten Proteinen (Bergey *et al.*, 1996). Über den genauen Mechanismus der Genaktivierung ist noch wenig bekannt. So ist es denkbar, daß Jasmonate direkt an Transkriptionsfaktoren binden oder daß sie ihre Wirkungen

über Rezeptoren vermitteln. Jasmonatrezeptoren konnten bislang weder charakterisiert noch kloniert werden.

Jasmonat-insensitive Pflanzen bieten, neben dem klassischen Weg der Identifizierung bzw. Reinigung möglicher Rezeptoren aufgrund ihrer Affinität zu Jasmonsäure, eine alternative Möglichkeit die Signaltransduktion der Jasmonate aufzuklären. Der Ansatz, die Signaltransduktion mit Hilfe von Mutanten aufzuklären scheint erfolgversprechender: mit *coil* wurde eine *Arabidopsis thaliana*-Mutante gefunden, die insensitiv gegenüber Jasmonsäure und Coronatin ist (siehe I.3.4). Die Mutante ist sensitiv gegenüber Pathogenen, besitzt einen Defekt in wund-induzierten Reaktionen und ihre männlichen Blütenteile sind steril. Dies bedeutet, daß ein der Jasmonatbiosynthese nachgeschalteter Schritt defekt ist. Das *coil*-Genprodukt ist ein Protein, das Repressorproteine mit Ubiquitin markiert und damit zum Abbau in Proteosomen freigibt (Creelman, 1998; Xie *et al.*, 1998). So wurde erstmals ein Protein identifiziert, das sich in der Jasmonatkaskade hinter der Biosynthese der Jasmonsäure befindet und für die Übertragung des Jasmonatsignals essentiell ist. Jedoch ist nicht geklärt wie dieses Protein in die Signalübertragung involviert ist.

I.4 Phytoprostane: Prostaglandin-ähnliche Verbindungen in Pflanzen

Seit der Entdeckung der Isoprostane im Tier (Morrow *et al.*, 1990a) weiß man, daß Prostaglandin-analoga Verbindungen aus mindestens dreifach ungesättigten Fettsäuren *in vivo* entstehen können. 1976 zeigte Pryor, daß durch Oxidation von Methylilinolenat Endoperoxide mit dem PGG-Ringsystem *in vitro* gebildet werden können (Pryor *et al.*, 1976). Er formulierte einen Reaktionsmechanismus, den Endoperoxidmechanismus (Abb. 13), nach dem diese Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen entstehen können. Allerdings gelang es bis in die 80iger Jahre nicht, reine Isomere dieser Verbindungen zu erhalten (O'Connor *et al.*, 1981; O'Connor *et al.*, 1984). Die Entdeckung Prostaglandin-ähnlicher Verbindungen wurde als ein Kuriosum der Fettsäurechemie betrachtet und rief erst mit der Identifizierung von Isoprostanen im Blutplasma erneutes Interesse hervor (Morrow *et al.*, 1990a).

Linolensäure (C18:3) ist in Pflanzen die quantitativ bedeutsamste dreifach ungesättigte Fettsäure. Sie kann theoretisch zu Isoprostan-ähnlichen Verbindungen der Typen I und II oxidieren (siehe I.2.2 und I.4.1), die im Vergleich zu den C20-analogen Isoprostanen aus Arachidonsäure um zwei Methylengruppen kürzer sind und deswegen zunächst als Dinor-Isoprostane bezeichnet wurden (Mueller, 1998).

1998 konnten in unserem Labor zum ersten mal Dinor-Isoprostane E₁ in Pflanzen nachgewiesen werden (Parchmann und Mueller, 1998). Um Verwechslungen mit Dinor-Isoprostanen, die durch β -Oxidation von Isoprostanen im tierischen Organismus entstehen, zu vermeiden, schlugen wir die Benennung Phytoprostane für die aus α -Linolensäure entstandenen Dinor-Isoprostane vor (Imbusch und Mueller, 2000). In Anlehnung an die Prostaglandin-Nomenklatur kennzeichnet der Buchstabe hinter der Abkürzung PP (für Phytoprostane) die Substitution des Cyclopentanringes und der numerische Index die Anzahl der Doppelbindungen in der Seitenkette.

I.4.1 Hypothetische Synthesemechanismen der Phytoprostane

Bei Betrachtung der Synthese von Isoprostanen durch Radikal-katalysierte Oxidation von Arachidonsäure ist festzustellen, daß für die Bildung eines zyklischen Fettsäurederivates nur ein Strukturelement, nämlich eine 1,4,7-Oktatrieneinheit, notwendig ist. Die Substituenten dieser Trieneinheit sind für den Synthesemechanismus nicht relevant (Abb. 13). Die mögliche Synthese von PGG₂-ähnlichen Verbindungen, Phytoprostanen G₁ (PPG₁), aus α -Linolensäure über den Endoperoxid- und den Dioxetanmechanismus (siehe I.2.2.1 und I.2.2.2) ist in Abbildung 14 dargestellt. Dabei entstehen zwei regioisomere Strukturen (jeweils aus 16 Isomeren bestehend), die nach der Nomenklatur der Isoprostane als Typ I und II bezeichnet werden (siehe I.2.1.5).

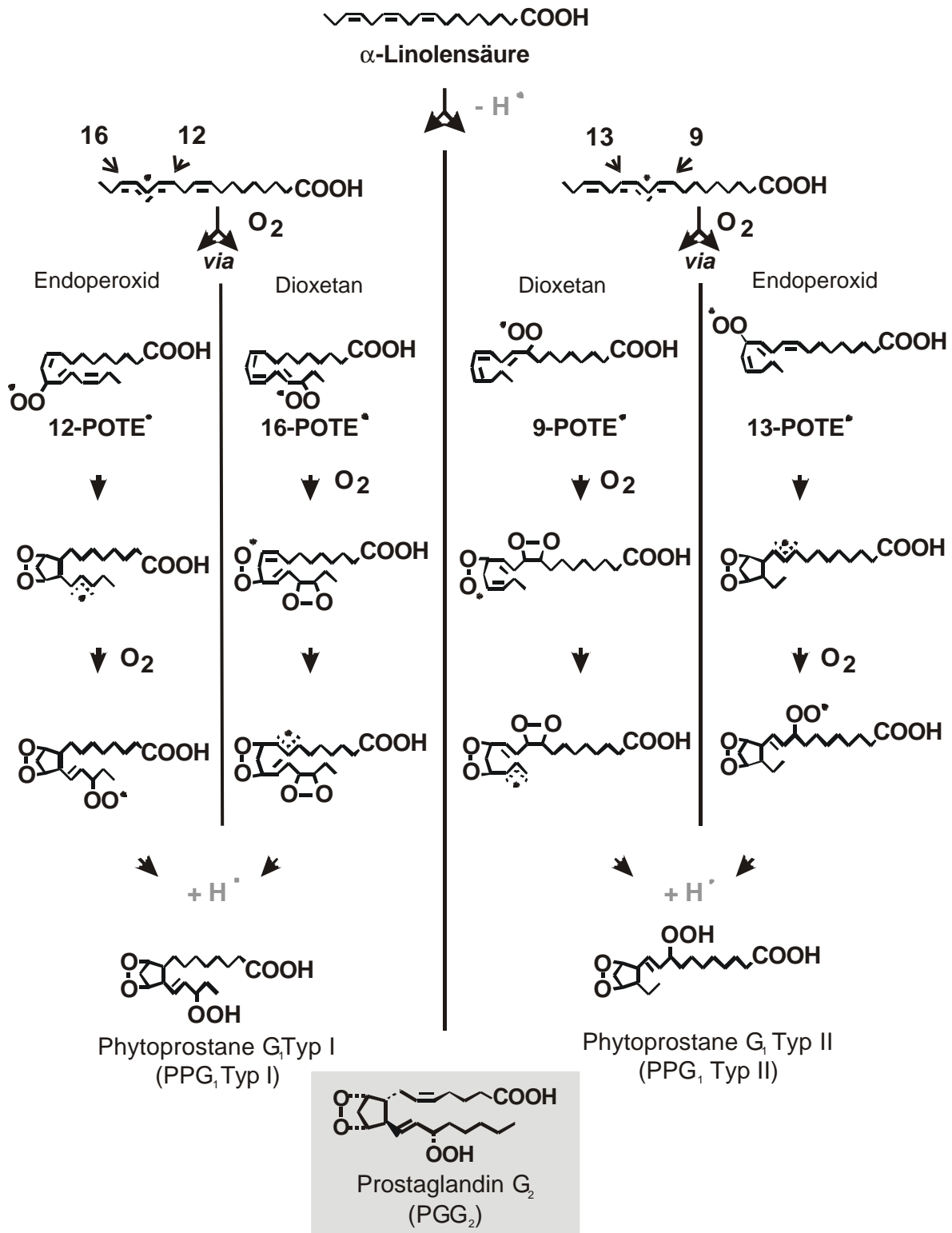


Abb. 13: Postulierte Synthesemechanismen der Phytoprostane G_1 (PPG_1) nach dem Endoperoxid- und Dioxetanmechanismus. In grau unterlegt ist das strukturverwandte PGG_2 dargestellt. (POTE = Peroxytriensäure).

Ausgehend von den Phytoprostanen G₁ (PPG₁) können alle weiteren Phytoprostanringstrukturen auf nicht-enzymatischem Wege gebildet werden (Abb. 14) (Mueller, 1998):

- die Reduktion der Hydroperoxidgruppe der Seitenkette führt zu den Phytoprostanen H₁ (PPH₁)
- die Reduktion der PPG₁ führt zu den Phytoprostanen F₁ (PPF₁)
- durch Umlagerung und Reduktion der PPG₁ entstehen Phytoprostane E₁ (PPE₁) und D₁ (PPD₁)
- aus PPE₁ können durch Dehydratisierung Phytoprostane A₁ (PPA₁) gebildet werden und durch anschließende Isomerisierung Phytoprostane B₁ (PPB₁)
- aus PPD₁ können durch Dehydratisierung Phytoprostane J₁ (PPJ₁) entstehen.

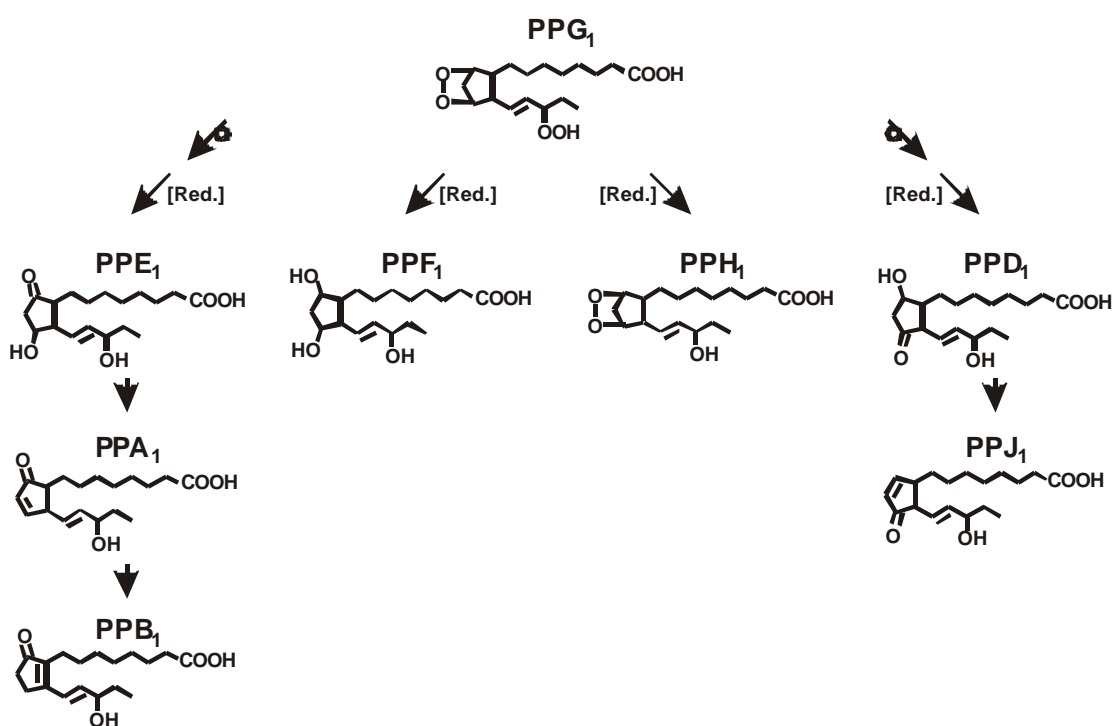


Abb. 14: Umwandlung der PPG₁ Typ I in andere Phytoprostan-Klassen.

I.4.2 Phytoprostane E₁ in Pflanzen

PPE₁ wurden erstmals 1998 in Pflanzen identifiziert, wobei gezeigt werden konnte, daß zwei regioisomere Verbindungen existieren (Parchmann und Mueller, 1998). Jedes dieser Regioisomere besitzt vier Chiralitätszentren und damit ergibt sich eine Anzahl von 16 Isomeren pro Regioisomer. Diese Anzahl an Isomeren erschwerte die Analytik, da bislang keine analytische Daten zu PPE₁ vorlagen. Durch eine klassische Reaktion der Prostaglandinchemie, die alkalische Dehydratisierung der E-Ringverbindungen zu B-Ringverbindungen, konnte die Zahl der Chiralitätszentren von vier auf eines reduziert werden. Somit lagen nach der Umsetzung zu PPB₁ zwei racemische Regioisomere vor, die nur noch

an C16 (Typ I) bzw. C9 (Typ II) ein Chiralitätszentrum aufwiesen (Abb. 15) (Parchmann und Mueller, 1998).

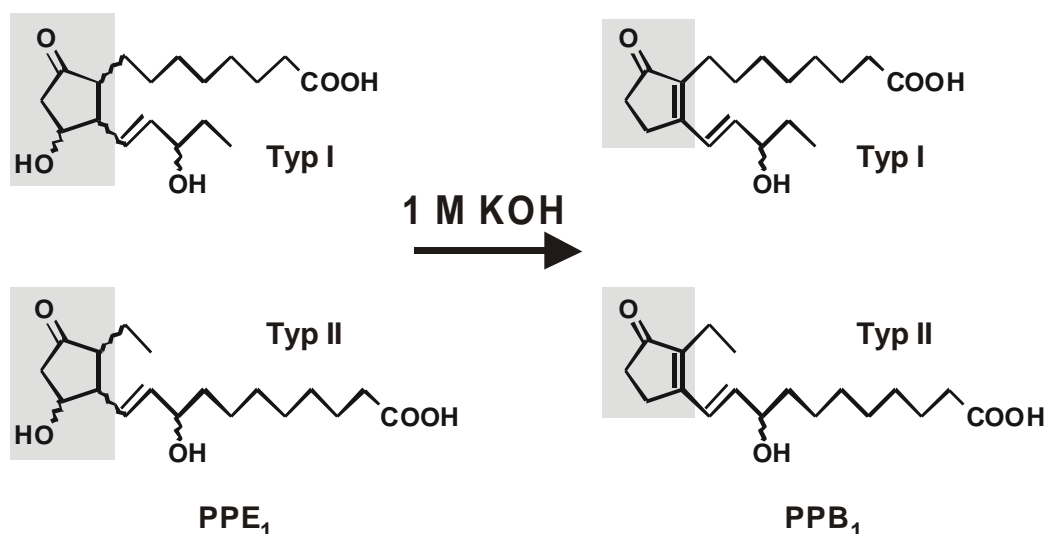


Abb. 15: Umsetzung der PPE₁ zu PPB₁ durch alkalische Dehydratisierung.

Diese Vereinfachung machte es möglich aus einer Vielzahl von Autoxidationsprodukten eines Linolensäureautoxidationsansatzes zwei racemische PPB₁-Regioisomere über RP-HPLC zu isolieren. Die Struktur der Verbindungen konnte anschließend über HR-MS und NMR bestimmt werden (Parchmann und Mueller, 1998; Parchmann, 1999). Ebenfalls führte diese Vereinfachung zu einer genauen Quantifizierungsmöglichkeit der PPE₁ bzw. PPB₁ über GC-NICI-MS, da auch hier das Chromatogramm einer Peakfamilie aus theoretisch 32 Verbindungen auf zwei voneinander separierte Peaks reduziert wurde. Mit Hilfe dieser Detektionsmethode konnten PPE₁ erstmals eindeutig in pflanzlichen Zellkulturen und in Teedrogen nachgewiesen und quantifiziert werden. Für PPB₁ konnte gezeigt werden, daß sie in pflanzlichen Zellkulturen nicht vorkommen, jedoch ihre Konzentration in Teedrogenmaterial annähernd der der PPE₁ entspricht (Parchmann und Mueller, 1998).

Die Isolierung und Charakterisierung der PPB₁ schaffte die Voraussetzung für die Isolierung und Charakterisierung weiterer Phytoprostane. So gelang es reine PPE₁-Regioisomere zu erhalten, die durch chemische Reaktionen in PPA₁ und PPF₁ umgesetzt wurden, so daß auch für diese Substanzen erste analytische Daten zugänglich waren.

I.4.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie unter I.4.1 beschrieben, können PPF₁ durch Radikal-katalysierte Oxidation von α -Linolensäure entstehen. Im Gegensatz zu E-Ringverbindungen sind F-Ringverbindungen

chemisch stabil. Daher werden iPF_2 bevorzugt als Marker für Lipidperoxidation in tierischen Geweben herangezogen (siehe I.2.3.3). iPF_2 kommen in pflanzlichen Geweben nicht vor. Daher sollte mit dem Nachweis von PPF_1 *in vivo* ein Äquivalent zu iPF_2 in Pflanzen gefunden werden.

Zu Beginn der Arbeit sollten PPF_1 ausgehend von α -Linolensäure durch Autoxidation im Milligramm-Maßstab synthetisiert werden. Das PPF_1 -Autoxidationsgemisch sollte weiter aufgereinigt werden, um reine Isomere zu isolieren, die anschließend mittels spektroskopischer Methoden charakterisiert werden sollten.

Das primäre Ziel war es PPF_1 in pflanzlichem Material nachzuweisen. Für den Nachweis mußte eine Methode gewählt werden, die eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist, weswegen die Detektion im NICI-Modus der MS gewählt wurde. Diese Methodik erfordert einen internen Standard, der idealerweise eine isotopenmarkierte Verbindung der nachzuweisenden Substanz ist. Daher sollten isotopenmarkierte PPF_1 synthetisiert werden, die als interner Standard eingesetzt werden sollten. Die analytischen Daten, sowie die Herstellung von $[^{18}O]_3PPF_1$ sollten dann der Entwicklung und Validierung einer GC-MS-Methode zur Bestimmung von PPF_1 *in vivo* dienen. Mittels dieser Methode sollte das Vorkommen von PPF_1 in Pflanzen überprüft werden. Hierfür sollten Pflanzen systematisch weit entfernter Familien analysiert werden, um zu überprüfen, ob PPF_1 , wie ihr Precursor α -Linolensäure, ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet sind.

Die homologen C20 Verbindungen werden im Tier als Signalstoffe der oxidativen Zellverletzung diskutiert, da sie zum einen bei „oxidativen Stress“ akkumulieren und zum anderen eine biologische Aktivität aufweisen. In Pflanzen kann es ebenfalls zu Situationen kommen, die eine gesteigerte ROS-Konzentration und eine erhöhte Lipidperoxidation aufweisen. Daher stellte sich die Frage, ob PPF_1 unter solchen Bedingungen in pflanzlichen Zellen akkumulieren. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte die PPF_1 -Konzentration in Zellsuspensionskulturen, die oxidativ geschädigt werden sollten, vermessen werden. In weiteren Versuchen sollte dann überprüft werden, ob PPF_1 eine Akkumulation von Phytoalexinen in Zellsuspensionskulturen induzieren.

II. Material

II.1 Pflanzenmaterial

II.1.1 Zellsuspensionskulturen

Die verwendeten pflanzlichen Zellsuspensionskulturen stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Kultivierung der Zellsuspensionskulturen erfolgte bei 24°C im diffusen Dauerlicht (650 lux) auf Rotationsschüttlern (Fa. New Brunswick Scientific) bei 100 rpm.

Zur Subkultivierung wurden nach sieben Tagen 150 ml Inokulum in 250 ml frisches LS-Medium pH 6.0 (Linsmaier und Skoog, 1965) überimpft.

Für alle Untersuchungen wurden die Pflanzenzellen drei Tage vor Beginn des Versuches durch Absaugen über einen Büchnertrichter, der mit einem feinen Nylonnetz ausgelegt war, vom alten Medium abgetrennt und in frisches Medium eingewogen. Die Einwaage betrug 60-80 g Zellen in 250 ml Medium.

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um die Zellkulturen auf mikrobielle Infektionen zu überprüfen, wurde 3-4 Tage nach der Subkultivierung 1 ml Medium entnommen und auf eine LB-Platte (Maniatis *et al.*, 1982) aufgetragen. Diese wurde anschließend drei Tage bei RT und drei Tage bei 37°C inkubiert. Konnten nach dieser Zeit keine Bakterienkolonien oder Pilzhyphen beobachtet werden, so galt die Zellkultur als nicht infiziert.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde ca. 1 g feuchtes Zellmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 10% des Feuchtgewichtes und wurde für jeden Meßpunkt einer Kinetik bestimmt.

II.1.2 Frische Pflanzenorgane

Die verwendeten frischen Pflanzenorgane stammten von Wildsammlungen [*Tilia cordata* (Blüten), *Hypericum perforatum* (Kraut) und *Betula pendula* (Blätter)] oder aus den Gewächshäusern (alle anderen verwendeten frischen Pflanzenorgane) des Lehrstuhles für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. In beiden Fällen unterlagen die Pflanzen einem normalen Tag-Nacht-Zyklus, im Falle der Gewächshauspflanzen aber keinen jahreszeitlichen Einflüssen oder Umweltfaktoren.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde auch hier ca. 1 g frisches Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 15% des Feuchtgewichtes, er wurde für jeden Meßpunkt einer Kinetik bestimmt.

II.1.3 Teedrogen

Die analysierten Teedrogen entstammten der Sammlung des Lehrstuhles für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Sie entsprachen den Anforderungen des DAB 1999 und wurden in pulverisierter Form für die Analysen verwendet.

II.2 Geräte

Gaschromatograph-
Massenspektrometer: Gaschromatograph Varian 3400 (Varian, Darmstadt),
gekoppelt mit einem SSQ 700 Quadrupol-
Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)

HPLC:
-analytisch HPLC- Anlage "LaChrom" (Merk-Hitachi, Darmstadt)
L-7100 Pump
L-7200 Auto Sampler
L-7450 Diode Array Detector
D-7000 Interface

HPLC-Anlage Merk-Hitachi (Darmstadt)
L-6200 Intelligent Pump
AS-4000 Intelligent Auto Sampler
L-4250 UV-VIS Detector
D-2500 Chromato-Integrator

-präparativ HPLC-Anlage Merk-Hitachi (Darmstadt)
L-6250 Intelligent Pump
L-4000A UV Detector
D-2000 Chromato-Integrator

Photometer: Perkin-Elmer 551S-Spektralphotometer (Perkin-Elmer,
Überlingen)

Precision Microplate Reader E_{max} (Molecular Devices, USA)

Radioaktivitätsmessung: Flüssigszintillationszähler LS 6000TA (Beckmann,
München) und Betazint bF 8000 (Berthold, Wildbad)

Dünnschicht-Scanner Automatic TLC-Linear Analyzer

II. Material

| | |
|----------------------------|--|
| | Tracemaster 20 (Berthold, Wildbad) |
| Mikroskopie: | Axioskop (Carl Zeiss, Jena) |
| Homogenisieren: | Ultra-Turrax T20 basic mit Dispergierwerkzeug S25N-10G (Janke & Kunkel, Staufen) |
| Rühren/Durchmischen: | Überkopfschüttler (Heidolph, Kehlheim) Magnetrührer der IKA-Werke (Janke & Kunkel, Staufen) Vortex (Heidolph, Kelheim) |
| Festphasenextraktion (SPE) | Vakuumbbox für SPE-Säulen (Diagen, Düsseldorf) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim) |
| Zentrifugen: | Kühlzentrifugen Sorvall RC-5B und RC-5C mit SS34- und GSA-Rotoren (DuPont, Bad Homburg) Eppendorf-Tischzentrifuge 5414 (Eppendorf, Hamburg) Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus-Christ, Osterode) |
| Probenkonzentrierung: | Rotavapor R 110 (Büchi, Flawil, CH) |
| Rotationsschüttler: | Rotationsschüttler G53 (New Brunswick Scientific, Nürtingen) Rotationsschüttler, Eigenbau der Universitätswerkstätten Bochum Köttermann 4020-Schüttler für Multiwellschalen (Köttermann, Hänigsen) |
| Autoklaven: | Technomara-Autoklaven (Fedegari, Albuzzano,I) Tischautoklav Typ 23 (Melag, Berlin) |
| Temperieren/Inkubieren: | Thermostatierbare Wasserbäder Julabo EM und Thermomix MM (Braun, Melsungen) -20°C-Gefrierschrank (Bauknecht) -80°C-Gefrierschrank (New Brunswick Scientific, Nürtingen) |

| | |
|------------------|--|
| Messen/Wiegen: | Analysenwaage 2006 MP und Laborwaage 1213 MP (Sartorius, Göttingen) Eppendorf Reference Kolbenhubpipetten (Eppendorf, Hamburg) |
| Sonstige Geräte: | Laminar-Flow-Box (Prettl) UV-Lampe MinUVIS mit $\lambda = 254$ nm und 356 nm (Desaga, Heidelberg) Ultraschallbad Sonorex TK52 (Bandelin) pH-Meter 766 Calimatic (Knick, Berlin) |

II.3 Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinsheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

$^{18}\text{O}_2$ -Gas (99.1 % ^{18}O) wurde von Isotech (Miamisburg) bezogen.

[5,6,8,9,11,12,14,15- ^3H]PGF₂ (spezifische Aktivität 179.00 Ci/mmol) wurde von NEN (Boston) erworben.

II.4 Verbrauchsmaterialien

Zur Festphasenextraktion wurden Oktadekyl (C18)- und Silica-Phasen von Machery-Nagel (Düren) in 500 g-Glassäulen eingesetzt, während für die Säulen-chromatographie Silicagel 60 (Partikelgröße 63-100 μm) von Merck (Darmstadt) verwendet wurde. DC-Kieselgelfolien Polygram SIL G/ UV 254 mit Fluoreszenz-indikator, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, stammten von Machery-Nagel (Düren).

III. Methoden

III.1 Reinigung der Linolensäure

Linolensäure (5 g) wurde in Hexan/Ether (9:1, v/v) gelöst, auf eine Silicagelsäule (10 g Silicagel 60, Partikelgröße 63-100 μm) geladen und mit 200 ml Hexan/Ether (9:1, v/v) eluiert. Damit wurden bereits vorhandene oxygenierte Fettsäuren abgetrennt. Das Eluat wurde anschließend an einem Rotationsverdampfer eingengt und die verbleibende Linolensäure zur Herstellung von Phytoprostanen eingesetzt.

III.2 Derivatisierung freier Fettsäuren und deren Derivate

In der vorliegenden Arbeit wurden Fettsäurederivate gaschromatographisch getrennt und mittels Massenspektrometrie (MS) im Elektronenstoßionisationsmodus (engl.: electron impact, EI) bzw. im negativen chemischen Ionisationsmodus (engl.: negative ion chemical ionization, NICI) bestimmt. Diese Analytik erforderte eine Veresterung der Säuregruppen zum Methyl- bzw. Pentafluorbenzylester und im Falle hydroxylierter Fettsäuren eine Umsetzung der Hydroxylgruppen zum Trimethylsilylether.

III.2.1 Herstellung von Diazomethan

Zur Methylierung von Fettsäurederivaten wurde die Umsetzung mit Diazomethan gewählt. Diazomethan selbst ist ein leichtflüchtiges, hochreaktives Gas, das durch Hydrolyse von Diazald gewonnen wurde.

Hierfür wurden 5.3 g Diazald (Aldrich, Steinheim) in einem 100 ml-Rundkolben eingewogen und mit 30 ml Diethylether gelöst. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol und 2 g KOH, gelöst in 3.2 ml Wasser, wurde das Reaktionsgemisch unter ständigem Rühren leicht erhitzt. Das entstandene Diazomethan wurde über eine Destillationsbrücke in einem gekühlten 100 ml-Spitzkolben, in dem 3 ml Ether vorgelegt wurden, überdestilliert. Nach Beendigung der Destillation wurde zu dem verbleibenden Reaktionsansatz Essigsäure hinzugefügt, um das restliche Reagenz zu Methylacetat umzusetzen. So konnte die Reaktion gestoppt werden und noch vorhandenes Diazomethan wurde abreagiert.

III.2.2 Methylierung freier Fettsäurederivate mit Diazomethan

Die zu methylierenden Fettsäurederivate wurden in 30 μl Methanol angelöst und mit Diazomethan bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde dann

weitere 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt.

III.2.3 Herstellung von Pentafluorbenzylestern

Eine der empfindlichsten Nachweismethoden von Fettsäuren und ihren Derivaten ist die Detektion im NICI-Modus des Massenspektrometers. Dafür müssen Fettsäuren mit einer Gruppe derivatisiert werden, die einen hohen Elektroneneinfangsquerschnitt besitzt.

Hierfür wurde die Derivatisierung mit α -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol (PFB-Br) gewählt, eine Methode, die in der Prostaglandinchemie etabliert ist (Morrow *et al.*, 1990b). Phytoprostane F₁ (PPF₁), die als freie Säuren vorlagen, wurden in 200 μ l Chloroform gelöst und mit 10 μ l *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) und 10 μ l PFB-Br versetzt. Der Reaktionsansatz wurde dann 30 min bei 60°C inkubiert, anschließend unter einem Stickstoffstrom getrocknet und über SiOH-Festphasenextraktion gereinigt.

III.2.4 Herstellung von Trimethylsilylethern

PPF₁ besitzen drei Hydroxylgruppen, die ebenfalls derivatisiert werden müssen, um die Phytoprostane über Gaschromatographie trennen zu können. Die veresterten Phytoprostane wurden in 200 μ l Chloroform gelöst, mit 50 μ l *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) versetzt und bei 40°C 30 min derivatisiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bis zur Trockene eingengt.

III.2.5 Herstellung von 4'-Bromoacetophenonestern

PPF₁ und PGF_{1 α} wurden in 200 μ l Chloroform gelöst, mit 10 μ l DIEA und 10 μ l 2,4'-Dibromoacetophenonreagenz (10 mg/ml 2,4'-Dibromoacetophenon in Acetonitril) versetzt. Die Veresterung erfolgte 90 min bei 40°C im Wasserbad. Anschließend wurde der Reaktionsansatz unter einem Stickstoffstrom getrocknet und über SiOH-Festphasenextraktion aufgereinigt.

III.3 Reduktion mit Natriumborhydrid

Zur Umsetzung der Phytoprostane E₁ (PPE₁) in PPF₁ wurde die Ketogruppe der PPE₁ mittels Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert. Hierzu wurden die PPE₁ in 300 μ l Methanol gelöst und auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Natriumborhydrid wurde die Mischung 10 min auf Eis und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz

mit Wasser versetzt bis die Methanolkonzentration auf unter 10% sank. Das Wasser wurde dabei tropfenweise und auf Eis hinzugefügt, um die entstehende Wärme abzufangen und ein Übersäumen der Probe aufgrund der Wasserstoffentwicklung zu vermeiden. Die entstandenen PPF₁ wurden nach Ansäuern des Reaktionsansatzes auf einen pH-Wert von 3-4 mit 1 M Zitronensäure mit Ether extrahiert. Der Etherextrakt wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und anschließend für die GC-MS-Analytik derivatisiert.

III.4 Katalytische Hydrierung

Mit Hilfe der katalytischen Hydrierung wurden Doppelbindungen zu Einfachbindungen reduziert. Dafür wurde die Probe in 1 ml Methanol gelöst, eine Spatelspitze Adams Katalysator [Pt(IV)O₂] hinzugefügt und Wasserstoff für 5 min durch die Lösung geleitet.

Anschließend wurde der Katalysator über einen Glasfaserfilter abgetrennt und die Lösung unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde dann weiter gereinigt oder direkt derivatisiert.

III.5 Versuche mit pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Pflanzliche Zellsuspensionskulturen dienten als Modellsystem, um die Auswirkung von chemischen Reizen auf pflanzliche Zellen zu verfolgen.

III.5.1 Elicitierung von pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

80 g Zellen (FG) der entsprechenden pflanzlichen Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durch Filtration über einen Büchnertrichter geerntet und in einem 1 l-Erlenmeyerkolben, der 250 ml LS-Medium enthielt, eingewogen. In Fernbachkolben hingegen wurden 200 g Zellen (FG) in 800 ml frisches LS-Medium gegeben. Im Fall von *Eschscholzia californica* und *Nicotiana tabacum* wurde nach drei Tagen Wachstum, im Fall von *Crotalaria cobalticola* nach vier Tagen Wachstum der Elicitor zugesetzt und der Verlauf der Phytoprostanbildung verfolgt. Die Elicitoren wurden als methanolische Lösung zugesetzt oder als wässrige Lösung nach Sterilfiltration. Die Methanolkonzentration wurde unter 2% gehalten und den parallel angesetzten Kontrollkulturen wurde die entsprechende Menge Methanol zugefügt.

Zu den festgelegten Zeitpunkten einer Kinetik wurde ein Aliquot der jeweiligen Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen. 100 µl der Zellsuspensionskultur wurden mit 100 µl einer 2%igen Trypanblau-Lösung versetzt und durch Auszählen unter dem Mikroskop wurde der Anteil toter Zellen bestimmt. Bei dem restlichen Aliquot wurde das Medium über Vakuumfiltration von den Zellen getrennt, die dann direkt mit flüssigem Stickstoff

eingefroren wurden. Das Trockengewicht wurde für jeden Meßpunkt einer Kinetik bestimmt indem das Zellmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert wurde.

Das eingefrorene Material wurde in der Regel bei -20°C aufbewahrt, wenn die eingefrorenen Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraumes (ca. eine Woche) aufgearbeitet wurden. Bei längerer Lagerung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Der Unterschied in der Lagerung wurde vorgenommen, da Morrow und Roberts die Beobachtung machten, daß lipidhaltige Proben bei einer Aufbewahrung über 6 Monate bei -20°C weiterhin der Autoxidation unterlagen, welche bei einer Lagerung bei -70°C nicht auftrat (Morrow und Roberts, 1994).

III.5.2 PPF₁-Zugabe zu pflanzlichen Zellsuspensionskulturen in Multiwellschalen

Um die Abwehrantwort von pflanzlichen Zellkulturen hinsichtlich ihrer Sekundärstoffproduktion nach Zugabe von PPF₁ zu überprüfen, wurden Tests in 24-Loch-Multiwellschalen etabliert.

III.5.2.1 *Eschscholzia californica*-Testsystem

Nach drei Tagen Wachstum der *Eschscholzia californica*-Zellkulturen wurden 8g Zellen (FG) in 80 ml LS-Medium eingewogen und weitere drei Tage kultiviert. Danach wurde unter sterilen Bedingungen jeweils ein Aliquot von 1 ml in die Näpfe einer 24-Loch-Multiwellschale überführt. In Konzentrationsreihen wurden dann in Methanol gelöste PPF₁ zugegeben. Als Positivkontrolle diente in Methanol gelöste Jasmonsäure und zur Negativkontrolle wurde Methanol zugegeben. Dabei wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Elicitorstammlösung bzw. des reinen Methanols zu einem Napf hinzugefügt, so daß Effekte bedingt durch das Lösungsmittel und dessen Volumen vermieden wurden. Um das Verdunsten von Flüssigkeit aus den Näpfen zu korrigieren, wurden 250 µl autoklaviertes Wasser hinzugefügt. Weitere 3 ml autoklaviertes Wasser wurden in die Napfzwischenräume gegeben. Die Multiwellschalen wurden mit Parafilm verschlossen und drei Tage bei 24°C und Dauerlicht (650 lux) auf einem Multiwellschalenschüttler bei ca. 200 rpm inkubiert.

Die Sekundärstoffproduktion kann bei *Eschscholzia californica* visuell verfolgt werden, da die synthetisierten Benzophenanthridine, z.B. Sanguinarin und Chelirubin, für die rote Farbe des Elicitoransatzes verantwortlich sind (Gundlach *et al.*, 1992). Dies ermöglicht eine photometrische Quantifizierung der Sekundärstoffe nach vorangegangener ethanolischer Extraktion. Hierfür wurde der Inhalt eines Napfes der 24-Loch-Multiwellschale in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Die verbliebenen Zellen wurden sofort mit 1 ml salzsaurem Ethanol [1.8 ml 37% HCl/1 80% (v/v) Ethanol] gemischt und zwei Stunden bei

60°C im Wasserbad extrahiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert. 250 µl des Überstandes wurden abgenommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Extinktion bei 490 nm im Microplate Reader bestimmt.

Mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichkurve konnte der Alkaloidgehalt der Extrakte mit folgender Formel berechnet werden (Gundlach *et al.*, 1992; Schumacher, 1987; Schumacher *et al.*, 1987):

$A_{490} \times 90 = \text{Benzophenanthridine in } \mu\text{g/ ml Zellkultur.}$

III.5.2.2 *Crotalaria cobalticola*-Testsystem

Crotalaria cobalticola-Zellkulturen wurden analog den unter III.5.2.1 beschriebenen *Eschscholzia californica*-Zellkulturen eingesetzt. Jedoch wurden die Zellen bereits nach 36-40 h extrahiert. Im Extrakt war das Flavonoid Isobavachalkon vorhanden, dessen Extinktion bei 367 nm bestimmt wurde. Da der Extrakt weitere Substanzen enthielt, die ebenfalls bei 367 nm absorbieren, wurde der Extrakt über RP-HPLC nach einer Methode von Thoma (unpublizierte Daten) aufgereinigt. Dazu diente eine LiChrospher RP18e-HPLC-Säule (Fa. Knauer, 4 x 250 mm, 10 µm Partikelgröße) als Trennsäule. Als mobiles Laufmittelsystem wurde ein Laufmittelgradient gewählt, der in den ersten fünf Minuten von 0 auf 60% Acetonitril und in weiteren 10 min auf 100% Acetonitril gesteigert wurde (Flußrate 1 ml/min), wobei dem Laufmittel (Wasser bzw. Acetonitril) 0.1% Phosphorsäure zugesetzt war. Isobavachalkon eluierte nach ca. 15 min.

III.5.2.3 *Thalictrum tuberosum*-Testsystem

Thalictrum tuberosum-Zellkulturen wurden nach sieben Tagen Wachstum unter sterilen Bedingungen eingewogen (16 g/80 ml LS-Medium). Nach weiteren fünf Tagen wurden sie, wie unter III.5.2.1 beschrieben, ausplattiert, mit Testlösungen versetzt und vor dem Austrocknen geschützt. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturen aus den Näpfen in Eppendorfgefäße überführt und bei 13 000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml salzsaurem Methanol (1.8 ml 37% HCl/l) für zwei Stunden bei 40°C im Wasserbad extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und direkt über RP-HPLC (LiChrosorb Rp18, 4 x 25 mm, 7 µm Partikelgröße) bei 280 nm analysiert. Das Laufmittelsystem bestand aus Methanol und Wasser, wobei beide Laufmittel mit Hexansulfonsäurereagenz (0.94 g Hexansulfonsäure in 5 ml 0.1 N Phosphorsäure) versetzt waren. Dieses Ionenpaarreagenz dient der Verbesserung der Elutionsprofile der Berberinalkaloide. In den ersten 15 min wurde der Methanolanteil des Laufmittels von 30% auf 60% erhöht, anschließend wurde über weitere 20 min auf 90% gesteigert (Galle *et al.*, 1994). Die Flußrate betrug 1 ml/min.

III.6 Chromatographische Methoden

III.6.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographischen Auftrennungen von Prostaglandinen und Phyto-
prostanen wurden auf Polygram SIL G/ UV₂₅₄ Kieselgelfolien mit Fluoreszenzindikator,
20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm, durchgeführt (Macherey-Nagel, Düren). Dabei fand
folgendes Laufmittelsystem Verwendung:

LM 1 Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 86:14:1:0.8 (v/v)

Nach der Entwicklung des Dünnschicht-Chromatogrammes wurden die Substanzen mittels
folgender Methoden detektiert:

- UV-Löschung bei 254 nm
- Detektion in einer Jodkammer
(Jod sublimiert und lagert sich an Doppelbindungen an, dadurch können ungesättigte
Fettsäuren detektiert werden, die keine UV-Löschung erzeugen.)
- Radio-DC-Scanner im Falle von radioaktiv markierten Substanzen
- Kupferacetat-Sprühreagenz (3% Kupferacetat in 80%iger wäßriger Phosphorsäure) (Hurst *et al.*, 1987) (Dieses Sprühreagenz bildet mit Prostanoiden charakteristisch gefärbte Komplexe, z.B. bildet es mit Prostaglandin F₂ einen violett gefärbten Komplex.)

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über parallel aufgetragene Referenzsubstanzen.

III.6.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction, SPE) diente als schneller
Reinigungsschritt während der Probenaufarbeitung. Die Festphasenextraktion ist eine
Adsorptionschromatographie, wobei die Substanzen über Silicagel(SiOH)-Material nach
Polarität getrennt werden. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um 3 ml-Glassäulen
der Fa. Macherey-Nagel, die jeweils mit 500 mg der stationären Phase gefüllt waren. Die
Chromatographie erfolgte unter leichtem Vakuum an einer Vakuumbox, da so mehrere
Proben parallel aufgereinigt werden konnten.

Die Festphasenextraktionssäulen wurden mehrfach verwendet. Hierfür wurden folgende
Reinigungs- und Regenerationsschritte durchgeführt:

SiOH-SPE 5ml 5% (v/v) 37%ige HCl/ Methanol
 5ml Methanol

Anschließend wurden die SPE-Säulen mit dem Lösungsmittel equilibriert, in dem die Probe aufgetragen wurde. Nach Reinigung und Elution der Probe wurde die Säule wie oben beschrieben regeneriert. Während sich die Probe auf der Säule befand, durfte diese nicht trockenlaufen, da dies zu Veränderungen im Elutionsprofil führen konnte; sollte die Säule jedoch nach dem Regenerieren gelagert werden, wurde sie nach der Methanolspülung mit je 1.5 ml Ether und Hexan gespült und anschließend trocken gesaugt.

III.6.3 Präparative Säulenchromatographie

Die präparative Auftrennung von Linolensäureautoxidations-Gemischen wurde mittels Säulenchromatographie vorgenommen. Dabei wurde eine Glassäule (Durchmesser 3 cm) mit 30 g Kieselgel (Kieselgel 60, 63-100 μm Partikelgröße, Merck) gefüllt. Das Kieselgel wurde mit 200 ml Methanol gewaschen und mit 300 ml Chloroform equilibriert. Der Autoxidationsansatz wurde in Chloroform gelöst und auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 600 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 300 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen, um Reste der Linolensäure, eventuell noch vorhandener Monohydroperoxide und des Triphenylphosphins (siehe IV.3.1) zu eluieren. PPF₁ wurden mit 500 ml Ether/Aceton/Essigsäure (70:30:1, v/v) eluiert.

III.6.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Trennung freier Fettsäuren sowie von Fettsäurederivaten und deren Estern verwendet. Als stationäre Phase wurde Reversed Phased C₁₈-Material eingesetzt, während die mobile Phase nach den entsprechenden Analyten ausgewählt wurde.

III.6.4.1 Trennung von Phytoprostanen F₁

| | |
|---------------|---|
| HPLC- Anlage: | Merck-Hitachi analytisch |
| Trennsäule: | RP18e-LiChrospher 100, Knauer analytische Trennung: 250 x 4 mm, Partikelgröße 5 μm semipräparative Trennung: 250 x 8 mm, Partikelgröße 8 μm präparative Trennung: 250 x 25 mm, Partikelgröße 10 μm |

III. Methoden

| | |
|--------------------|---|
| Laufmittel: | isokratischer Lauf mit Acetonitril/Wasser/Essigsäure (20:80:0.1, v/v) |
| Flußrate: | analytische Trennung: 1 ml/min semipräparative Trennung: 8 ml/min präparative Trennung: 17 ml/min |
| Detektion: | $\lambda = 204 \text{ nm}$ |
| Injektionsvolumen: | 50-500 μl |

III.6.4.2 Trennung der 4'-Bromoacetophenonester von Fettsäurederivaten

| | |
|--------------|--|
| HPLC-Anlage: | Merck-Hitachi analytisch |
| Trennsäule: | RP18e-LiChrospher 100 (250 x 4 mm, 5 μm Partikelgröße, Knauer) |
| Laufmittel: | Laufmittel A: Acetonitril Laufmittel B: Wasser |

Gradient:

| Zeit [min] | LM A [%] | LM B [%] |
|------------|----------|----------|
| 0 | 40 | 60 |
| 15 | 40 | 60 |
| 30 | 60 | 40 |
| 45 | 60 | 40 |

| | |
|--------------------|----------------------------|
| Flußrate: | 1 ml/min |
| Detektion: | $\lambda = 258 \text{ nm}$ |
| Injektionsvolumen: | 100 μl |

III.6.5 Gaschromatographie (GC)

Die Analyse von Proben wurde mit einer gaschromatographischen Trennung über einen Varian 3400-Gaschromatographen (Varian, Darmstadt) durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Optima 5-Säule (25 m x 0.25 mm, Machery-Nagel, Düren). Ihr wurde eine Vorsäule (Methyldesaktivierte Säule, 10 m x 0.25 mm, Machery-Nagel, Düren) vorgeschaltet, um die Lebensdauer der Trennsäule zu erhöhen. Als Trägergas wurde Helium mit einer Fließgeschwindigkeit von 23 cm/s verwendet. Der Injektor (Insert-Liner mit silanisierter Glaswolle gepackt) wurde auf 300°C geheizt und der Split wurde nach 1 min geöffnet. Die Detektion erfolgte mit einem angekoppelten SSQ 700-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen).

Folgende Temperatur-Zeitprogramme wurden zur Analyse von Fettsäurederivaten gewählt:

a) Trennung der Methylester, TMS-Ether der Phytoprostane

| Gesamtzeit [min] | ΔT [°C/min] | Endtemperatur [°C] |
|------------------|---------------------|--------------------|
| 0 | - | 140 |
| 1 | - | 140 |
| 5.8 | 20 | 235 |
| 21 | 1 | 250 |
| 23 | 29 | 300 |
| 28 | - | 300 |

b) Trennung der PFB-Ester, TMS-Ether der Phytoprostane

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

c) Trennung der Methylester von Fettsäuren

| Gesamtzeit [min] | ΔT [°C/min] | Endtemperatur [°C] |
|------------------|---------------------|--------------------|
| 0 | - | 100 |
| 0.5 | - | 100 |
| 3.2 | 30 | 180 |
| 15 | 10 | 300 |
| 18 | - | 300 |

III.7 Radioaktivitätsmessungen

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate bei den Reinigungsschritten erfolgte mittels Tritium-markiertem Prostaglandin $F_{2\alpha}$. Die zu vermessenden Proben wurden in mit Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsgläschen überführt und in einem Flüssigszintillationszähler vermessen. Die Detektion von Derivaten des Tritium-markierten Prostaglandins $F_{2\alpha}$ (z.B. Ester des Prostaglandins $F_{2\alpha}$), die auf Dünnschichtplatten aufgetrennt wurden, erfolgte mit Hilfe eines Radiodünnschicht-Scanners.

III.8 Spektroskopische Methoden

III.8.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance, NMR) wurde von Dr. H. Lerche vom Lehrstuhl für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München an einem JEOL FT NMR Spektrometer Eclipse 400 MHz-Gerät durchgeführt, im Falle der NOE-Einstrahlungsexperimente wurde ein JEOL FT NMR Spektrometer Eclipse 500 MHz-Gerät verwendet.

III.8.2 Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem SSQ 700-Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT, Bremen, vorgenommen. Mit diesem Gerät war die Detektion im Elektronenstoßionisations (EI)-Modus sowie im chemischen Ionisations (CI)-Modus möglich. In der Routineanalytik wurde vorwiegend mit negativer chemischer Ionisation gearbeitet, da durch die Detektion negativer Ionen eine Steigerung der Empfindlichkeit erzielt wurde.

Die Aufnahme von EI-Spektren erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Ionenquellentemperatur: 150°C

Elektronenenergie: 70 eV

Die Aufnahme von positiv- und negativ-CI-Spektren wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ionenquellentemperatur: 150°C

Elektronenenergie: 70 eV

Reaktandgas: Isobutan; Quelldruck $2.0-2.5 \times 10^{-5}$ Torr

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) wurde von Herrn Dr. W. Spahl (Lehrstuhl für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München) an einem MAT 95Q Sektorfeld-Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT, Bremen, durchgeführt. Der Probeneinlaß erfolgte über ein an das Massenspektrometer gekoppelten Gaschromatographen (Varian 3400, Varian, Darmstadt).

Für die Messung wurden die Parameter des Massenspektrometers wie folgt eingestellt:

Ionenquellentemperatur: 250°C

Elektronenenergie: 70 eV.

IV. Ergebnisse

IV.1 Isoprostane in niederen Pflanzen

In höheren Pflanzen können Prostaglandine und Isoprostane nicht synthetisiert werden, da diesen Organismen Arachidonsäure als Substrat beider Synthesen fehlt. In niederen Pflanzen hingegen, z.B. einigen Moosen und Farnen, kann Arachidonsäure in einer Konzentration von bis zu 5-6% des Trockengewichtes (oder bis zu 40% des Gesamtfettsäuregehaltes) vorkommen. Um zu überprüfen, ob Isoprostane in niederen Pflanzen durch Radikal-katalysierte Autoxidation von Arachidonsäure entstehen können, wurde *Marchantia polymorpha*, ein Lebermoos, analysiert. Bei der Autoxidation von Arachidonsäure entsteht ein komplexes Isoprostan F₂-Gemisch aus theoretisch 64 Isomeren, welche über GC nur teilweise zu trennen sind. Um die Zusammensetzung der Isoprostane F₂ (iPF₂) aus *Marchantia polymorpha* mit der Zusammensetzung von iPF₂ zu vergleichen, die aus reiner Arachidonsäure *in vitro* entstanden sind, wurden letztere in einem weiteren Versuch autoxydiert und analysiert.

IV.1.1 Autoxidation von Arachidonsäure

100 mg Arachidonsäure wurden in 1 ml Methanol/Wasser (1:1, v/v) für 24 h bei RT gerührt. Die Autoxidation wurde durch Zugabe von 100 mg TPP gestoppt und der Reaktionsansatz für weitere 15 min gerührt. Nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit 1 M Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 und Verdünnen auf 10 ml wurden die Isoprostane mit Ether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in Chloroform rekonstituiert. Der Extrakt wurde auf eine 500 mg-SiOH-SPE-Säule aufgetragen, mit 3 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 6 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. iPF₂ wurden mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockene unter einem Stickstoffstrom eingeblasen und in 1 ml Chloroform aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde mit [D₄]PGF_{2α} als internem Standard versetzt. Anschließend wurden die im Aliquot enthaltenen Isoprostane und [D₄]PGF_{2α} zu Pentafluorbenzyl(PFB)estern (siehe III.2.3) und Trimethylsilyl(TMS)ethern (siehe III.2.4) umgesetzt. Vor der GC-NICI-MS-Analyse (siehe III.6.5) wurde der Reaktionsansatz über SiOH-SPE gereinigt. Dafür wurde der erhaltene Rückstand in 1 ml Hexan rekonstituiert, auf eine mit Hexan equilibrierte SiOH-SPE-Säule aufgetragen und direkt mit Hexan/Ether (2:1, v/v) eluiert. Anschließend erfolgte die GC-MS-Analyse wie unter III.6.5 beschrieben.

IV.1.2 Autoxidation von *Marchantia polymorpha*-Zellkulturen

Frische Zellen einer Suspensionskultur von *Marchantia polymorpha* wurden durch Filtration über einen Büchnertrichter vom Medium getrennt. Anschließend wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff eingefroren. 10 g (FG) des Pflanzenmaterials wurden entnommen, in 20 ml gesättigter NaCl-Lösung suspendiert, die 0.05% (w/v) BHT, 20 mg TPP und 200 µl 1 M Zitronensäure enthielt, und mit [D₄]PGF_{2α} als internem Standard versetzt. Die Temperatur der Lösungen betrug 4°C, um ein schnelles Auftauen des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Nach Zusatz von 20 ml Ether wurde der Ansatz für 3 min mit einem Ultraturrax (24 000 rpm) homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend bei 2900 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Etherphase abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 3 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 6 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. Anschließend wurden die Isoprostane und der interne Standard mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockene unter einem Stickstoffstrom eingedampft und zu PFB-Estern (siehe III.2.3) und TMS-Ethern (siehe III.2.4) umgesetzt. Vor der GC-NICI-MS-Analyse (siehe III.6.5) wurde der Reaktionsansatz über SiOH-SPE gereinigt. Dafür wurde der erhaltene Rückstand in 1 ml Hexan rekonstituiert, auf eine mit Hexan equilibrierte SiOH-SPE-Säule aufgetragen und direkt mit Hexan/Ether (2:1, v/v) eluiert. Anschließend erfolgte die GC-MS-Analyse wie unter III.6.5 beschrieben.

In den Zellen der frischen *Marchantia polymorpha*-Zellkultur konnten keine iPF₂ oberhalb der Bestimmungsgrenze von 100 ng detektiert werden. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Lipidperoxidation durch Einfrieren/Auftauen forciert. Hierfür wurde das frische Zellmaterial mit flüssigem Stickstoff eingefroren, bei RT aufgetaut und insgesamt 3 Tage bei RT stehengelassen. Die Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und die Aufarbeitung der Zellen für die GC-NICI-MS-Analyse wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Das Ergebnis der Autoxidation von Arachidonsäure und *Marchantia polymorpha* nach Einfrieren/Auftauen ist in Abbildung 16 illustriert:

Chromatogramm A zeigt das Ergebnis der Aufarbeitung von Arachidonsäure. Bei *m/z* 569 ist ein Peakmuster zu erkennen, welches für iPF₂ charakteristisch ist (Morrow *et al.*, 1990a). Dieses Peakmuster ist im Chromatogramm B ebenfalls bei *m/z* 569 wiederzufinden, welches das Ergebnis der Aufarbeitung von *Marchantia polymorpha* darstellt. Zum Vergleich wurden in einem separaten Ansatz authentisches PGF_{2α} und iPF_{2α}-III aufgearbeitet (Chromatogramm C, *m/z* 569), die ebenso mit [D₄]PGF_{2α} als internem Standard versetzt wurden. Der interne Standard, [D₄]PGF_{2α}, ist im Chromatogramm D bei *m/z* 573 dargestellt.

Die Peaks der Chromatogramme A und B stellen eine Substanzfamilie dar, die bezüglich des Molekulargewichtes und der Retentionszeit eine große Übereinstimmung mit $iPF_{2\alpha}$ -III und $PGF_{2\alpha}$ zeigen.

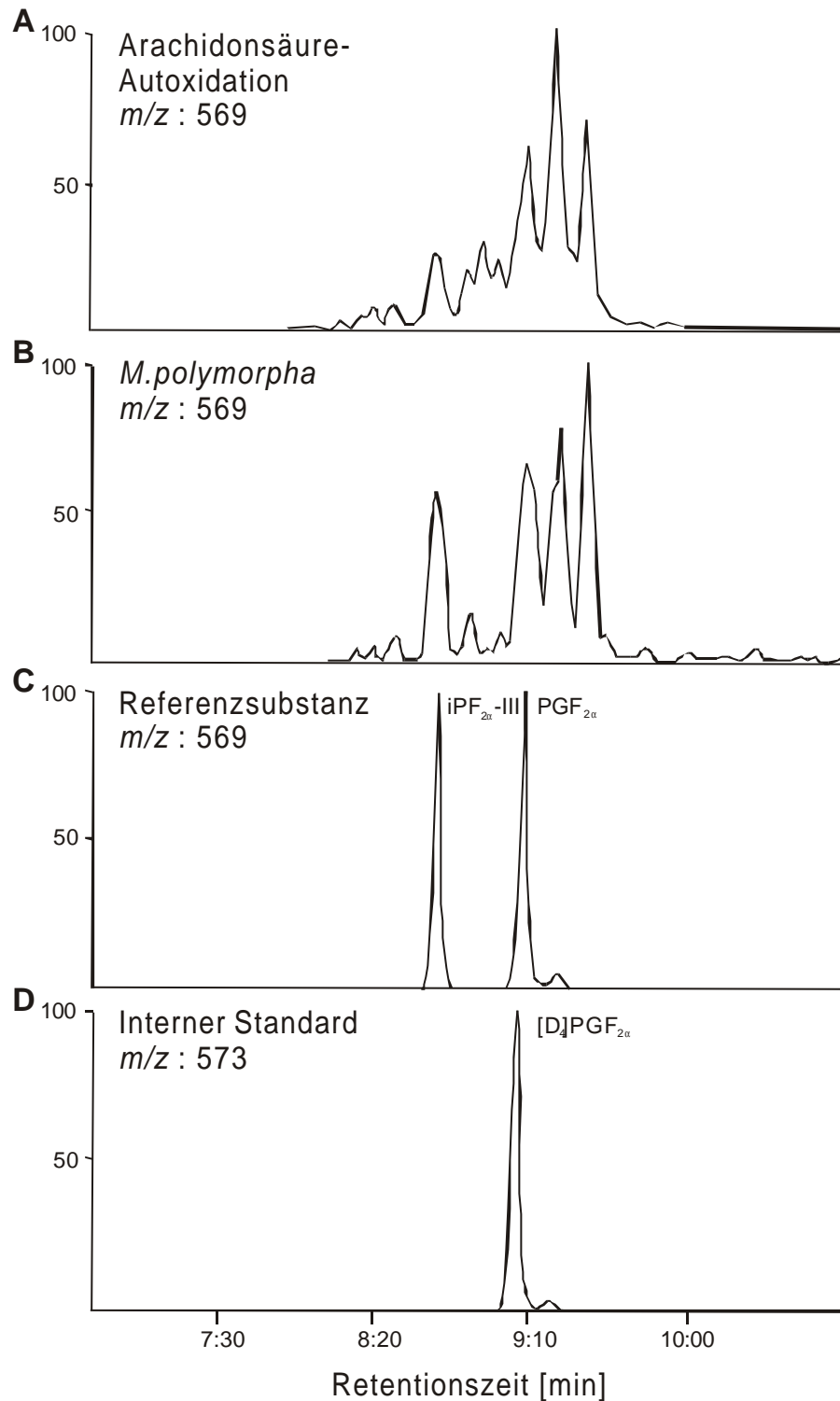


Abb. 16: GC-NICI-MS-Analyse: $iPF_{2\alpha}$, gewonnen aus der Autoxidation von Arachidonsäure (theoretisch 64 Isomere) (**A**); $iPF_{2\alpha}$, gewonnen aus der Autoxidation von Pflanzenmaterial von *M. polymorpha* (15.4 $\mu\text{g/g}$ TG) (**B**); Referenzsubstanzen: $iPF_{2\alpha}$ -III und $PGF_{2\alpha}$ (**C**); Interner Standard: $[D_4]PGF_{2\alpha}$ (**D**).

IV.2 Herstellung und analytische Charakterisierung von PPF₁ Typ I und II

Parchmann und Mueller konnten zeigen, daß in höheren Pflanzen Prostaglandin E-ähnliche Verbindungen (PPE₁) aus α -Linolensäure gebildet werden (Parchmann und Mueller, 1998). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Prostaglandin F-ähnliche Verbindungen (PPF₁) in Pflanzen nachzuweisen. Am Anfang der Arbeiten lagen noch keinerlei analytische Daten zu PPF₁ vor, zu deren Erstellung reine Isomere der PPF₁ benötigt werden. Die Autoxidation von α -Linolensäure liefert jedoch ein komplexes Gemisch von PPF₁, welches theoretisch aus 32 Isomeren besteht. Die Isolierung reiner Isomere aus einem solchen Gemisch erfordert eine aufwendige Reinigung, die für erste analytische Daten durch Synthese von PPF₁-Regioisomeren Typ I bzw. II durch Reduktion von PPE₁ Typ I bzw. II umgangen wurde.

Parchmann ist es gelungen, eine Mischung von PPE₁ durch Linolensäure-Autoxidation in Methanol/Wasser (1:1, v/v) und anschließender Säulenchromatographie zu erhalten (Parchmann und Mueller, 1998). Eine weitere Aufreinigung der PPE₁ über RP-HPLC (LiChrospher RP18e, 5 μ m Porengröße, 10 x 250 mm, Merck) wurde vorgenommen, wobei ein isokratisches Laufmittelsystem (Acetonitril/Methanol/Wasser/Essigsäure, 16.5:19.25:64.25:0.01, v/v, Flußrate: 4,5 ml/min, Detektion: 204 nm) verwendet wurde. Das Eluat wurde fraktioniert, mit dem fünffachen Volumen an Wasser verdünnt und anschließend auf eine C18-SPE-Säule aufgetragen. Die PPE₁ wurden mit 3 ml Methanol von der Säule eluiert. Ein Aliquot des Eluates wurde entnommen, die darin enthaltenen PPE₁ wurden zu Methylestern-Methyloxim-TMS-Ethern umgesetzt und über GC-EI-MS vermessen, um die Regioisomere der PPE₁ zu bestimmen (Parchmann und Mueller, 1998). In Abbildung 17 sind die EI-Massenspektren der Derivate der PPE₁ Typ I und II dargestellt. So gewonnene reine Regioisomere der PPE₁ Typ I bzw. II wurden mit Methanol/NaBH₄ versetzt und zu PPF₁ Typ I bzw. II reduziert (siehe III.3). Anschließend wurden die PPF₁ zu Methylester-TMS-Ethern derivatisiert und mittels GC-EI-MS analysiert (Abb. 17).

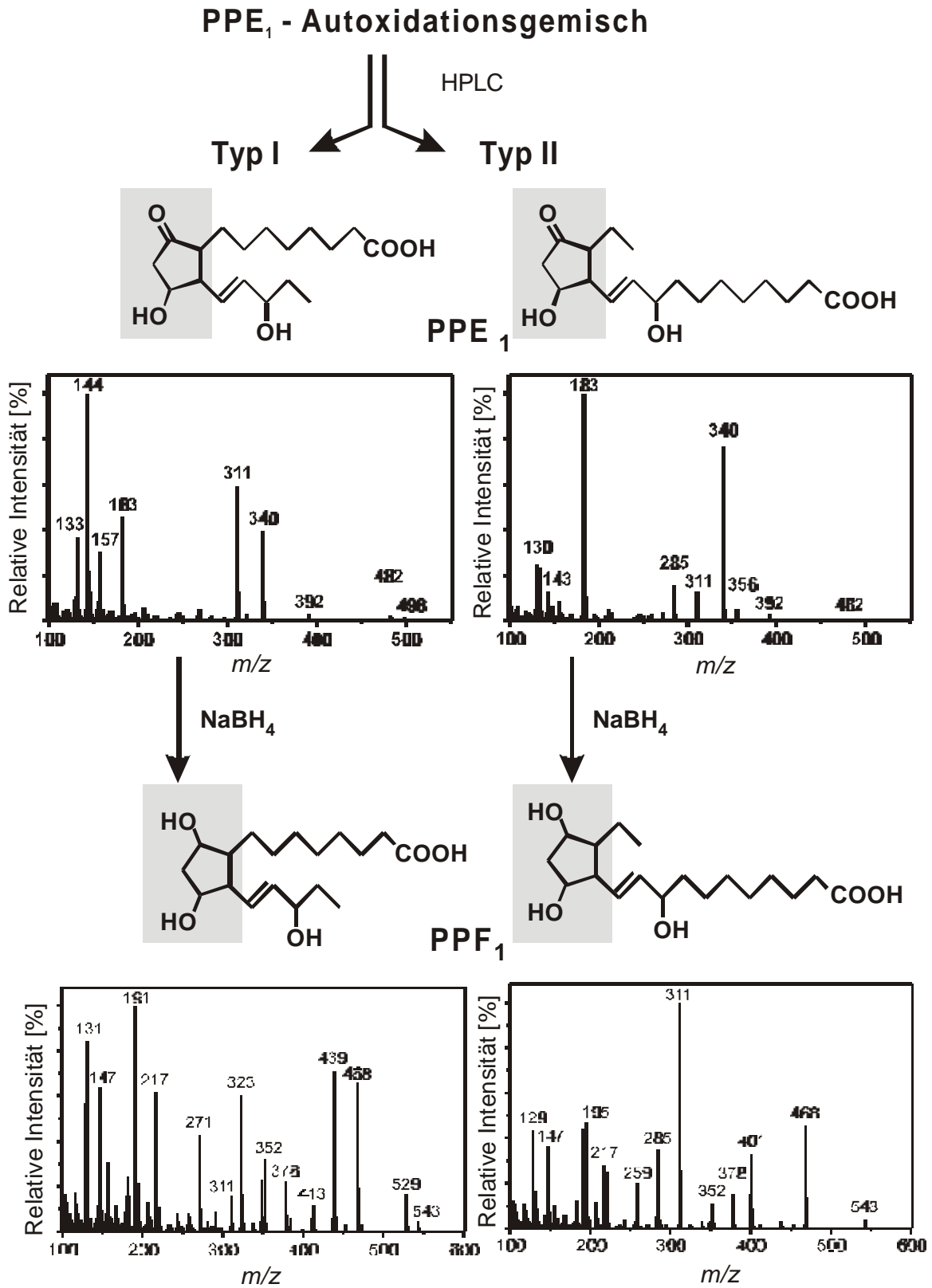


Abb. 17: EI-Massenspektrum der PPE₁ Typ I und II als Methylester-Methoxim-TMS-Ether und PPF₁ Typ I und II als Methylester-TMS-Ether.

IV.3 Herstellung und Isolierung von PPF₁

IV.3.1 Herstellung von PPF₁ durch Autoxidation von α -Linolensäure

Ziel der vorliegenden Arbeit war es PPF₁ im Milligramm-Maßstab zu synthetisieren und zu isolieren, ihre Struktur mittels HR-MS und NMR aufzuklären und in biologischen Testsystemen einzusetzen.

Die Synthese selbst erwies sich als ein sehr einfaches Verfahren: 5 g vorgereinigte Linolensäure (siehe III.1.) wurde in den unten genannten Lösungsmitteln gelöst und bei Raumtemperatur unter ständiger Luftzufuhr gerührt.

Die Oxidation wurde in einem protischen [Methanol/Wasser (1:1, v/v)] und in einem aprotischen (Tetrachlorkohlenstoff) Lösungsmittel durchgeführt, um den Einfluß von Lösungsmitteln auf die PPF₁-Ausbeute zu untersuchen.

Nach zehn Tagen wurde die Autoxidation gestoppt. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und anschließend wurden 5 g Triphenylphosphin, das in 50 ml Chloroform gelöst war, zugegeben, um noch vorhandene Peroxide zu Alkoholen zu reduzieren. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 30 min gerührt und anschließend auf eine Silicasäule (siehe III.6.3) aufgetragen und gereinigt. Das Eluat wurde in 50 ml-Fractionen aufgefangen und jeweils ein Aliquot von 50 μ l mittels DC auf die Anwesenheit von PPF₁ überprüft, wobei PGF_{2 α} als Referenzsubstanz diente. Hierbei wurde das Laufmittel 1 verwendet (siehe III.6.1). Die DC-Platte wurde mit Kupferacetat-Sprühreagenz (siehe III.6.1) angefärbt. Kupferacetat bildet nach kurzem Erhitzen Komplexe mit Prostanoiden, die eine für diese charakteristische Farbe aufweisen (Parchmann, 1999). Der Kupfer-PGF_{2 α} -Komplex besitzt eine violette Farbe und ist mit einem R_f-Wert von 0.52 auf der DC-Platte zu finden. Die Fractionen, die ebenso violett gefärbte Flecken auf der DC-Platte aufwiesen, wurden vereinigt. So erhielt man am Ende der Reinigungsprozedur eine Mischung von theoretisch 2 Regioisomeren mit jeweils 16 Isomeren der PPF₁.

Bei dem Vergleich der Autoxidationsansätze in Methanol/Wasser (1:1, v/v) und in Tetrachlorkohlenstoff konnte folgende Beobachtung gemacht werden:

Der Autoxidationsansatz in Methanol/Wasser (1:1, v/v) ergab eine Ausbeute von 5.55 ± 0.34 mg PPE₁ und 2.38 ± 0.06 mg PPF₁ pro g eingesetzter Linolensäure. Im Autoxidationsansatz mit Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel war das Verhältnis zu Gunsten der PPF₁ verschoben, wobei die Konzentration der PPF₁ mit 11.66 ± 3.60 mg pro g Linolensäure die PPE₁-Ausbeute um das fast 40fache übertraf (Abb. 18).

Dieser Befund läßt sich darauf zurückführen, daß die Intermediate der PPE₁- bzw. PPF₁-Synthese, PPG₁, in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich stabil sind.

PPG₁, die vermutlich hochinstabil sind, stellen die Vorläufer aller anderen Phytoprostan-klassen dar. Beispielsweise können durch Umlagerung E- und D-Ringverbindungen entstehen. Diese Reaktion wird bevorzugt in einem protischen Lösungsmittel ablaufen,

während PPG_1 in einem aprotischen Lösungsmittel stabilisiert sein sollten und so für die direkte Reduktion zu PPF_1 länger zur Verfügung stehen.

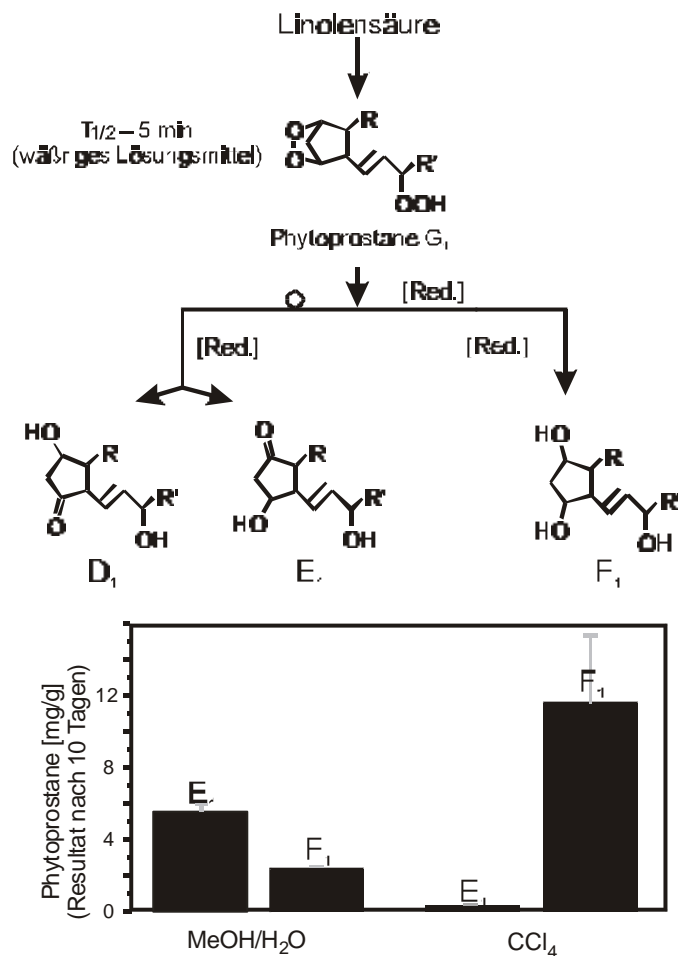


Abb. 18: Einfluß des Lösungsmittels [Methanol/Wasser (1:1, v/v) bzw. Tetrachlorkohlenstoff] auf die Synthese der PPF_1 und PPE_1 während der Autoxidationen von Linolensäure.

Für die Herstellung von PPF_1 durch Autoxidation von Linolensäure ist daher Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel besser geeignet als ein Methanol/Wasser-Gemisch.

Die oben beschriebene Reinigungsmethode wurde mit radioaktiv markierten $\text{PGF}_{2\alpha}$ validiert. Hierfür wurde ein reduzierter Linolensäure-Autoxidationsansatz (entsprechend 300 mg Linolensäure) mit radioaktiv markiertem $\text{PGF}_{2\alpha}$ versetzt und über eine 500 mg-SiOH-SPE-Säule aufgereinigt. Die Lösungsmittelvolumina wurden auf die Größe der Säule skaliert, so daß mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen und mit weiteren 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert wurde. Alle Eluate der einzelnen Reinigungsschritte wurden dabei aufgefangen und über eine Szintillationsmessung auf Anwesenheit von radioaktivmarkierten $\text{PGF}_{2\alpha}$ und über DC auf Anwesenheit von PPF_1 überprüft. In den Eluaten der Reinigungsschritte wurden keine PPF_1 detektiert. Die Wiederfindungsrate von $\text{PGF}_{2\alpha}$ betrug $98 \pm 1.59\%$.

IV.3.2 Herstellung von [^{18}O] $_{3}\text{PPF}_1$ durch Autoxidation von α -Linolensäure

Die GC-MS-Analyse erfordert einen geeigneten internen Standard. Im Falle der PPF_1 , die aus theoretisch 32 Isomeren bestehen, wäre der Gebrauch von kommerziell erhältlichen Prostaglandinen oder Isoprostanen zwar zielgerichtet, aber fehlerbehaftet, da verschiedene PPF_1 -Isomere und Prostaglandine bzw. Isoprostane voraussichtlich unterschiedliche chromatographische Eigenschaften und Ionisationsraten in der MS aufweisen. PPF_1 -Isomere, die mit schweren Isotopen markiert sind, sind als interner Standard in der GC-MS-Analytik am geeignetsten, da sie gleiche physikalische und chromatographische Eigenschaften besitzen wie die zu untersuchenden PPF_1 .

Markierte PPF_1 wurden durch Autoxidation von Linolensäure unter einer $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre hergestellt. Der Reaktionsmechanismus der PPF_1 -Synthese (Abb. 13) erklärt den Einbau von drei [^{18}O]Hydroxygruppen in jedes Isomer der PPF_1 , so daß diese isotopenmarkierte PPF_1 -Mischung um 6 Masseneinheiten schwerer ist als PPF_1 , die unter $^{16}\text{O}_2$ -Atmosphäre entstehen. Dieser Befund wurde durch die GC-MS-Analyse der ^{18}O -markierten PPF_1 bestätigt.

IV.3.3 Isolierung reiner PPF_1 -Regioisomere

Bei der PPF_1 -Synthese entsteht eine Mischung aus theoretisch 32 Isomeren. Diese Mischung diente als Ausgangsprodukt zur Gewinnung reiner Regioisomere der PPF_1 . Hierfür wurde die Mischung über RP-HPLC (siehe III.6.4.1) aufgetrennt (Abb. 19).

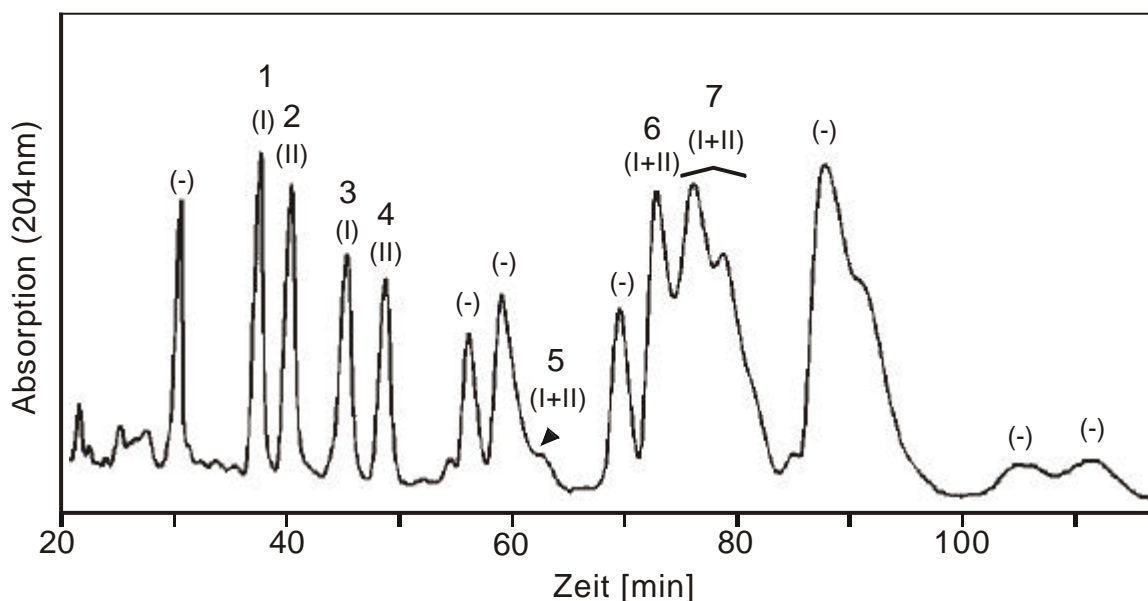


Abb. 19: RP-HPLC Analyse der PPF_1 . PPF_1 wurden in den Peaks 1 bis 7 identifiziert. Die Regioisomerkomposition der einzelnen Peaks ist jeweils in den Klammern angegeben [(I) für PPF_1 Regioisomer Typ I bzw. (II) für PPF_1 Regioisomer Typ II; (-) es sind keine PPF_1 vorhanden].

Jeder HPLC-Peak wurde gesammelt und jeweils ein Aliquot nach Derivatisierung zum entsprechenden Methylester-TMS-Ether (siehe III.2.2 und III.2.4) mittels GC-EI-MS analysiert (Imbusch, 2000b). Die Analyse ergab, daß die mit 1 bis 7 gekennzeichneten Peaks PPF₁ enthielten, wobei die Peaks 1 und 3 reine Regioisomere des Typs I (I) und Peak 2 und 4 reine Regioisomere des Typs II (II) darstellten. Alle weiteren Peaks enthielten keine (-) oder eine Mischung aus PPF₁- Regioisomeren (I+II).

Die so erhaltenen reinen PPF₁-Regioisomere dienten der Charakterisierung der PPF₁ und der Strukturaufklärung über HR-MS und NMR. Darüber hinaus konnte nun eine geeignete Analytik zum Nachweis von PPF₁ in Pflanzen aufgebaut werden.

IV.4 Charakterisierung von PPF₁

Reine Regioisomere der PPF₁ Typ I und II wurden über RP-HPLC gewonnen (siehe IV.3), die chromatographisch und spektroskopisch untersucht wurden.

IV.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde routinemäßig zur Kontrolle auf Verunreinigungen von Phytoprostan- und Prostaglandinlösungen angewendet, da die Durchführung sehr einfach und keine weitere Derivatisierung der Verbindungen notwendig ist.

Für Phytoprostane und Prostaglandine wurde immer das Laufmittelsystem 1 (siehe III.6.1) gewählt. Folgende R_f-Werte konnten gemessen werden:

| Prostanoid | R _f -Wert: |
|---|-----------------------|
| PGF _{2α} | 0.52 |
| PGF _{1α} | 0.51 |
| 8-epi PGF ₁ | 0.49 |
| PPF ₁ Typ I (siehe IV.3.3 Abb. 19 Peak 1) | 0.39 |
| PPF ₁ Typ II (siehe IV.3.3 Abb. 19 Peak 2) | 0.43 |
| PPF ₁ -Mischung, aus theoretisch 32 Isomeren bestehend | 0.37-0.78 |

Alle aufgelisteten Cyclopentanverbindungen ergaben mit dem Kupferacetat-Sprühreagenz (siehe III.6.1) nach kurzzeitigem Erhitzen (60°C, 5 min) eine charakteristische violette Farbe.

IV.4.2 UV-Spektren der PPF₁-Regioisomere Typ I und II und des iPF_{1 α} -III

Die UV-Spektren der PPF₁ Typ I und II sowie des iPF_{1 α} -III wurden in Methanol aufgenommen (Abb. 20). Wie zu erwarten, lag das UV-Maximum im Bereich von 201 nm, da hier die isolierte C=C-Doppelbindung der Seitenkette ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Struktur der PPF₁ enthält kein weiteres Chromophor und somit war auch kein weiteres Absorptionsmaximum zu erwarten. Abbildung 20 illustriert die UV-Spektren von PPF₁ Typ I und iPF_{1 α} -III. Das UV-Spektrum von PPF₁ Typ II entspricht dem des PPF₁ Typ I (Daten nicht gezeigt).

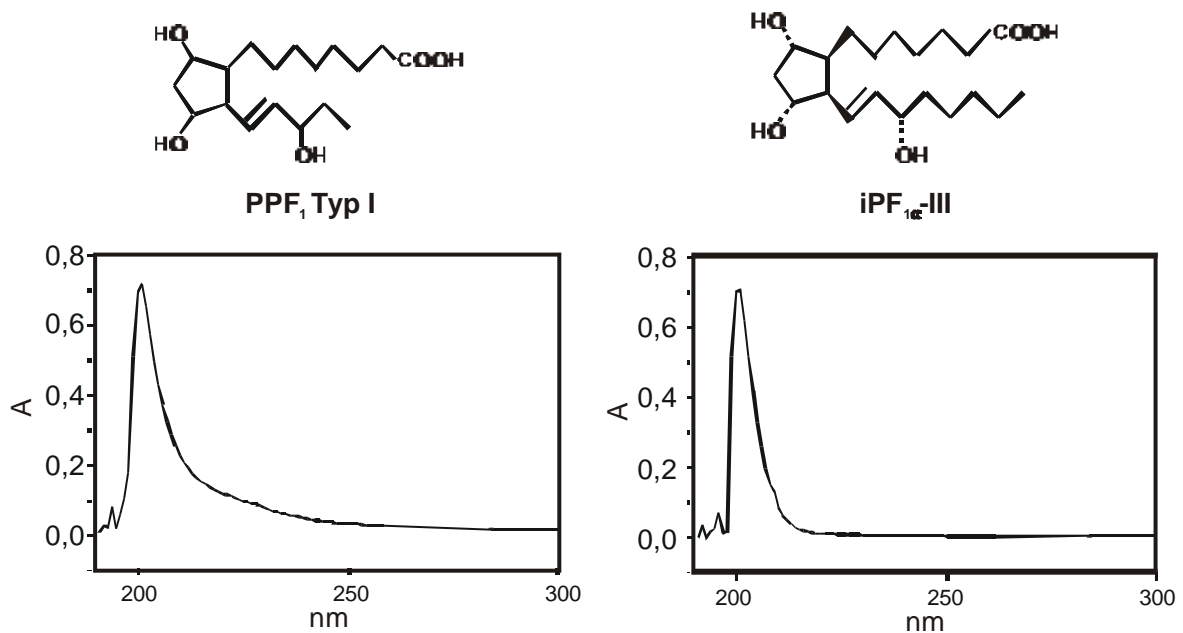


Abb. 20: UV-Spektren von PPF₁ Typ I und iPF_{1 α} -III.

Die molaren Extinktionskoeffizienten bei 201 nm konnten für PPF₁ Typ I mit 12818, für PPF₁ Typ II mit 19808 und für 8 epi-PGF_{1 α} mit 5027 berechnet werden. Theoretisch sollten die Extinktionskoeffizienten der drei Verbindungen ungefähr den selben Wert besitzen, allerdings kann die UV-Messung bei 201 nm stark fehlerbehaftet sein. Bereits kleinste Mengen an Verunreinigungen, die trotz HPLC-Reinigung noch in den isolierten Verbindungen vorhanden sein können, haben eine Absorptionsteigerung zur Folge, die eine genaue Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten verhindern.

IV.4.3 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie wurde sowohl zur Charakterisierung der Phytoprostane als auch zu deren Quantifizierung eingesetzt. Mittels HR-MS konnte das Fragmentierungsmuster der PPF₁ Typ I (Abb. 19 Peak 1 und 3) und II (Abb. 19 Peak 2 und 4) bestimmt und Fragmente

identifiziert werden. Die Analyse der PPF₁ im NICI-Modus der MS eröffnete die Möglichkeit einer extrem sensitiven, bis theoretisch in den pg-Bereich genauen Messung.

IV.4.3.1 Elektronenstoßionisation (EI)

Bei der Elektronenstoßionisation einer Verbindung entstehen meist charakteristische Fragmente, aus denen man Rückschlüsse auf deren Struktur ziehen kann.

Die Phytoprostane wurden gaschromatographisch getrennt und mittels HR-MS analysiert (siehe III.6.5 und III.8.2). Für die Messungen wurden die Carboxylgruppe zum Methylester und die Hydroxylgruppen zu Trimethylsilylethern (siehe III.2 und III.8.2) umgesetzt.

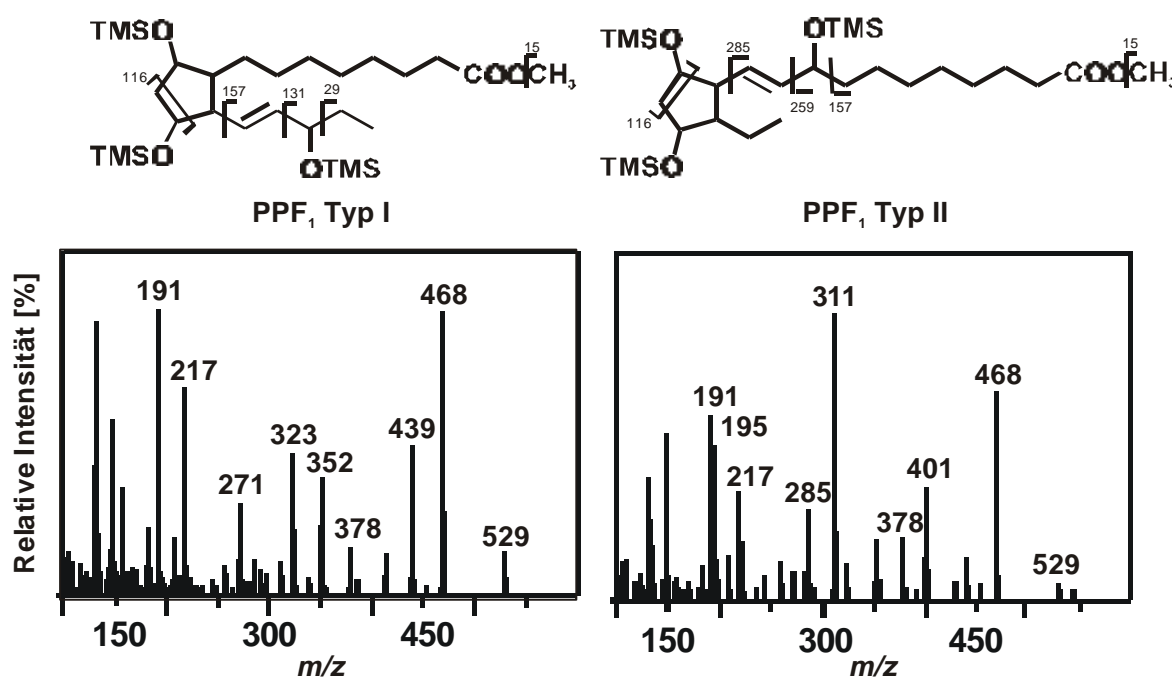


Abb. 21: EI-Massenspektren der Methylester-TMS-Ether-Derivate von PPF₁ Typ I und Typ II.

Die HR-MS-Analyse (Abb. 21; Tab. 3) zeigte, daß das PPF₁-Fragmentierungsmuster beider PPF₁-Regioisomere Ionen bei m/z 217.1074 (TMS-O-CH=CH-CH=O⁺-TMS) und 191.0928 (TMS-O⁺=CH-O-TMS) aufweisen, die durch intramolekulare Umlagerung bei F-Ring-Prostanoiden entstehen (Roberts *et al.*, 1998).

Überdies wiesen auch beide Fragmentierungsmuster Ionen bei m/z 529.3207 (C₂₆H₅₃Si₃O₅, Verlust von C₂H₅), 468.3101 (C₂₅H₄₈Si₂O₄, Verlust von HOTMS) und 378.2578 (C₂₂H₃₈SiO₃, Verlust von 2 x HOTMS) auf.

Beide Regioisomere zeigten zudem jeweils für sie charakteristische Fragmente: so konnten PPF₁ Typ I anhand der Ionen bei m/z 439.2703 (C₂₃H₄₃Si₂O₄, Verlust von C₂H₅ und HOTMS), 323.2041 (C₁₈H₃₁SiO, Verlust von C₂H₅, CH₂CH-OTMS und HOTMS) und 131.0889 (C₆H₁₅SiO, TMSO⁺=C₃H₆) identifiziert werden.

Anhand der Ionen bei m/z 401.2342 ($C_{19}H_{41}Si_3O_3$, Verlust von $(CH_2)_7COOCH_3$), 311.1850 ($C_{16}H_{31}Si_2O_2$, Verlust von $(CH_2)_7COOCH_3$ und HOTMS) und 195.1192 ($C_{11}H_{19}SiO$, Verlust von TMSO- $CH(CH_2)_7COOCH_3$ und HOTMS) konnte das Massenspektrum den PPF₁ Typ II zugeordnet werden. Verschiedene Isomere einzelner Regioisomere konnten jedoch nicht unterschieden werden, da einzelne Fragmente der Regioisomere lediglich Unterschiede in den Intensitäten aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

| PPF ₁ Typ I | PPF ₁ Typ II |
|------------------------|-------------------------|
| m/z | m/z |
| 191.0928 | 191.0928 |
| 217.1074 | 217.1074 |
| 378.2578 | 378.2578 |
| 468.3101 | 468.3101 |
| 529.3207 | 529.3207 |
| 131.0889 | 195.1192 |
| 323.2041 | 311.1850 |
| 439.2703 | 401.2342 |

Tab. 3: Fragmente (m/z) der PPF₁ Typ I- und II-Methylester-TMS-Ether-Derivate, erhalten durch HR-EI-MS. Gezeigt sind sowohl gemeinsame Fragmente, wie auch Fragmente, die für das jeweilige Regioisomer charakteristisch sind (Erläuterungen siehe Text).

In einem folgenden Versuch wurde eine PPF₁-Autoxidationsmischung, die theoretisch aus 32 Isomeren besteht, aufgereinigt (siehe IV.3.1) und anschließend zu den korrespondierenden Methylester-TMS-Ether-Derivaten umgesetzt (siehe III.2 und III.8.2). Eine Messung mit GC-EI-MS sollte Auskunft darüber geben, ob PPF₁ einer Isomerenmischung über GC in einzelne Peaks getrennt würden, die exklusiv Regioisomer I oder II enthalten. In Abbildung 22 ist das Ergebnis illustriert: das Chromatogramm bei m/z 468 stellt beide Regioisomere dar, während das Chromatogramm bei m/z 439 Regioisomer Typ I und bei m/z 401 Regioisomer Typ II darstellt (Tab. 3). Im Retentionsbereich um 17 min eluieren fast ausschließlich PPF₁ des Regioisomers Typ I von der GC-Säule. PPF₁ Typ II eluieren fast 1.5 min später, wobei hier deutlich PPF₁ Typ I coeluieren. Insgesamt gesehen konnten PPF₁-Regioisomere nicht über GC getrennt werden.

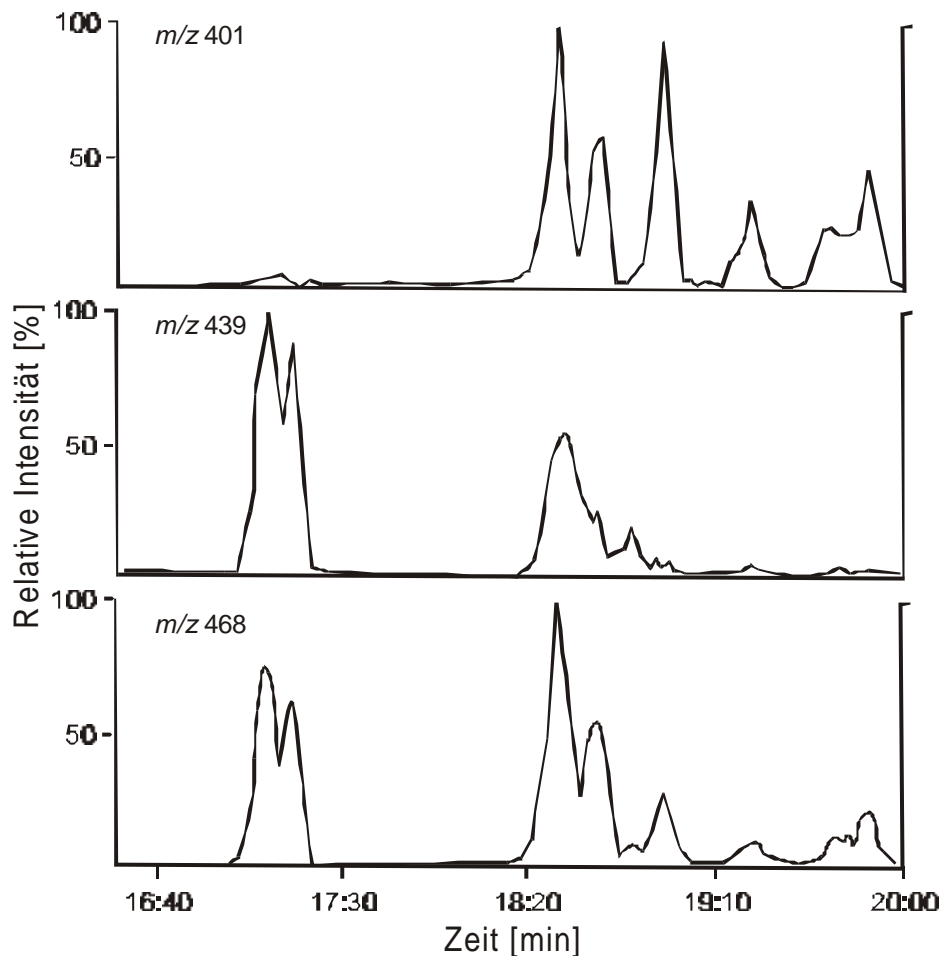


Abb. 22: GC-EI-Messung einer PPF₁-Autoxidationsmischung nach Derivatisierung zu Methylester-TMS-Ethern.

IV.4.3.2 Positive Chemische Ionisation (PCI)

Eine weitverbreitete Methode zur Quantifizierung von Verbindungen in der MS ist die Detektion im PCI-Modus. Für die Anwendung dieses Verfahrens wurden Methylester-TMS-Ether-Derivate der PPF₁ hergestellt (siehe III.2).

Die vorherrschenden Ionen, die sowohl vom PPF₁ Typ I als auch Typ II gebildet wurden, sind der Molekülionenpeak $[M+H]^+$ bei m/z 559 und die durch sequentielle Abspaltung von HOTMS der TMS-Ethergruppen entstandenen Peaks bei m/z 469, 379 und 289 (Abb. 23). Die Intensität der einzelnen Peaks variierte sehr stark zwischen den einzelnen Isomeren der PPF₁. Zusammenfassend gesehen ist eine Unterscheidung der Regioisomere der PPF₁ im PCI-Modus der MS nicht möglich.

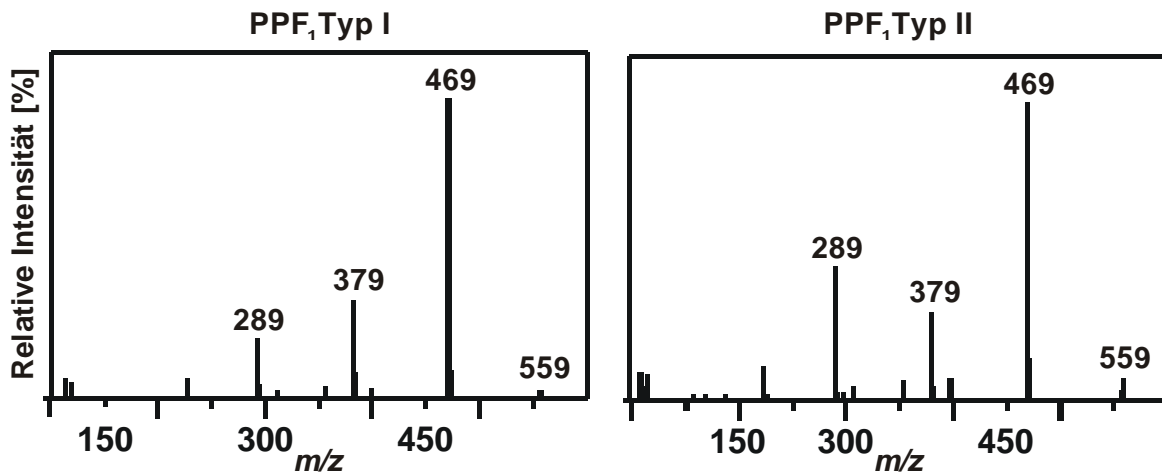


Abb. 23: PCI-Massenspektren der PPF₁ Typ I und Typ II nach Derivatisierung zum Methylester-TMS-Ether.

IV.4.3.3 Negative Chemische Ionisation (NICI)

Die Messung von Prostanoiden im NICI-Modus der MS ist eine der sensitivsten Methoden zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzgruppe. Deshalb wurde diese Methode gewählt, um PPF₁ noch in Spuren in pflanzlichen Geweben nachweisen zu können. Die PPF₁ mußten für diese Bestimmung mit einer Abgangsgruppe derivatisiert werden, die einen hohen Elektroneneinfangsquerschnitt besitzt und nach Abspaltung ein Molekülanion entstehen läßt. Diese geforderten Eigenschaften besitzen Pentafluorbenzylester, die im Massenspektrometer nach Einfang eines Elektrons in ein mesomeriestabilisiertes Pentafluorbenzylradikal und in ein Säureanion zerfallen (Abb. 24) (Barrow und Taylor, 1987).

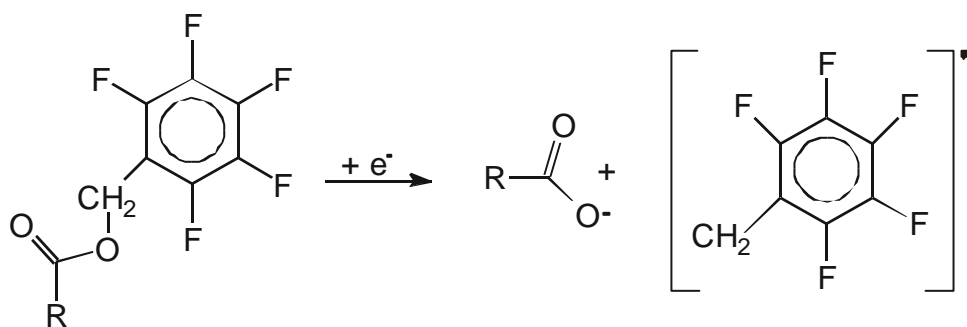


Abb. 24: Spaltung eines PFB-Esters während der Ionisation im Massenspektrometer.

Die Derivatisierung der PPF₁ zum PFB-Ester erfolgte nach der Methode von Morrow und Roberts (Morrow und Roberts, 1994) (siehe III.2.3). Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine SiOH-SPE-Säule gereinigt. Dafür wurde der Reaktionsansatz unter einem Stickstoffstrom getrocknet, in Chloroform rekonstituiert und auf eine SiOH-SPE-Säule

aufgetragen. Reste der Derivatisierungsreagenzien wurden mit 3 ml Ether entfernt und die PPF₁-PFB-Ester wurden mit 6 ml eines Ether/Methanol-Gemisches (9:1, v/v) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockene eingeblasen und anschließend wurden die Hydroxylgruppen zu TMS-Ethern umgesetzt (siehe III.2.4).

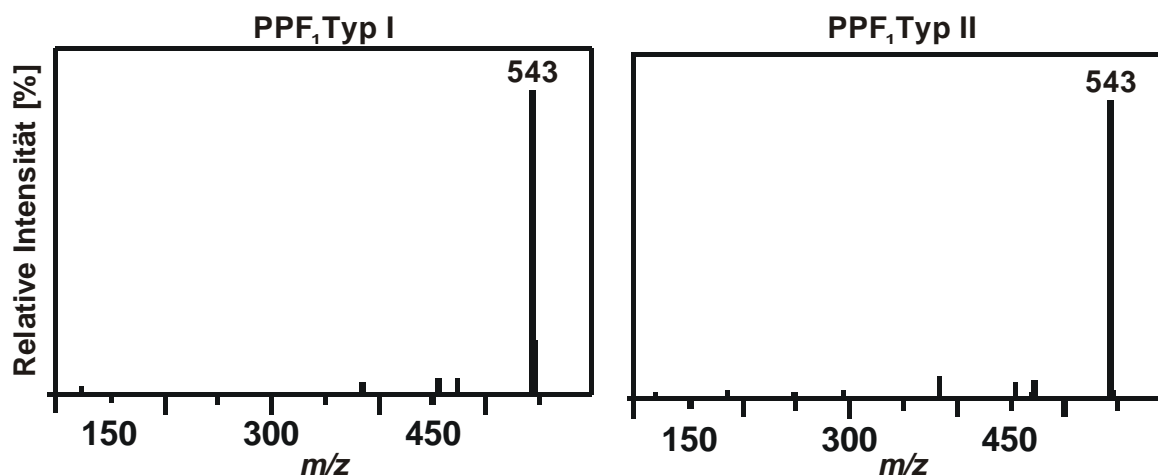


Abb. 25: Massenspektren der PPF₁-PFB-Ester-TMS-Ether. Das vorherrschende Ion beider Massenspektren ist bei m/z 543 das Säureanion der PPF₁ Typ I und II.

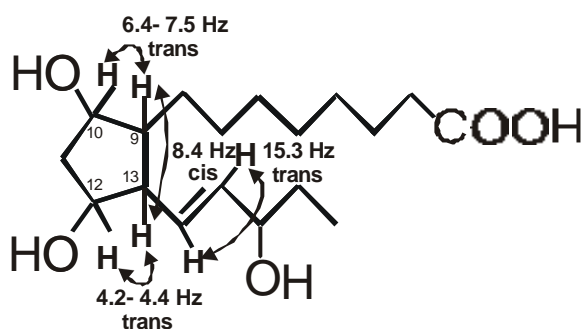
In Abbildung 25 sind die Massenspektren der PPF₁ Typ I und Typ II nach entsprechender Derivatisierung dargestellt. Die dominanten Ionen in diesen Spektren sind die Säureanionen, welche in keine weiteren Anionen zerfallen.

Mit dieser Methodik war die Voraussetzung für eine sensitive Messung der PPF₁ in Pflanzen geschaffen.

IV.4.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Mit Hilfe der HR-MS konnten erste Rückschlüsse auf die Struktur der PPF₁ vorgenommen werden. So konnte die chemische Zusammensetzung einzelner Fragmente bestimmt werden, die Verknüpfung der Fragmente und die relative Konfiguration konnte jedoch nur mittels NMR charakterisiert werden.

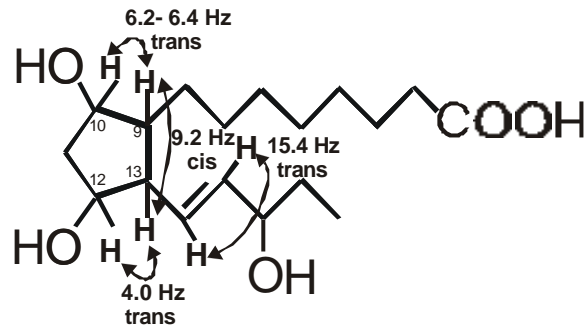
Wie unter IV.3.3 beschrieben, konnten vier reine Regioisomere der PPF₁ über RP-HPLC erhalten werden. Diese reinen Regioisomere wurden von Herrn Dr. H. Lerche vom Lehrstuhl für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels ¹H-, ¹³C- und 2D-NMR-Spektroskopie sowie NOE-Einstrahlungsexperimenten auf ihre Struktur hin analysiert. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der ¹H- und ¹³C- Experimente aufgeführt:

PPF₁ Typ I Peak 1**¹H-NMR-Daten**

| Position | Chemische Verschiebung δ | Kopplungs-konstante [Hz] |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| C ₂ | t; 2.10 | 7.3 |
| C ₃ | qui; 1.49 | 7.21 |
| C ₄ -C ₈ , C _{11b} , C ₁₇ | m; 1.2-1.29 | |
| C ₉ | qui; 1.9 | 7.5 |
| C ₁₀ | q; 3.73 | 6.4 |
| C _{11a} | qui; 1.41 | 5.5-6; 4 |
| C ₁₂ | dt; 3.81 | 6.3; 4.4 |
| C ₁₃ | dt; 2.55 | 8.4; 4.2 |
| C ₁₄ | dd; 5.35 | 15.1; 8.6 |
| C ₁₅ | dd; 5.42 | 15.3; 5.70 |
| C ₁₆ | q; 3.82 | 6.2 |
| C ₁₈ | t; 0.81 | 7.5 |

¹³C-NMR-Daten

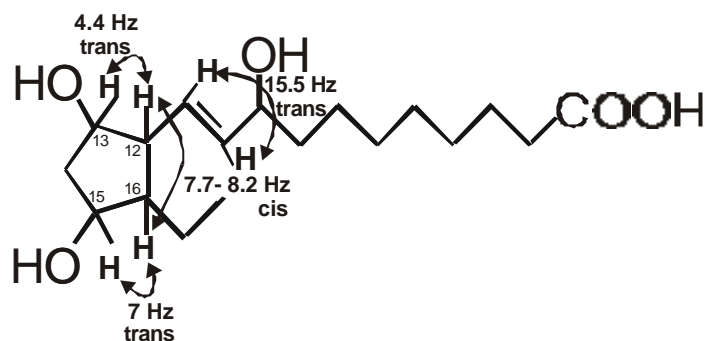
| Position | Chemische Verschiebung δ |
|--------------------------------|------------------------------------|
| C ₂ | 37.32 |
| C ₃ | 26.96 |
| C ₄ -C ₈ | 29.17- 31.32 |
| C ₉ | 50.50 |
| C ₁₀ | 76.85 |
| C ₁₁ | 43.76 |
| C ₁₂ | 76.56 |
| C ₁₃ | 53.92 |
| C ₁₄ | 136.22 |
| C ₁₅ | 129.86 |
| C ₁₆ | 74.65 |
| C ₁₇ | 31.32 |
| C ₁₈ | 10.18 |

PPF₁ Typ I Peak 3**¹H-NMR-Daten**

| Position | Chemische Verschiebung δ | Kopplungs-konstante [Hz] |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| C ₂ | t; 2.27 | 7.3 |
| C ₃ -C ₈ , C ₁₇ , C _{11a} | m; 1.25- 1.55 | |
| C ₉ | m; 1.95- 2.05 | |
| C ₁₀ | dt; 3.82 | 7.5; 6.2 |
| C _{11b} | ddd; 2.46 | 14.3; 8.1; 6.4 |
| C ₁₂ , C ₁₆ | m; 3.85- 3.95 | |
| C ₁₃ | dt; 2.63 | 9.2; 4.0 |
| C ₁₄ | dd; 5.39 | 15.5; 9.3 |
| C ₁₅ | dd; 5.49 | 15.4; 6.8 |
| C ₁₈ | t; 0.90 | 7.32 |

¹³C-NMR-Daten

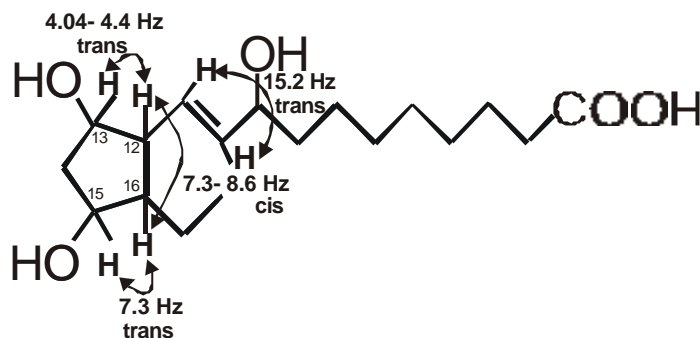
| Position | Chemische Verschiebung δ |
|--|------------------------------------|
| C ₂ | 34.97 |
| C ₃ | 26.06 |
| C ₄ -C ₈ , C ₁₇ | 29.00-31.25 |
| C ₉ | 50.43 |
| C ₁₀ | 76.85 |
| C ₁₁ | 43.80 |
| C ₁₂ | 76.53 |
| C ₁₃ | 54.17 |
| C ₁₄ | 136.33 |
| C ₁₅ | 130.77 |
| C ₁₆ | 75.19 |
| C ₁₈ | 10.19 |

PPF₁ Typ II Peak 2**¹H-NMR-Daten**

| Position | Chemische Verschiebung δ | Kopplungs-konstante [Hz] |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| C ₂ | t; 2.19 | 7.52 |
| C ₃ | m; 1.556- 1.62 | |
| C ₄ -C ₈ , C _{14a} , C ₁₇ | m; 1.30- 1.60 | |
| C ₉ | q; 3.99 | 6.2 |
| C ₁₀ | dd; 5.52 | 15.5; 5.7 |
| C ₁₁ | dd; 5.46 | 15.5; 8.60 |
| C ₁₂ | dt; 2.66 | 8.8; 4.4 |
| C ₁₃ | dt; 3.91 | 6.8; 4.4 |
| C _{14b} | ddd; 2.46 | 14.4; 7.7; 6.8 |
| C ₁₅ | q; 3.85 | 7.0 |
| C ₁₆ | qui; 1.93 | 7.2 |
| C ₁₈ | t; 0.93 | 7.2 |

¹³C-NMR-Daten

| Position | Chemische Verschiebung δ |
|--------------------------------|------------------------------------|
| C ₂ | 38.49 |
| C ₃ | 27.10 |
| C ₄ -C ₈ | 30.52-30.56 |
| C ₉ | 73.34 |
| C ₁₀ | 136.50 |
| C ₁₁ | 129.75 |
| C ₁₂ | 53.66 |
| C ₁₃ | 76.46 |
| C ₁₄ | 43.82 |
| C ₁₅ | 76.60 |
| C ₁₆ | 52.40 |
| C ₁₇ | 22.57 |
| C ₁₈ | 13.03 |

PPF₁ Typ II Peak 4

| ¹H-NMR-Daten | | | ¹³C-NMR-Daten | |
|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Position | Chemische Verschiebung δ | Kopplungs-konstante [Hz] | Position | Chemische Verschiebung δ |
| C ₂ | t; 2.27 | 7.16 | C ₂ | 34.95 |
| C ₃ -C ₈ , | | | C ₃ | 26.08 |
| C _{14a} | m; 1.25- 1.65 | | C ₄ -C ₇ | 26.51; 30.14-30.46 |
| C ₉ | q; 3.97 | 6.6 | C ₈ | 38.39 |
| C ₁₀ | dd; 5.48 | 15.20; 6.80 | C ₉ | 76.63 |
| C ₁₁ | dd; 5.40 | 15.20; 9.16 | C ₁₀ | 136.61 |
| C ₁₂ | dt; 2.64 | 8.60; 4.04 | C ₁₁ | 130.58 |
| C ₁₃ | dt; 3.90 | 6.80; 4.40 | C ₁₂ | 53.99 |
| C _{14b} | ddd; 2.45 | 14.5; 7.7; 6.8 | C ₁₃ | 76.48 |
| C ₁₅ | q; 3.83 | 7.32 | C ₁₄ | 43.83 |
| C ₁₆ | qui; 1.95 | 7.3 | C ₁₅ | 73.77 |
| C ₁₈ | t; 0.92 | 7.3 | C ₁₆ | 52.39 |
| | | | C ₁₇ | 22.69 |
| | | | C ₁₈ | 12.99 |

Tab. 4: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten der PPF₁ Typ I und II. Die reinen PPF₁-Isomere wurden, wie unter IV.3.3 beschrieben, gewonnen. Die Bezeichnung der einzelnen Isomere lehnt sich an Abb. 19 an. Die Spektren wurden in deuteriertem Methanol aufgenommen, wobei Tetramethylsilan als interner Standard diente. Die PPF₁-Abbildung oberhalb der entsprechenden Tabelle gibt das Molekül und die entsprechenden Kopplungskonstanten der H-Atome am Ring und an der Doppelbindung wieder. Die Bezeichnung cis bzw. trans gibt die Stellung der H-Atome zueinander an.

Mit Hilfe des $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Spektrums und des $^1\text{H}/^1\text{H}$ -Spektrums konnte eine genaue strukturelle Zuordnung der Protonen und der Kohlenstoffe im Molekül getroffen werden. Dabei bestätigte sich die Regioisomerstruktur der Typen I und II. Anhand der Kopplungskonstanten $J_{9,13}$ bei dem Regioisomer Typ I bzw. $J_{12,16}$ bei dem Regioisomer Typ II, die alle kleiner als 10 Hz waren, konnte man erkennen, daß die Seitenketten in cis-Orientierung zueinander stehen. Die Kopplungskonstanten $J_{9,10}$ bzw. $J_{12,13}$ zeigen, daß diese H-Atome in trans-Orientierung zueinander stehen, was wiederum bedeutet, daß die OH-Gruppen des Cyclopentanringes zueinander cis orientiert sind, wie durch den Synthesemechanismus vorhergesagt wurde. Die Protonen der Doppelbindung stehen in trans-Orientierung zueinander, was man aus der hohen Kopplungskonstante von 15 Hz ablesen kann. Die Konfiguration des C16 der PPF₁ Typ I bzw. die des C9 bei Typ II konnte nicht bestimmt werden, allerdings schien diese sich nur wenig auf die chemische Verschiebung des Protons auszuwirken. Durch NOE-Differenzialmessungsexperimente konnte die cis-Orientierung der Seitenketten bestätigt werden.

Die thermodynamisch günstigste Stellung ist die Envelope-Konformation des Cyclopentanringes. Abbildung 26 zeigt diese räumliche Struktur der PPF₁ Typ II.

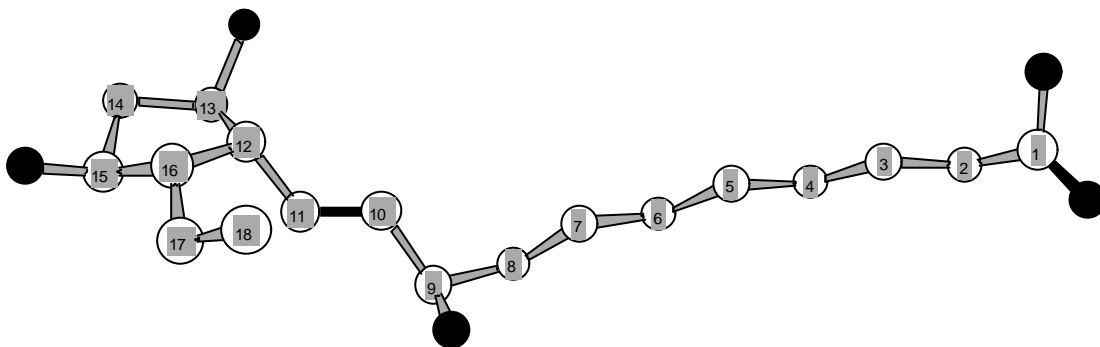


Abb. 26: 3D-Darstellung der PPF₁ Typ II. Die weißen Kreise symbolisieren Kohlenstoffatome, wobei die Nummern innerhalb der Kreise die Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts wiedergeben. Die schwarzen Kreise symbolisieren Sauerstoff und die schwarzen Bindungen die Doppelbindungen im Molekül. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Wasserstoffatomen verzichtet.

Bei der polarimetrischen Vermessung der einzelnen reinen Regioisomere wurde ein Drehwinkel von 0° bestimmt, was bedeutet, daß Racemate vorlagen.

Zusammenfassend kann damit gesagt werden, daß (i) die einzelnen reinen Regioisomere racemische Mischungen waren, wobei sich (ii) die Regioisomere der Peaks 1 und 3 (Typ I) bzw. 2 und 4 (Typ II) durch die absolute Konfiguration der Hydroxygruppe am C16 bzw. C9 unterschieden.

IV.5 Quantifizierung der PPF₁

Zur Quantifizierung der PPF₁ stand PGF_{1α} als käuflich erwerbbarer Standard zur Verfügung. Die Bestimmung der PPF₁-Konzentration in Pflanzen sollte im NICI-Modus der MS erfolgen, wobei [¹⁸O]₃PPF₁ als interner Standard eingesetzt werden sollte. Jedoch konnte eine Quantifizierung des [¹⁸O]₃PPF₁-Standards über GC-NICI-MS gegen PGF_{1α} nicht in betracht gezogen werden, da PPF₁ und PGF_{1α} unterschiedliche Ionisationsraten besitzen und dies eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung zur Folge gehabt hätte. Um die massenspektroskopische Bestimmung zu umgehen, wurden HPLC-gereinigte [¹⁶O]₃PPF₁-Regioisomere UV-spektroskopisch gegen PGF_{1α} quantifiziert. Eines der so quantifizierten [¹⁶O]₃PPF₁-Regioisomere wurde dann zur Bestimmung der [¹⁸O]₃PPF₁ mittels NICI-MS eingesetzt, da sich natürliche und isotoopenmarkierte Substanzen nicht in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden.

IV.5.1 Quantifizierung reiner PPF₁-Regioisomere über RP-HPLC

Reine PPF₁-Regioisomere wurden über RP-HPLC (Fa. Knauer, LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μm Partikelgröße) getrennt und UV-spektroskopisch quantifiziert, wobei PGF_{1α} als interner Standard verwendet wurde. Sowohl Analyt als auch Standard besitzen ein Absorptionsmaximum bei 201 nm (siehe IV.4.2). Da eine Detektion bei dieser Wellenlänge sehr unspezifisch ist, wurde ein Chromophor mit bekanntem molaren Extinktionskoeffizienten in beide Verbindungen eingeführt. Hierfür wurde die Veresterung mit 2,4'-Dibromoacetophenon (siehe III.2.5) gewählt, wobei die entstandenen Produkte anschließend aufgrund des eingeführten aromatischen Systems photometrisch bei 258 nm vermessen werden konnten. Der Reaktionsansatz wurde vor der Vermessung über SiOH-SPE gereinigt, um überschüssige Reagenzien abzutrennen. Dafür wurde der Ansatz in Chloroform rekonstituiert, auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen und anschließend mit 3 ml Ether gewaschen. Die Ester wurden mit 6 ml Ether/Methanol (9:1, v/v) eluiert, anschließend unter einen Stickstoffstrom getrocknet und in 100 μl Acetonitril/Wasser (4:6, v/v) aufgenommen.

Die HPLC-Auftrennung erfolgte wie unter III.6.4.2 beschrieben. Abbildung 27 zeigt ein entsprechendes RP-HPLC-Chromatogramm. PPF₁ Typ I eluierte nach ca. 28 min, während das um zwei Methyleinheiten längere PGF_{1α} nach ca. 43 min eluierte. Die Quantifizierung von PPF₁ erfolgte über den Flächenvergleich mit dem internen Standard PGF_{1α}.

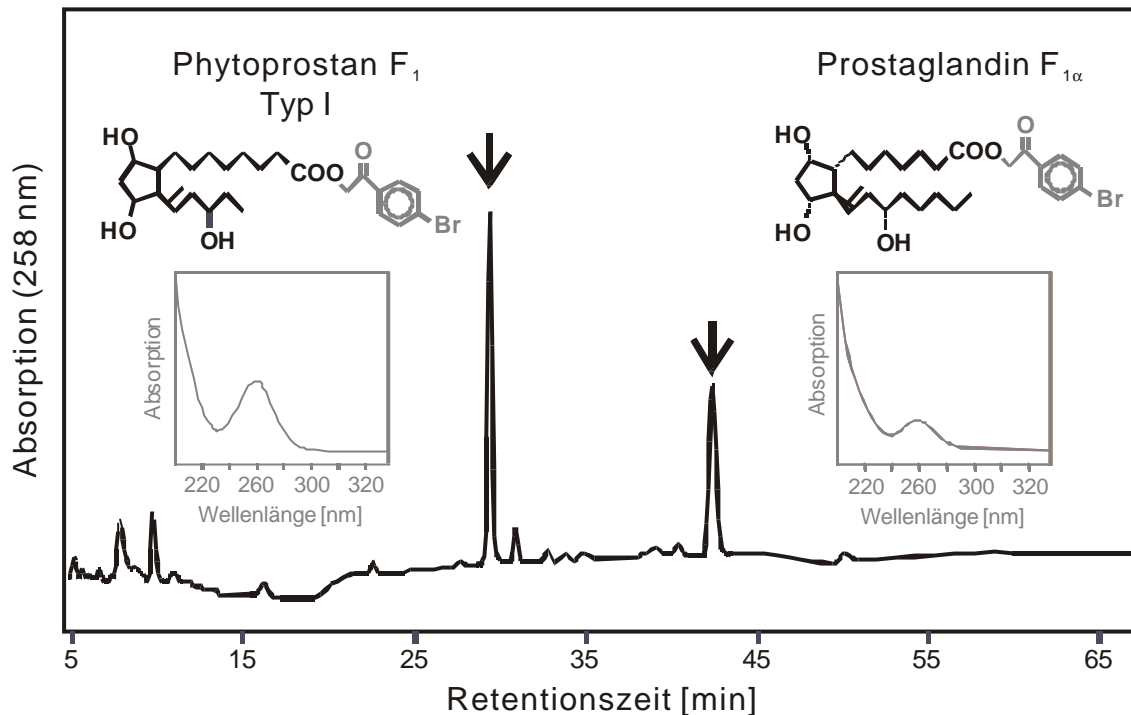


Abb. 27: RP-HPLC-Chromatogramm der Produkte aus den HPLC-gereinigten PPF₁ Typ I (Abb. 19, Peak 1) und PGF_{1α} nach Veresterung mit 2,4'-Dibromoacetophenon. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor. Die UV-Spektren der Produkte sind mitdargestellt.

IV.5.2 Quantifizierung von PPF₁-Isomerengemischen mittels GC-NICI-MS

Bei der Quantifizierung eines PPF₁-Isomerengemisches, das nach der Autoxidation von Linolensäure durch säulenchromatographische Aufreinigung gewonnen wurde, war die RP-HPLC-Methode nicht anwendbar, da die PPF₁-Isomere vermutlich über einen weiten Bereich eluieren und nur teilweise getrennt würden. Außerdem konnte nicht ausgeschlossen werden, daß in dieser aufgereinigten Isomerenmischung nicht noch weitere Linolensäure-oxidationsprodukte enthalten waren, die ebenfalls eine Säurefunktion besitzen und so fälschlicherweise mitdetektiert würden. Die Spezifität der HPLC-Methode war damit insgesamt gesehen zu gering.

Eine sehr hohe Spezifität hingegen besitzt die Analyse mittels GC-NICI-MS, die unter anderem auf dem Messen negativer Ionen beruht. Organische Moleküle zerfallen in der Ionisationskammer des Massenspektrometers in der Regel in positive Ionen. Bei der negativen chemischen Ionisation werden die primären Elektronen vom Reaktandgas aufgefangen und es entstehen sekundäre Elektronen mit geringer Restenergie. Nur Substanzen mit einem hohen Elektroneneinfangsquerschnitt können diese sekundären Elektronen aufnehmen und so ionisiert werden. Da PPF₁ keinen entsprechend hohen Elektroneneinfangsquerschnitt besitzen, müssen sie mit einer geeigneten Substanz derivatisiert werden. Wie in IV.4.3.3 beschrieben, wählten wir für die Derivatisierung die Veresterung mit PFB-Br

zum PPF₁-PFB-Ester, der bei Ionisierung im Massenspektrometer in das Hauptfragment [M - PFB]⁻ zerfällt. Zusätzliche Spezifität wurde durch die gaschromatographische Auftrennung eingebracht, da hier die Retentionszeiten der PPF₁ genau bestimmt werden konnten, was jedoch eine weitere Derivatisierung der Hydroxygruppen zum TMS-Ether erforderte.

IV.5.2.1 Quantifizierung eines [¹⁸O]₃PPF₁-Isomerengemisches

Die Quantifizierung einer Substanz im Massenspektrometer erfordert einen adäquaten internen Standard, der die gleichen physikalischen Eigenschaften aufweisen sollte wie die zu vermessende Substanz. Idealerweise stellt man für derartige Analysen Substanzen her, die mit stabilen, schweren Isotopen markiert sind. Bei organischen Substanzen sollte sich dabei der interne Standard um mindestens 2 Massen von den endogenen Verbindung unterscheiden, da sonst der Isotopenpeak des Kohlenstoffes (1.11% ¹³C) die Integration der Peakflächen zur Quantifizierung stören würde.

Als interner Standard für die Bestimmung von PPF₁ ([¹⁶O]₃PPF₁) wurden [¹⁸O]₃PPF₁ eingesetzt, die durch Autoxidation von α-Linolensäure unter ¹⁸O₂-Atmosphäre synthetisiert wurden (siehe IV.3.2) und sich um 6 Masseneinheiten von den endogen gebildeten PPF₁ unterscheiden.

Bevor [¹⁸O]₃PPF₁ jedoch in der Analytik eingesetzt werden konnten, mußten sie quantifiziert werden.

Ein Aliquot einer [¹⁸O]₃PPF₁-Isomerenmischung wurde mit einem reinen, HPLC-quantifizierten Regioisomer der [¹⁶O]₃PPF₁ Typ I vermischt, hydriert, zum PFB-Ester-TMS-Ether umgesetzt (siehe IV.4.3.3) und über GC-NICI-MS vermessen (siehe III.6.5). Durch Flächenvergleich der Peaks bei *m/z* 545 zu *m/z* 551 konnte dann die Gesamtkonzentration der [¹⁸O]₃PPF₁ bestimmt werden (Abb. 28).

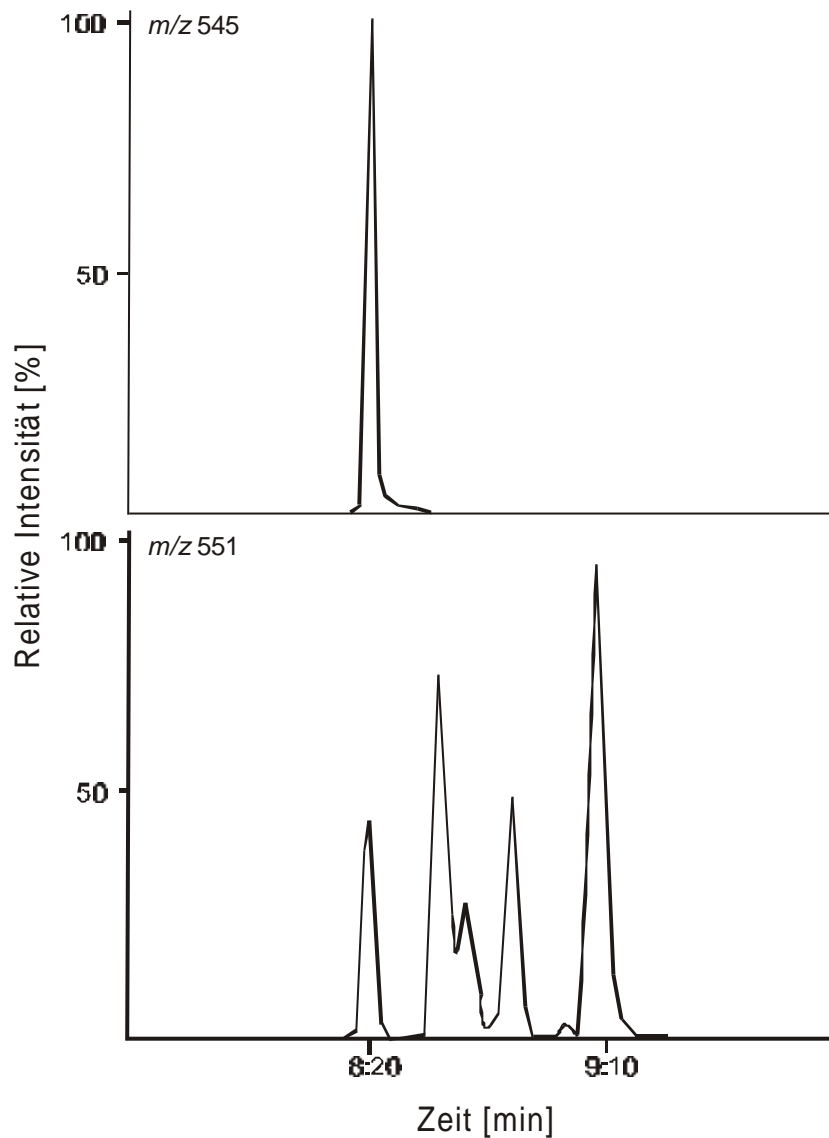


Abb. 28: Quantifizierung der $[^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ nach Hydrierung und anschließender Derivatisierung zum PFB-Ester-TMS-Ether. m/z 545 stellt das HPLC-quantifizierte PPF_1 -Regioisomer Typ I (Abb. 19 Peak 1) und m/z 551 die $[^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Mischung dar.

IV.5.2.2 Quantifizierung von $[^{16}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerengemischen

Die Quantifizierung von $[^{16}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerengemischen erfolgte, wie unter IV.5.2.1 beschrieben, im NICI-Modus der MS, wobei hier das quantifizierte $[^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerengemisch als interner Standard eingesetzt wurde. Die Chromatogramme in Abbildung 29 zeigen, daß die Isomerenzusammensetzung eines $[^{16}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerengemisches dem des $[^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerengemisch entspricht, da sich die Muster der Chromatogramme entsprechen.

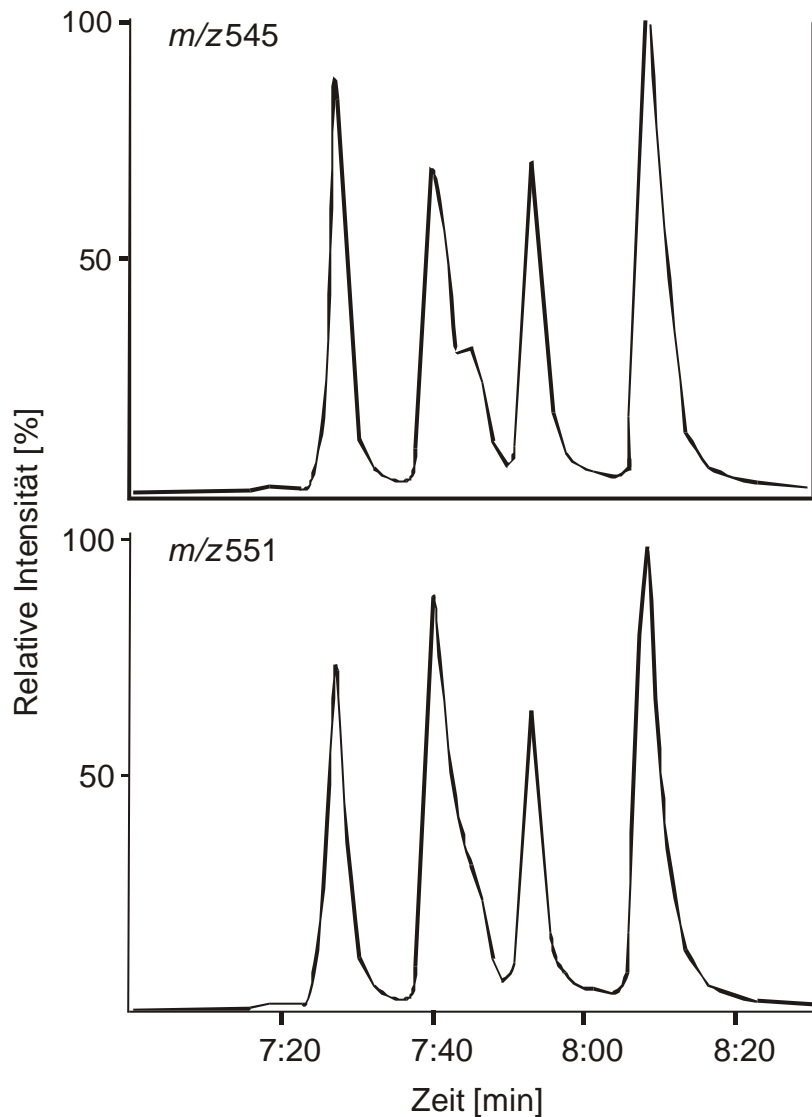


Abb. 29: Quantifizierung von $[^{16}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerenmischungen. m/z 545 stellt ein $[^{16}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ -Isomerenmisch und m/z 551 den internen Standard, $[^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$, dar.

IV.6 Verlauf der Autoxidation von α -Linolensäure

Mit der unter IV.5.2.2 vorgestellten Vorgehensweise stand nun eine Methode zur Verfügung, um den Verlauf der Akkumulation von PPF_1 bei der Autoxidation von α -Linolensäure zu verfolgen.

IV.6.1 Verlauf der Autoxidation von α -Linolensäure in Tetrachlorkohlenstoff

α -Linolensäure wird aufgrund der drei Doppelbindungen sehr leicht oxidiert. Bei direkter Aufarbeitung von kommerziell erworbener α -Linolensäure konnte ein Gehalt an PPF_1 von $286.7 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ α -Linolensäure (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$) bestimmt werden.

Vor Beginn der Untersuchung zum Verlauf der Autoxidation wurde 1 ml α -Linolensäure auf eine 500 mg-SiOH-SPE-Säule gegeben, die zuvor mit Hexan equilibriert wurde. Anschließend wurde α -Linolensäure mit 20 ml Ether/Hexan (1:9, v/v) eluiert (siehe III.1), wobei bereits vorhandene PPF₁ und Hydroperoxide auf der Säule verblieben. Nach dem Abrotieren des Eluates wurde die Linolensäure in 10 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und unter Lichtausschluß gerührt. Zur Bestimmung der PPF₁-Konzentration wurde ein Aliquot entnommen, mit 20 mg Triphenylphosphin und einer definierten Menge [¹⁸O]₃PPF₁ versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei RT stehen gelassen, dann direkt auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen und mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) sowie 3 ml eines Gemisches aus Chloroform/Aceton/ Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. Die Elution der PPF₁ erfolgte mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v). Nach Hydrierung und Derivatisierung zu PFB-Ester-TMS-Ethern wurden die PPF₁ mittels GC-NICI-MS quantifiziert.

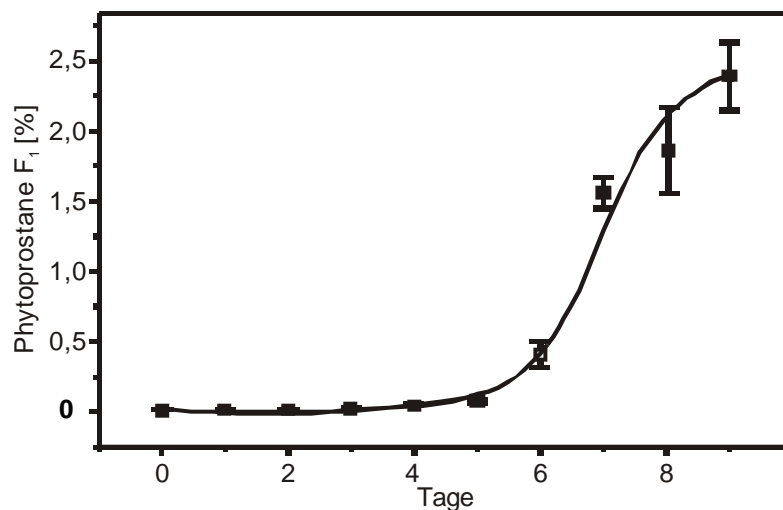


Abb. 30: Autoxidation von α -Linolensäure in Tetrachlorkohlenstoff. Die Gesamtausbeute an PPF₁ ist in [%] der eingesetzten Linolensäure angegeben. Jeder Meßpunkt ist das Ergebnis einer Dreifachbestimmung (Mittelwert \pm S.D., n = 3).

Abbildung 30 illustriert das Versuchsergebnis, wobei sich ein sigmoider Kurvenverlauf des Konzentrationanstieges der PPF₁ andeutet.

IV.6.2 Autoxidation von 13-Hydroperoxylinolensäure zu PPF₁

Ein Ziel der Arbeit war es, reine PPF₁-Regioisomere zu synthetisieren. Bei der Autoxidation von α -Linolensäure sollten PPF₁-Regioisomere des Typs I und II zu gleichen Teilen entstehen. Um eines der Regioisomere zu erhalten, kann als Ausgangssubstanz der Synthese ein reines Hydroperoxid verwendet werden, welches dann in das entsprechende Regioisomer autoxidieren kann, beispielsweise das 13-Hydroperoxid der α -Linolensäure in PPF₁ des Typs II.

Zur Herstellung des 13-Hydroperoxides (13-HPOTE) wurde Linolensäure mit Soja-Lipoxygenase umgesetzt. 10 mg Lipoxygenase (LOX) wurden mit 100 mg Linolensäure und 10 mg BHT in 100 ml 100 mM Boratpuffer (pH-Wert 7.5) für 2 h bei RT gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde der pH-Wert auf 3-4 mit 1 M Zitronensäure abgesenkt; dabei denaturierte die LOX und die Hydroperoxide und nicht umgesetzte Linolensäure konnten mit Hexan ausgeschüttelt werden. Der Hexan-Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet und bis auf 3 ml eingengt. Weil sich die Methylester der Linolensäure und 13-HPOTE besser voneinander trennen lassen als die freien Säuren, wurden Linolensäure und 13-HPOTE durch Zugabe von Diazomethan methyliert. Zur anschließenden Trennung wurde der Ansatz auf eine SiOH-SPE-Säule (500 mg) aufgetragen und die Methylester mit Hexan/Ether (95:5, v/v) eluiert. Es wurden sechs 1 ml-Fractionen gesammelt. Die ersten zwei Fractionen wurden verworfen, da sie Methylinolenat enthielten, während dieses in den restlichen Fractionen nicht mehr vorhanden war. Die restlichen vier Fractionen wurden vereinigt und die Konzentration an 13-HPOTE (ϵ 23000) wurde spektroskopisch bei 235 nm bestimmt. Die Ausbeute an 13-HPOTE betrug 26 mg. Die Lösung wurde dann vorsichtig bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 2 ml Methanol gelöst und anschließend wurden 2 ml Wasser hinzugegeben. Der Ansatz wurde 10 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurden zum Oxidationsansatz 10 ml Chloroform, 20 mg Triphenylphosphin, 25 μl einer 5%igen BHT-Lösung in Methanol und 10 ml gesättigte Natriumchlorid-Lösung hinzugegeben. Die wäßrige Phase wurde mit 1 M Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt und die Chloroformphase abgetrennt. Anschließend wurde ein zweites Mal mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 3 ml Chloroform rekonstituiert und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Es wurde mit 6 ml Ether und 3 ml Chloroform/Aceton (80:20, v/v) gewaschen und die entstandenen Phytostane mit Ether/Aceton (70:30, v/v) eluiert. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeblasen. Die PPF₁ lagen nach Silylierung als Methylester-TMS-Ether vor und wurden über GC-EI-MS vermessen. Dabei zeigte sich, daß nicht nur PPF₁ Typ II gebildet worden waren, sondern auch Typ I. Das Verhältnis zwischen Typ I und Typ II konnte nicht festgelegt werden, da einige Isomere verschiedener Regioisomere fast gleichzeitig von der GC-Säule eluierten und so nicht einzeln integriert werden konnten.

Zusätzlich sollten PPF₁ im NICI-Modus der MS vermessen werden, um das Peakmuster der PPF₁, die durch Linolensäure- bzw. 13-HPOTE-Autoxidation entstanden sind, zu vergleichen. Hierfür wurde ein Aliquot von 40 μl der Lösung mit 940 μl Methanol, 20 μl einer 5%igen BHT-Lösung in Methanol und 1 ml 15%ige wäßrige Kalilauge versetzt. Der Hydrolyseansatz wurde 1 h bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 M Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt, mit Wasser auf 20 ml verdünnt und zweimal mit 5 ml

Ether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die so aufgearbeiteten PPF₁ wurden anschließend hydriert, zum PFB-Ester-TMS-Ether derivatisiert und mittels GC-NICI-MS analysiert. Bei dem Vergleich des Peakmusters der [¹⁶O]₃PPF₁ mit dem des internen Standards ([¹⁸O]₃PPF₁, entstanden durch Autoxidation) konnten unterschiedliche Peakintensitäten beobachtet werden (Abb. 31). Besonders auffällig ist die Abnahme der Intensität des ersten Peaks (Retentionszeit 8:20 min, Abb. 31 B). Zu diesem Zeitpunkt eluiert PPF₁ Typ I, was in einem weiteren Experiment gezeigt wurde (Abb. 31 A). So scheint das Verhältnis von PPF₁ Typ I zu Typ II deutlich auf Seiten des Typs II zu liegen.

Da jedoch weitere Isomere der PPF₁ Typ I und II auch in diesem GC-Programm fast gleichzeitig eluieren, konnte auch hier kein exaktes Verhältnis zwischen PPF₁ Typ I und II angegeben werden. Die Gesamtausbeute an PPF₁ betrug $2.30 \pm 0.07\%$ (Mittelwert \pm S.D., n = 3), bezogen auf das eingesetzte 13-Hydroperoxid.

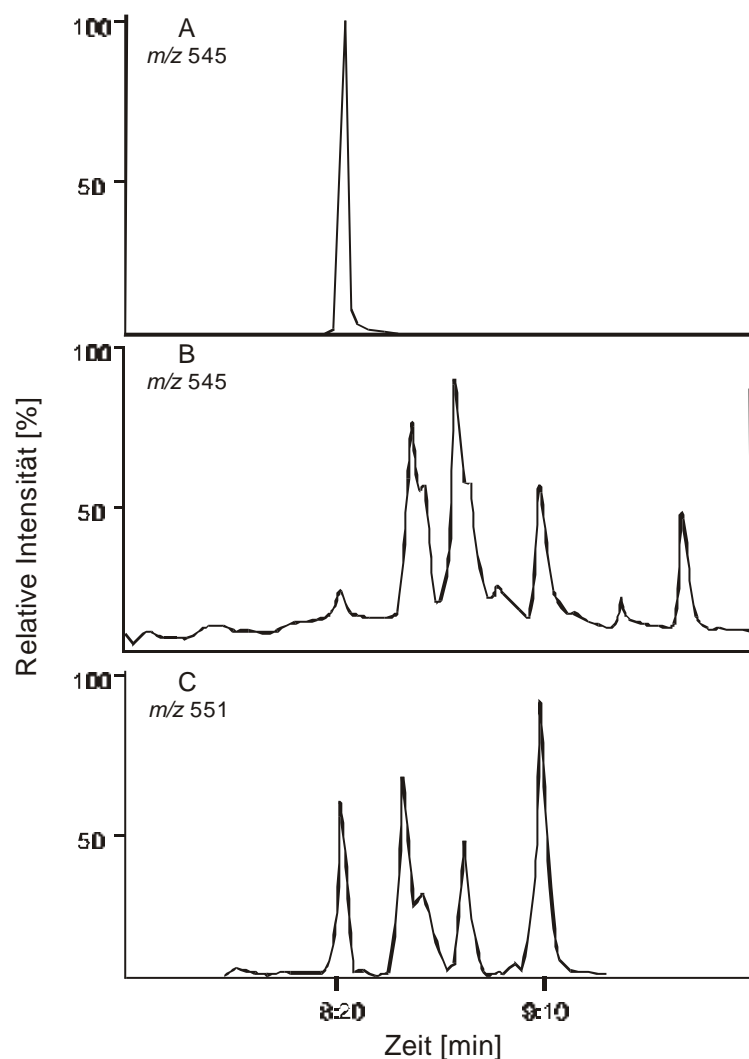


Abb. 31: GC-NICI-MS-Chromatogramme der H₂-PPF₁-PFB-Ester-TMS-Ether-Derivate. A: *m/z* 545, PPF₁ Typ I (siehe IV.3.3 Abb. 19 Peak 1); B: *m/z* 545, PPF₁, gewonnen durch Autoxidation von 13-HPOTE, C: *m/z* 551, interner Standard: [¹⁸O]₃PPF₁.

IV.7 PPF₁ in fetten Ölen

iPF₂ haben sich als exzellente Marker der Lipidperoxidation *in vitro* und *in vivo* bei tierischen Produkten/Geweben bewährt, da sie stabile Endprodukte der Lipidperoxidation sind (Roberts und Morrow, 2000).

Da iPF₂ in höheren Pflanzen selbst nicht vorkommen, können diese Marker nicht für pflanzliche Produkte angewendet werden. Dort könnten PPF₁ als Marker für Lipidperoxidation dienen, da sie stabile Endprodukte der Linolensäureoxidation darstellen und Linolensäure eine der wichtigsten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in pflanzlichen Geweben ist.

Ein erster Nachweis von PPF₁ in pflanzlichen Produkten wurde in kommerziell erhältlichen Ölen vorgenommen, die in der Nahrungsmittelindustrie eine große Rolle spielen und die darüber hinaus einen hohen Linolensäuregehalt aufweisen: Leinöl (ca. 40-70% Linolensäure) und Sojaöl (ca. 8% Linolensäure).

40 mg Öl wurden nach Zusatz von BHT (Endkonzentration 0.5%) und [¹⁸O]₃PPF₁ als internem Standard alkalisch verseift. Die Verseifung wurde mit 1 M ethanolischer KOH für 90 min bei 40°C durchgeführt. Nach Beendigung der Verseifung wurde der Ansatz mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 3-4 angesäuert und mit Wasser auf 10 ml verdünnt. PPF₁ wurden zweimal mit 3 ml Ether extrahiert. Die Etherextrakte wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Chloroform gelöst und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgebracht. Es folgten zwei Waschschrte mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (70:30:1, v/v). PPF₁ wurden anschließend mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Nachdem das Eluens unter einem Stickstoffstrom abgeblasen worden war, wurden die so isolierten PPF₁ hydriert und zum PFB-Ester-TMS-Ether umgesetzt. Die Quantifizierung erfolgte im NICI-Modus der MS.

Leinöl enthielt $105.7 \pm 18.2 \mu\text{g PPF}_1/\text{g Öl}$ (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$) und Sojaöl $8.2 \pm 2.4 \mu\text{g PPF}_1/\text{g Öl}$ (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$).

Für die Bestimmung des Linolensäuregehaltes der Öle wurden diese wie oben beschrieben verseift, jedoch wurde statt [¹⁸O]₃PPF₁ [U-¹³C]Linolensäure als interner Standard hinzugesetzt. Nach Beendigung der Reaktion und Einstellung des pH-Wertes auf 3-4, wurde die Linolensäure zweimal mit 3 ml Hexan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene gebracht. Anschließend wurde der Rückstand in 50 μl Methanol angelöst und mit Diazomethan versetzt. Die Linolensäuremethylester wurden dann mittels GC-PCI-MS vermessen (siehe III.6.5 und III.8.2). Leinöl enthielt $790.3 \pm 112.0 \text{ mg Linolensäure/g Öl}$ (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$) und Sojaöl $130.8 \pm 9.2 \text{ mg Linolensäure/g Öl}$ (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$).

IV.8 Isolierung und Quantifizierung von PPF₁ aus Pflanzenmaterial

Die Analyse der PPF₁ in Pflanzenmaterial wurde durch mehrere Faktoren erschwert: (i) PPF₁ stellen nur einen kleinen Anteil der Linolensäureoxidationsprodukte dar (ca. 1% *in vitro*), (ii) PPF₁ bestehen aus theoretisch 32 Isomeren und (iii) ein vermutlich großer Teil der Oxidationsmischung besteht aus acyclischen Trihydroxyfettsäuren, die sowohl durch Autoxidations- als auch Photooxidationsprozesse entstehen können und ähnliche chromatographische Eigenschaften und die gleiche Masse wie PPF₁ besitzen.

IV.8.1 Bestimmung von PPF₁

IV.8.1.1 Bestimmung frei vorliegender PPF₁

Für die Bestimmung nicht veresterter PPF₁ wurden 3-15 g FG (entsprechend 0.3-1.5 g TG) Pflanzenmaterial eingewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde entweder sofort aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert, um eine weitere Autoxidation der Linolensäure zu verhindern. Im Falle von getrocknetem Pflanzenmaterial wurde das Material direkt aufgearbeitet. Zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial in 20 ml gesättigter NaCl-Lösung suspendiert, die 0.05% (w/v) BHT, 20 mg TPP und 200 µl 1 M Zitronensäure enthielt. Die Temperatur der Lösungen betrug 4°C, um ein schnelles Auftauen des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Als interner Standard wurden 500 ng [¹⁸O]₃PPF₁ hinzugefügt. Nach Zusatz von 20 ml Ether wurde der Ansatz für 3 min mit einem Ultraturax homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend bei 2900 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Etherphase abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 ml Chloroform rekonstituiert, auf eine 500 mg-SiOH-SPE-Säule aufgetragen und mit 6 ml eines Gemisches aus Ether/Essigsäure (99:1, v/v) sowie 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. Die Elution der PPF₁ erfolgte mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v). Das Eluat wurde bis zur Trockene eingengt und anschließend in 1 ml Methanol aufgenommen. Nach Zusatz von 20 mg Adams-Katalysator wurden die PPF₁ hydriert (siehe III.4) und im Anschluß zu PFB-Ester-TMS-Ether derivatisiert, so daß sie mittels GC-NICI-MS analysiert werden konnten.

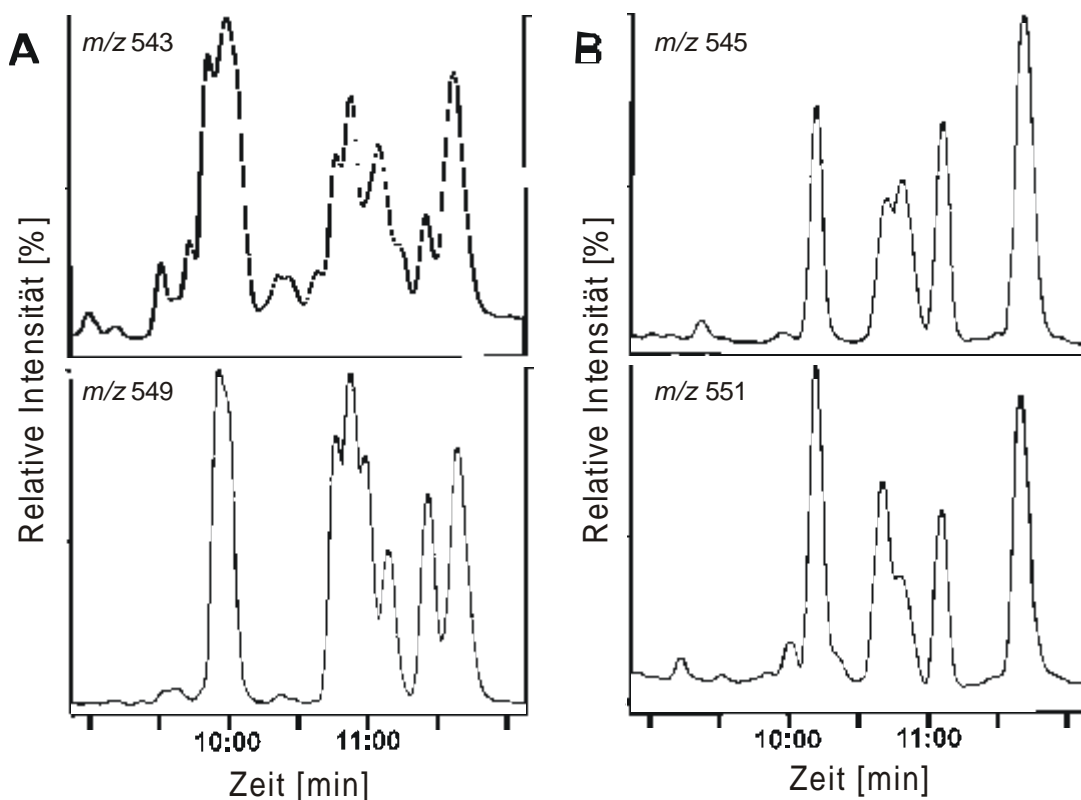


Abb. 32: GC-NICI-MS-Analyse freier PPF₁ aus getrockneten Blättern der Pfefferminze. PPF₁ wurden zum PFB-Ester-TMS-Ether umgesetzt: (A) ohne, (B) mit vorheriger Hydrierung. Die Massenchromatogramme bei *m/z* 543 und *m/z* 545 stellen endogen gebildete PPF₁ dar, während die Massenchromatogramme bei *m/z* 549 bzw. *m/z* 551 den internen Standard [¹⁸O]₃PPF₁ darstellen. Durch Peakflächenvergleich von *m/z* 545 mit *m/z* 551 konnte ein Gehalt von 20.01 ± 0.76 µg PPF₁/g TG (Mittelwert ± S.D., n = 3) berechnet werden.

Acyclische Triole, die durch Autoxidation oder Photooxidation von Linolensäure entstehen können, konnten durch einfache säulenchromatographische Aufreinigungen nicht von den PPF₁ getrennt werden. Zudem eluierten die offenkettigen Triole nach Derivatisierung zum PFB-Ester-TMS-Ether fast gleichzeitig mit den PPF₁-Derivaten von der GC-Säule und störten so eine selektive und genaue Integration der PPF₁-Derivate. Durch Hydrierung der Proben konnten die acyclischen Triole zwar nicht physikalisch von den PPF₁ getrennt werden, jedoch gelang eine Trennung durch die Detektion in verschiedenen Massenspuren im NICI-Modus der MS. So wurden die acyclischen Triole aufgrund der zwei Doppelbindungen um 4 Masseneinheiten und die PPF₁ nur um 2 Masseneinheiten verschoben. Die PFB-Ester-TMS-Ether-Derivate der hydrierten acyclischen Triole wurden in der Massenspur *m/z* 547 detektiert, während die Derivate der hydrierten PPF₁ bei *m/z* 545 vermessen wurden. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis einer Probenaufarbeitung von getrockneten Pfefferminzblättern vor und nach Hydrierung der Proben. Es ist deutlich zu erkennen, daß vor der Hydrierung keine saubere Integration der Peaks endogener PPF₁ auf der Massenspur *m/z* 543 möglich war, da hier trihydroxylierte offenkettige Triole mit den PPF₁ coeluierten. Durch die Hydrierung vereinfachte sich das Peakmuster der PPF₁ auf 4 Peaks bei *m/z* 545.

IV.8.1.2 Bestimmung freier und veresterter PPF₁

Über 95% der Ausgangsverbindung der PPF₁-Synthese, α -Linolensäure, liegt in Membranen verestert vor, wo sie durch Einwirken von freien Radikalen theoretisch zu PPF₁ umgesetzt werden kann. Daher wurde eine Lipidextraktion vorgenommen, bei der sowohl Membranlipide als auch frei vorliegende Lipide extrahiert wurden. Nach Hydrolyse des Lipidextraktes und entsprechender Derivatisierung wurde die Gesamtkonzentration an PPF₁ gemessen.

Für die Bestimmung freier und veresterter PPF₁ wurden 1-5 g FG (entsprechend 0.1-0.5 g TG) des Pflanzenmaterials eingewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde entweder sofort aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert, um eine weitere Autoxidation der Linolensäure zu verhindern. Im Falle von getrocknetem Pflanzenmaterial wurde das Material direkt aufgearbeitet. Das Pflanzenmaterial wurde in einer Mischung aus Methanol/Chloroform (2:1, v/v) aufgenommen, wobei 80 μ l 1 M Zitronensäure, 0.115 mg BHT, 20 mg TPP sowie 500 ng [¹⁸O]₃PPF₁ als interner Standard zugesetzt wurden. Diese Mischung wurde für 1 min mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurden 18 ml Chloroform und 8 ml 0.88%ige (w/v) Kaliumchlorid-Lösung zugesetzt. Die untere, organische Phase wurde abgetrennt und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol mit 0.1% (w/v) BHT gelöst.

Zur Hydrolyse der Lipide wurden 2 ml 15%ige (w/v) KOH zugesetzt und der Ansatz wurde bei 40°C für 1 h stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml 1 M Zitronensäure und 32 ml Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Lipide zweimal mit 5 ml Ether extrahiert, die Etherextrakte vereinigt und unter einem Stickstoffstrom trocken geblasen. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und, wie unter IV.8.1.1 beschrieben, gereinigt und derivatisiert.

Die Differenz der beiden PPF₁-Bestimmungen (IV.8.1.1 und IV.8.1.2) [(veresterte+freie PPF₁) - freie PPF₁] ergab die Konzentration veresterter PPF₁.

Durch die Behandlung mit dem Ultraturrax während der Homogenisierung wurde ständig Sauerstoff in die Probe einführt. Um zu verhindern, daß dadurch eine Lipidperoxidation forciert wird, wurden den Proben der Radikalfänger BHT wie auch das Reduktionsmittel TPP zugesetzt.

Um die Effizienz des Oxidationsschutzes zu untersuchen, wurden beide Aufarbeitungsmethoden auf eine Artefaktbildung von PPF₁ hin analysiert. Hierfür wurde ein Aliquot Linolensäure direkt zur Bestimmung der PPF₁-Konzentration aufgearbeitet, während mit einem weiteren Aliquot die unter IV.8.1.1 und IV.8.1.2 beschriebenen Aufarbeitungsmethoden durchgeführt wurden. Anschließend wurden die PPF₁-Konzentrationen vor und nach der Aufarbeitung verglichen. Dabei konnte keine signifikante Steigerung der PPF₁-Konzentration beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Entstehung von PPF₁ während der Aufarbeitung kann demnach ausgeschlossen werden.

IV.8.1.3 Aufarbeitungsparameter und Validierung

Die Wiederfindungsrate der PPF₁ in den verschiedenen Aufarbeitungsschritten wurde durch Analyse (wie unter IV.8.1 bzw. IV.8.1.2 beschrieben) von 300 mg getrockneten Lindenblüten (*Flores Tiliae, Tilia cordata*), die zuvor mit [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]PGF_{2α} (spezifische Aktivität 179.00 Ci/mmol) versetzt wurden, bestimmt. Sowohl für die Etherextraktion und die Lipidextraktion zur Bestimmung freier und veresterter PPF₁, als auch für den folgenden Reinigungsschritt wurden Wiederfindungsraten von über 90% ermittelt. Bei der Gesamtaufarbeitung wurden $60.6 \pm 1.5\%$ der eingesetzten Radioaktivität im Fall der Aufarbeitung freier bzw. $31.3 \pm 9.0\%$ im Fall der Aufarbeitung freier und veresterter PPF₁ wiedergefunden.

Die Quantifizierung endogener PPF₁ erfolgte durch den Peakflächenvergleich des internen Standards ([¹⁸O]₃PPF₁) bei *m/z* 551 mit Peaks der gleichen Retentionszeit bei *m/z* 545. Die Detektionsgrenze lag bei 100 pg (Signal-Rausch-Verhältnis 5:1). Es wurden mehrere Versuche durchgeführt, die die Genauigkeit der Methode bestätigten. Die Präzision des Verfahrens wurde durch die Aufarbeitung von *Nicotiana tabacum*-Zellen (170 mg TG) bestimmt (siehe IV.8.1). Das dafür benötigte Pflanzenmaterial wurden aus einer Zellsuspensionskultur gewonnen. Eine Sechsfachbestimmung freier endogener PPF₁ in diesen Suspensionszellen ergab einen Gehalt von 36.7 ± 5.8 ng/g TG. Um die Genauigkeit der Methode zu bestimmen, wurden Aliquots der Suspensionszellen mit 10 bis 1500 ng PPF₁ Typ I und 500 ng [¹⁸O]₃PPF₁ versetzt. In Abbildung 33 ist der erhaltene lineare Zusammenhang eingesetzter und wiedergefundener PPF₁ dargestellt. Der Korrelationskoeffizient belief sich auf 0.9890. Die Standardabweichung der PPF₁-Bestimmung variierte mit dem Gehalt an PPF₁.

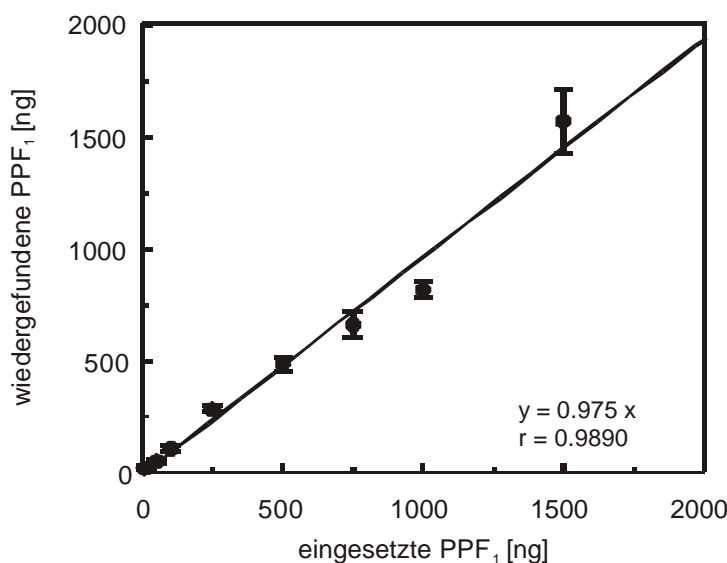


Abb. 33: Genauigkeit und Präzision der quantitativen Bestimmung von PPF₁. PPF₁ Typ I (10-1500 ng) und [¹⁸O]₃PPF₁ (interner Standard, 500 ng) wurden zu jeweils 170 mg TG *Nicotiana tabacum*-Zellen hinzugefügt und nach der Methode IV.8.1 aufgearbeitet. Jeder Meßpunkt ist das Ergebnis einer Dreifachbestimmung (Mittelwert \pm S.D., $n = 3$).

Um einen weiteren kommerziell erhältlichen internen Standard mit einzubeziehen, wurde die oben genannte Versuchsdurchführung auch mit $\text{PGF}_{1\alpha}$ anstelle von $[\text{}^{18}\text{O}]_3\text{PPF}_1$ durchgeführt. Hierbei wurden 10-2000 ng PPF_1 Typ I den *Nicotiana tabacum*-Zellen zugesetzt. Als interner Standard dienten 500 ng $\text{PGF}_{1\alpha}$. Abbildung 34 stellt das Versuchsergebnis graphisch dar.

Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzten und wiedergefundenen PPF_1 zu erkennen, jedoch beträgt die Steigung der Geraden nicht 1, sondern 0,629. Dies bedeutet, daß während der Aufarbeitung bzw. im Massenspektrometer PPF_1 gegenüber $\text{PGF}_{1\alpha}$ diskriminiert werden. Unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors kann $\text{PGF}_{1\alpha}$ jedoch als interner Standard eingesetzt werden.

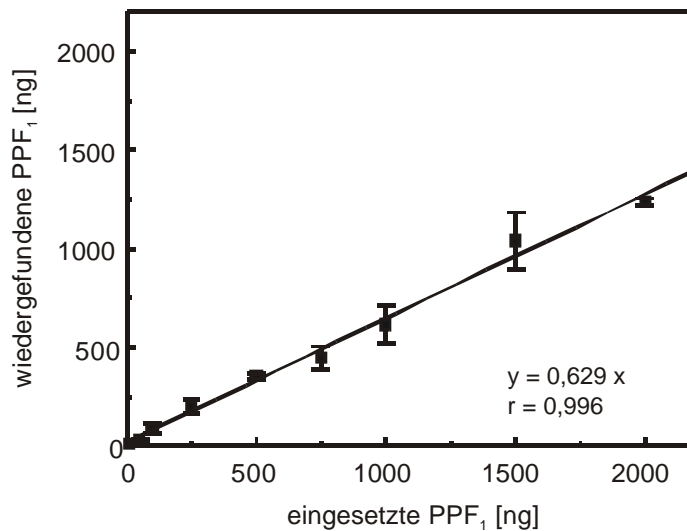


Abb. 34: Genauigkeit und Präzision der quantitativen Bestimmung von PPF_1 , wobei $\text{PGF}_{1\alpha}$ als interner Standard diente. PPF_1 Typ I (10-2000 ng) und $\text{PGF}_{1\alpha}$ (interner Standard, 500 ng) wurden zu 170 mg TG *Nicotiana tabacum*-Zellen hinzugefügt und nach der Methode IV.8.1 aufgearbeitet. Jeder Meßpunkt stellt das Ergebnis einer Dreifachbestimmung dar (Mittelwert \pm S.D., n = 3).

IV.8.2 PPF_1 in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Mittels oben beschriebener Methoden wurden Zellsuspensionskulturen systematisch weit entfernter Pflanzenspezies aufgearbeitet, um das Vorkommen von PPF_1 zu untersuchen.

Die Zellen wurden durch Filtration über einen Büchnertrichter, der mit einem feinen Nylonnetz ausgelegt war, vom Medium getrennt und direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Untersuchung von *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), *Glycine max* (Fabaceae), *Rauwolfia serpentina* (Apocyanaceae), *Agrostis tenuis* (Poaceae) und *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) dargestellt. In den Suspensionszellen aller untersuchten Arten konnten PPF_1 sowohl in freier als auch in veresterter Form nachgewiesen

werden, wobei die Konzentration der veresterten PPF₁ in der Regel um den Faktor 10 höher war.

| | Freie PPF ₁ | Veresterte PPF ₁ |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | [ng/g TG] | |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | 37 ± 6 | 150 ± 12 |
| <i>Glycine max</i> | 317 ± 60 | 3320 ± 195 |
| <i>Rauwolfia serpentina</i> | 23 ± 6 | 897 ± 236 |
| <i>Agrostis tenuis</i> | 38 ± 6 | 2542 ± 56 |
| <i>Eschscholtzia californica</i> | 153 ± 15 | 1263 ± 64 |

Tab. 5: Vorkommen der PPF₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen (Mittelwert ± S.D., n = 3).

IV.8.3 PPF₁ in intakten Pflanzen

Neben Zellsuspensionskulturen wurden auch intakte Pflanzen aufgearbeitet, um zu untersuchen, ob PPF₁ ebenfalls in photosynthetisch aktiven Pflanzen vorkommen. Abbildung 35 zeigt die Chromatogramme einer Aufarbeitung frischer Pfefferminzblätter. Die Aufarbeitung wurde wie unter IV.8.1 beschrieben vorgenommen.

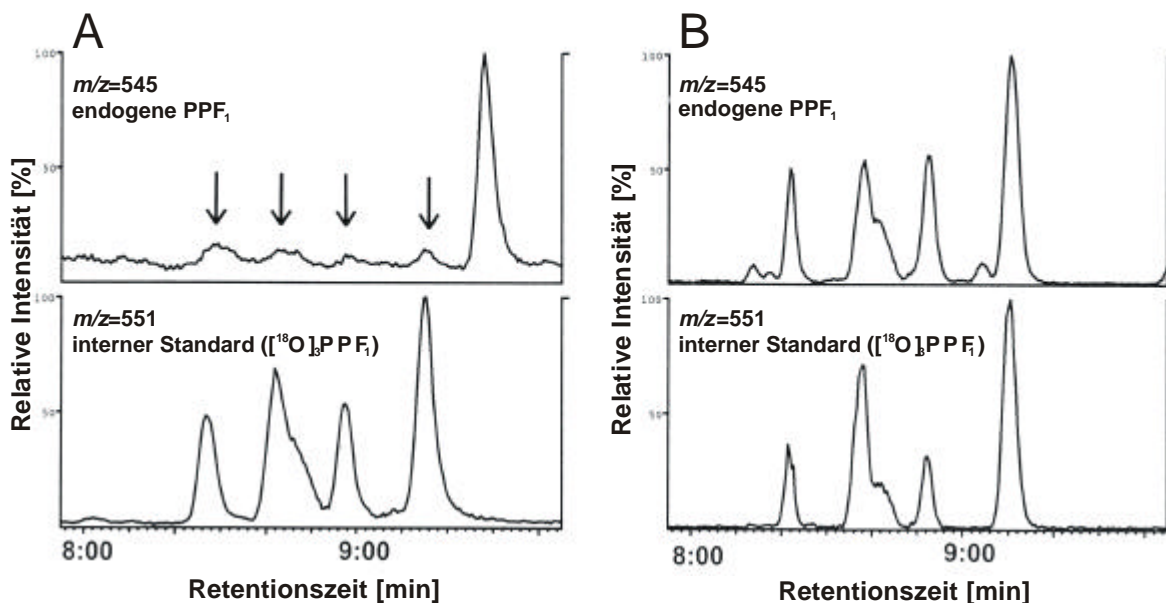


Abb. 35: In der Abbildung sind die Massenchromatogramme der Aufarbeitung frischer Pfefferminzblätter zu sehen. In A sind die Chromatogramme der Aufarbeitung freier PPF₁, in B die Chromatogramme der Aufarbeitung freier und veresteter PPF₁ zu sehen. $m/z = 545$ stellt die endogenen PPF₁ dar, $m/z = 551$ den internen Standard.

Um PPF₁-Konzentrationen in pflanzlichen Zellkulturen mit den Konzentrationen in intakten Pflanzen zu vergleichen, wurden frische *Nicotiana tabacum*-Blätter aufgearbeitet. Die Konzentration an freien PPF₁ konnte mit $3.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g TG}$, die veresteter PPF₁ mit

IV. Ergebnisse

12.2 ± 1.2 µg/g TG (Mittelwert ± S.D., n = 3) bestimmt werden. Somit waren die Konzentrationen der PPF₁ in intakten Pflanzen im Vergleich zu den Zellkulturen (Tab. 5) um den Faktor 100 erhöht.

In weiteren Aufarbeitungen wurden frische Arzneipflanzen und die entsprechenden Drogen (siehe IV.8.4.1) auf ihren Gehalt an PPF₁ untersucht.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Untersuchung frischer Arzneipflanzen aufgeführt:

| | Freie PPF ₁ | Veresterte PPF ₁ | Freie/Veresterte PPF ₁ |
|------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | [ng/g TG] | | |
| Valerianae radix | 43 ± 5 | 470 ± 84 | 1:10.9 |
| Hyperici herba | 211 ± 84 | 2805 ± 106 | 1:13.3 |
| Tiliae flos | 135 ± 11 | 838 ± 52 | 1:6.2 |
| Betulae folium | 1380 ± 14 | 3940 ± 1320 | 1:2.9 |
| Menthae folium | 680 ± 13 | 11690 ± 1520 | 1:17.2 |

Tab. 6: Vorkommen der PPF₁ in frischen Arzneipflanzen (Mittelwert ± S.D., n = 3).

IV.8.4 PPF₁ in getrocknetem Pflanzenmaterial

IV.8.4.1 PPF₁ in Teedrogen

Bei der Lagerung von Pflanzenmaterial ist mit einer Oxidation von Linolenat zu rechnen. Daher wurden handelsübliche Teedrogen auf ihren Gehalt an PPF₁ hin untersucht (Tab. 7). Diese Teedrogen stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München; die Lagerzeit der Teedrogen konnte nicht genau bestimmt werden, überschritt jedoch mindestens zwei Jahre.

| | Freie PPF ₁ | Veresterte PPF ₁ | Freie/Veresterte PPF ₁ |
|------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | [ng/g TG] | | |
| Valerianae radix | 5334 ± 683 | 7500 ± 2420 | 1:1.4 |
| Hyperici herba | 3225 ± 393 | 10323 ± 1184 | 1:3.2 |
| Tiliae flos | 5477 ± 370 | 7855 ± 2660 | 1:1.4 |
| Betulae folium | 11512 ± 445 | 22306 ± 4425 | 1:1.9 |
| Menthae folium | 20010 ± 760 | 47280 ± 1400 | 1:2.3 |
| Colchici semen | 2406 ± 497 | 2680 ± 558 | 1:1.1 |

Tab. 7: Vorkommen der PPF₁ in verschiedenen getrockneten Teedrogen (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Der Vergleich der PPF₁-Konzentration in intakten Pflanzen (siehe IV.8.3) und in den Teedrogen läßt deutlich erkennen, daß der PPF₁-Gehalt der Teedrogen stark erhöht ist. Betrachtet man das Verhältnis von freien PPF₁ zu veresterten PPF₁, stellt man fest, daß dieses Verhältnis bei dem getrockneten Pflanzenmaterial zugunsten freier PPF₁ verschoben ist. Vermutlich ist diese Verschiebung auf Lipaseaktivitäten zurückzuführen, die während des Trocknungsprozesses noch aktiv waren und PPF₁ bzw. Linolensäure aus Membranen herausgelöst haben.

IV.8.4.2 PPF₁ in Teezubereitungen

Isoprostane sind im Säugetierorganismus bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen biologisch aktiv (siehe I.2.3.4). Es besteht die Möglichkeit, daß Phytoprostane aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Isoprostanen ähnliche Wirkungen im Säugetierorganismus aufweisen. Eine Möglichkeit, PPF₁ dem Säugetier zuzuführen, ist die orale Aufnahme.

Da in den untersuchten getrockneten Teedrogen hohe Konzentrationen an nicht veresterten PPF₁ (Menthae folium 20010 ± 760 ng PPF₁/g TG) gefunden wurden, sollte als nächstes überprüft werden, ob PPF₁ während einer Teezubereitung in das Teewasser übergehen.

Zur Klärung dieser Frage wurde ein Tee aus den unter IV.8.4 eingesetzten Pfefferminzblättern hergestellt: 1.5 g der Teedroge wurden mit 150 ml kochendem Wasser übergossen und 8 min extrahiert. Anschließend wurde der Tee über Filterpapier gefiltert und 20 ml des erkalteten Filtrats wurden mit 500 ng [¹⁸O]₃PPF₁, 200 µl 1 M Zitronensäure, 400 µl 5%iger methanolischer BHT-Lösung und 20 ml Ether versetzt. Der Extraktionsansatz wurde dann 3 min mit einem Ultraturrax homogenisiert und anschließend 10 min bei 2900 x g zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt. Die anschließende Aufreinigung und Derivatisierung wurde wie unter IV.8.1.1 beschrieben vorgenommen.

Es stellte sich heraus, daß 90% der freien PPF₁ [18103 ± 635 ng/g TG (Mittelwert ± S.D., n = 3)] durch die Wasserextraktion aus den Teedrogen herausgelöst wurden.

Bei der Durchführung einer Wasserdampfdestillation der Pfefferminzblätter nach DAB konnten, wie aufgrund der polaren Struktur der PPF₁ zu erwarten, keine PPF₁ im Destillat nachgewiesen werden.

IV.8.5 Phytoprostane in Pollen

Pollen besitzen einen sehr hohen Anteil an Linolensäure. Es war daher anzunehmen, daß in Pollen auch hohe Konzentrationen an Phytoprostanen vorkommen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Pollen verschiedener Pflanzen (verschiedene *Betula*-Arten und *Picea abies*) auf ihren Gehalt an Phytoprostanen hin untersucht. Da manche Pollen eine sehr harte,

undurchlässige Exine haben, wurden die Extraktionsbedingungen und Aufreinigungsmethoden variiert. Zusätzlich wurden Phytoprostane A₁/B₁, E₁ und F₁ parallel bestimmt. Die Analyse der Phytoprostane A₁/B₁ und E₁ erfolgt nach der Methode von Parchmann (Parchmann und Mueller, 1998). Neuere Untersuchungen zeigten, daß PPA₁ während der Derivatisierung zum PFB-Ester-TMS-Ether zu PPB₁ isomerisieren (unveröffentlichte Daten, Thoma). Somit wurden mit dieser Methode PPA₁ und PPB₁ gemeinsam bestimmt.

200 mg Pollen wurden eingewogen und zu einem Gemisch aus 18 ml Methanol/Chloroform (2:1, v/v) gegeben, welchem 80 µl 1 M Zitronensäure, 0.115 mg BHT, 20 mg TPP sowie 500 ng [¹⁸O]₃PPF₁ und je 100 ng [¹⁸O]₂PPE₁ und [¹⁸O]₁PPB₁ als interner Standard zugesetzt wurden. Die Mischung wurde anschließend 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend über Nacht bei RT unter ständigem Schütteln extrahiert. Anschließend wurden die Pollen bei 2900 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bis zur Trockene eingengt. Dieser Lipidextrakt wurde zur Bestimmung freier Phytoprostane wie unter a) beschrieben aufgearbeitet, während veresterte Phytoprostane wie unter b) beschrieben bestimmt wurden.

a) Bestimmung frei vorliegender Phytoprostane

Der Rückstand wurde in Chloroform rekonstituiert und auf eine 500 mg-SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure (67:33:1, v/v) gewaschen. Im ersten Elutionsschritt wurden PPA₁/B₁ mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure (33:67:1, v/v) von der SiOH-SPE-Säule eluiert. Anschließend folgten zwei weitere Reinigungsschritte mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v). Sowohl PPE₁ als auch PPF₁ wurden anschließend mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von 400 µl 100 mM KOH wurden PPE₁ durch alkalische Dehydratisierung in PPB₁ überführt, während PPF₁ unter diesen Bedingungen stabil waren. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei 40°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Wasser und 50 µl 1 M Zitronensäure gestoppt. Die Phytoprostane wurden anschließend zweimal mit 2 ml Ether extrahiert. Die Etherphasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Die PPE₁, die nun als PPB₁ vorlagen, wurden mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) eluiert, während PPF₁ mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) von der Säule gespült wurden. PPB₁ wurden anschließend zum PFB-Ester-TMS-Ether umgesetzt (Parchmann und Mueller, 1998). PPF₁ wurden vor der Umsetzung zum PFB-Ester-TMS-Ether katalytisch hydriert. Die jeweilige Analyse erfolgte anschließend über GC im NICI-Modus der MS.

b) Bestimmung freier und veresterter Phytoprostane

Der Rückstand wurde in 2 ml 0.1%iger BHT (w/v) in Methanol gelöst. Nach Zusatz von 2 ml 15%iger (w/v) wäßriger KOH wurden die im Extrakt enthaltenen Lipide für 1 h bei 40°C hydrolysiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der pH-Wert auf 3-4 durch Zugabe von 4 ml 1 M Zitronensäure herabgesenkt und der Ansatz mit Wasser auf 40 ml verdünnt. Anschließend wurde dreimal mit 5 ml Hexan ausgeschüttelt, wobei die organischen Phasen verworfen wurden. Die Phytoprostane wurden zweimal mit je 5 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Zunächst wurde die Säule mit 9 ml eines Gemisches aus Hexan/Ether/Essigsäure (67:33:1, v/v) gewaschen. Im folgenden ersten Elutionsschritt wurden PPB₁ mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure (33:67:1, v/v) von der SiOH-SPE-Säule eluiert, wobei zu beachten ist, daß an dieser Stelle nicht mehr zwischen PPA₁/B₁ und PPE₁ unterschieden werden konnte, da nach Alkalibehandlung nur noch PPB₁ vorlagen. Anschließend folgten zwei weitere Reinigungsschritte mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v). Die PPF₁ wurden anschließend mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Es folgte dann die Derivatisierung der einzelnen Proben wie unter a) beschrieben.

In Tabelle 8 sind Aufarbeitungen von *Betula pendula*- und spanischer Blütenpollen (käuflich erwerbbar bei: Alfred Galke GmbH, 37543 Gittelde) angegeben.

| | <i>Betula pendula</i> -Pollen | | Spanische Blütenpollen | |
|--|-------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | frei | verestert | frei | verestert |
| | [ng/g TG] | | [ng/g TG] | |
| PPA ₁ /B ₁ | 149766 ± 11434 | - | 369 ± 85 | - |
| PPE ₁ | 14363 ± 1330 | - | 839 ± 109 | - |
| PPA ₁ /B ₁ /E ₁ | - | 6848 ± 1679 | - | 1423 ± 1023 |
| PPF ₁ | 32440 ± 806 | 2783 ± 2471 | 2390 ± 350 | 3267 ± 1548 |

Tab. 8: Vorkommen der PPA₁/B₁, PPE₁ und PPF₁ in Pollen (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Bei weiteren Analysen von Pollen der Gattungen *Betula* und *Picea* wurden nur PPF₁ in freier und veresterter Form bestimmt. Dafür wurden die unter a) und b) beschriebenen Aufarbeitungen vereinfacht, indem der Rückstand der Extraktion bzw. der Etherextraktion nach der Hydrolyse in Chloroform aufgenommen wurde und direkt auf eine SiOH-SPE-Säule gegeben wurde. Danach wurde mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) und 3 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. Die PPF₁ wurden anschließend mit Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Es folgte die Reduktion zur Dihydro-

verbindung und die Derivatisierung zum PFB-Ester-TMS-Ether für die Bestimmung im NICI-Modus der MS.

Die Gesamtkonzentrationen an PPF₁ in den untersuchten Pollen beliefen sich auf 4.5-58.1 µg/g (Abb. 35). Diese Schwankungen sind vermutlich vom Standort der jeweiligen Pflanze und den Umweltbedingungen abhängig und können nicht mit Gattung oder Art einer Pflanze in Verbindung gebracht werden. Leider konnten diese Zusammenhänge nicht genauer untersucht werden, da die Pollen aus Wildsammlungen stammten, zu denen uns die genauen Standort-Daten nicht zugänglich waren.

Nicht nur die hohen PPF₁-Konzentrationen waren auffällig, sondern auch das Verhältnis von freien zu veresterten PPF₁, da es zu Gunsten freier PPF₁ verschoben war. In den drei zuerst dargestellten Proben aus Abbildung 36 übersteigt die Konzentration freier PPF₁ sogar die Konzentration veresteter PPF₁, was auf unterschiedliche Lipaseaktivitäten in den Pollen hindeuten könnte.

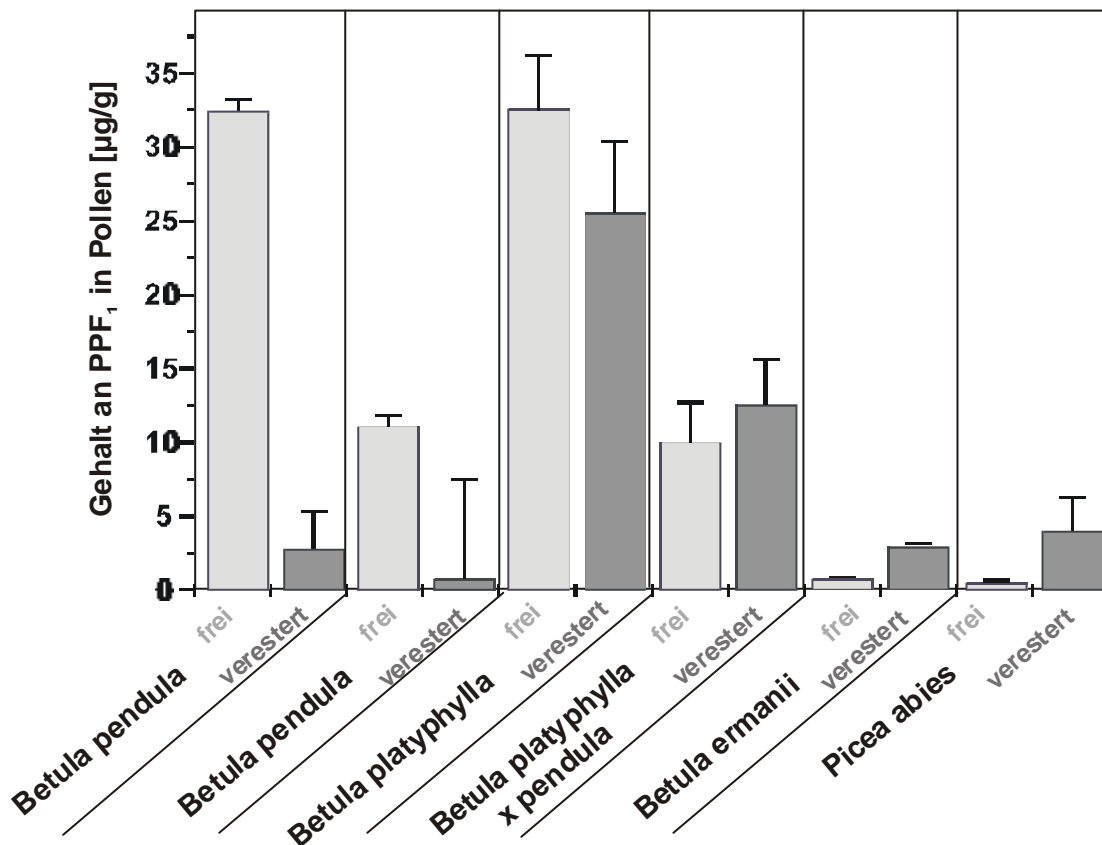


Abb. 36: PPF₁ in Pollen verschiedener Pflanzen. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung in µg/g TG (Mittelwert ± S.D., n = 3).

IV.9 Induktion der PPF₁-Akkumulation in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Nachdem in pflanzlichen Zellen PPF₁ sowohl in freier als auch in veresterter Form nachgewiesen werden konnten (siehe IV.8), stellte sich die Frage, ob eine Akkumulation von PPF₁ durch „oxidativen Stress“ in Pflanzen induziert werden kann, wie es für die C20-homologen Isoprostane im Säugetier bereits gezeigt wurde (Morrow *et al.*, 1990b). Eine oxidative Zellschädigung kann in Pflanzen durch eine Vielzahl anorganischer oder organischer Verbindungen hervorgerufen werden, so z.B. durch *tert*-Butylhydroperoxid (t-BuOOH), Schwermetalle oder Paraquat.

t-BuOOH ist selbst eine reaktive Sauerstoffspezies und kann Lipidperoxidation auslösen. Schwermetalle, wie z.B. Kupfer, sind für Pflanzen essentielle Mineralstoffe, schädigen jedoch in zu hohen Konzentrationen die Zelle. Die Toxizität beruht auf der oxidativen Schädigung von Zellen (Stohs und Bagachi, 1995), die unter anderem durch eine Lipidperoxidation hervorgerufen wird. Lipidperoxidation wird ebenfalls durch das Herbizid Paraquat verursacht, das in das Photosystem I eingreift und dort Elektronen unter Bildung von O₂^{•-} abfängt. O₂^{•-} ist eine reaktive Sauerstoffspezies, welche bei der Erzeugung durch Paraquat vor allem die Chloroplastenmembran schädigt.

Die genannten Stressoren wurden zum Medium verschiedener Suspensionszellkulturen hinzugefügt (siehe III.5.1). Der Verlauf der resultierenden PPF₁-Akkumulation wurde über mehrere Stunden verfolgt.

IV.9.1 Behandlung von *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen mit *tert*-Butylhydroperoxid

Um die Auswirkungen von „oxidativem Stress“ auf die Bildung von PPF₁ in Pflanzenzellen zu überprüfen, wurden *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen t-BuOOH in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt (siehe III.5.1). Dabei konnte nach 2.5 h ein dramatischer Konzentrationsanstieg veresterter PPF₁ beobachtet werden (Abb. 37 B), der nach 4 bis 5 h ein Maximum bei 12 µg/g TG erreichte. Diese PPF₁-Konzentration blieb über den weiteren Meßzeitraum konstant.

Die Konzentration der freien PPF₁ stieg nach 3 h an und erreichte ein Maximum von 1.6 µg/g TG nach 12 h, wobei der Gehalt an freien PPF₁ anschließend wieder abfiel (Abb. 37 A).

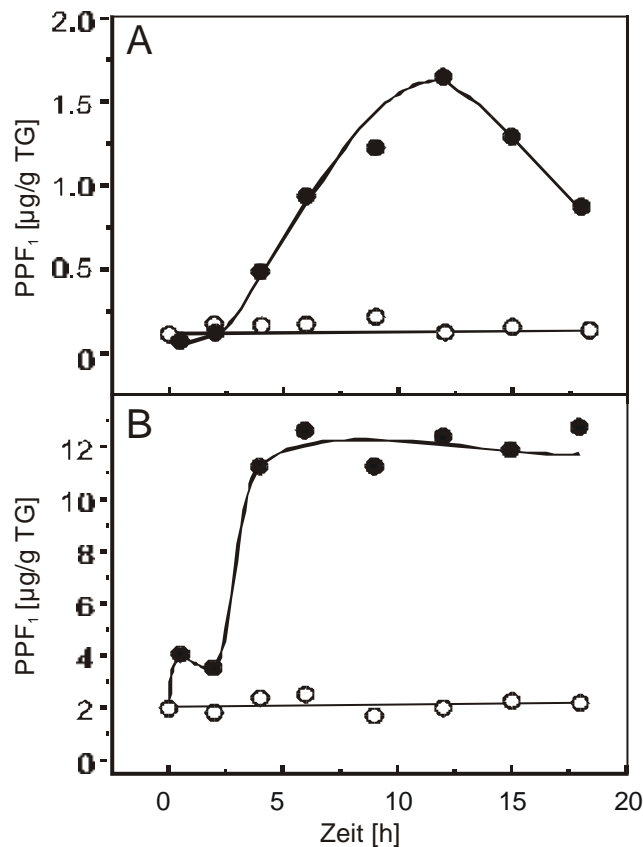


Abb. 37: Induktion freier (A) und veresterter (B) PPF₁ in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Zusatz von t-BuOOH (Endkonzentration 10 mM) (●) im Vergleich zu den PPF₁-Konzentrationen der Kontrolle (○).

IV.9.2 Behandlung von *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen mit Kupfer(II)acetat

Eschscholzia californica-Zellsuspensionskulturen wurden mit einer Endkonzentration von 500 μM Kupfer(II)acetat im Medium behandelt. Dabei konnte eine biphasische Induktion der PPF₁-Bildung beobachtet werden. Nach 2 bis 3 h stieg die Konzentration veresterter PPF₁ an und erreichte ein erstes Maximum nach 6 h (20 $\mu\text{g/g}$ TG) (Abb. 38 B). Der Gehalt an veresterten PPF₁ fiel im weiteren Verlauf ab und stieg nach 14-17 h auf über 30 $\mu\text{g/g}$ TG an. Die Konzentration freier PPF₁ erreichte nach 9 h ein erstes Maximum (2.8 $\mu\text{g/g}$ TG), nahm anschließend ab und stieg nach 15 h erneut an (Abb. 38 A).

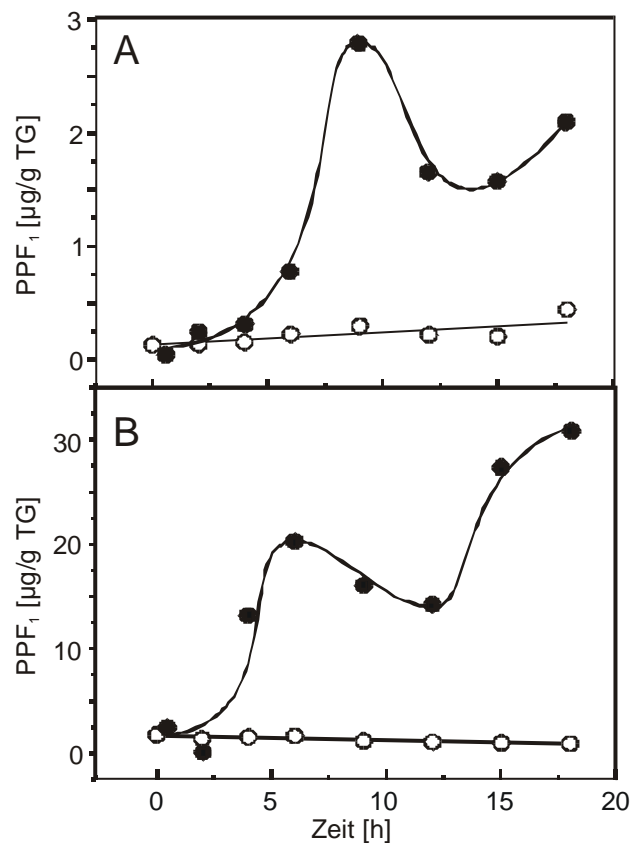


Abb. 38: Induktion freier (A) und veresterter (B) PPF₁ in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Behandlung mit $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ (Endkonzentration 500 μM) (●) im Vergleich zu den PPF₁-Konzentrationen unbehandelter Zellen (○).

IV.9.3 Behandlung von *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen mit Eisen(II)sulfat

Eschscholzia californica-Zellsuspensionskulturen wurden mit Eisen(II)sulfat (Endkonzentration 500 μM) behandelt. Dabei konnte zunächst ein leichter Anstieg der Konzentration freier PPF₁ über 15 h beobachtet werden (Abb. 39 A). Im weiteren Verlauf konnte nach 18 h eine Gehaltssteigerung auf 6.8 μg PPF₁/g TG verzeichnet werden. Die Konzentration der veresterten PPF₁ erreichte bereits nach 12 h ein Maximum von 83.11 μg /g TG, wobei die Konzentration der PPF₁ nach 18 h wieder auf den Ausgangswert von 7.75 μg /g TG abfiel (Abb. 39 B).

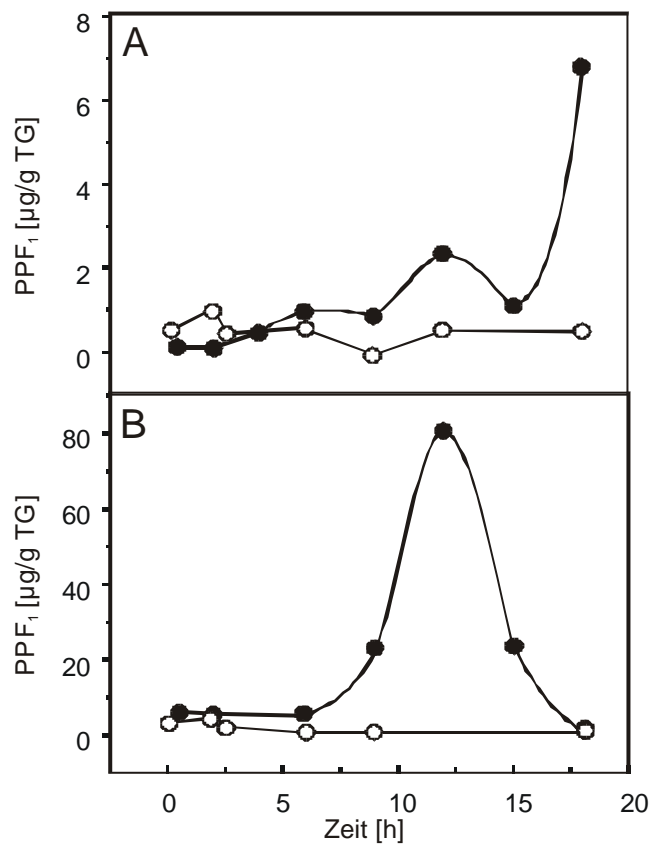


Abb. 39: Induktion freier (A) und veresteter (B) PPF₁ in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Zusatz von FeSO₄ (Endkonzentration 500 μM) (●) im Vergleich zu den PPF₁-Konzentrationen der Kontrollzellen (○).

IV.9.4 Behandlung von *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen mit Paraquat

In einem weiteren Versuch wurde dem Medium von *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen Paraquat (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt. Die Konzentration freier PPF₁ stieg nach 4 h an und erreichte ein Maximum von 3.7 µg/g TG nach 15 h, wobei die Konzentration der freien PPF₁ anschließend wieder auf den Ausgangswert abfiel (Abb. 40 A). Der Gehalt an veresterten PPF₁ stieg nach 4 h an und erreichte ein Plateau von ca. 6 µg/g TG, das über 9 h gehalten wurde und nach 15 h langsam abfiel (Abb. 40 B).

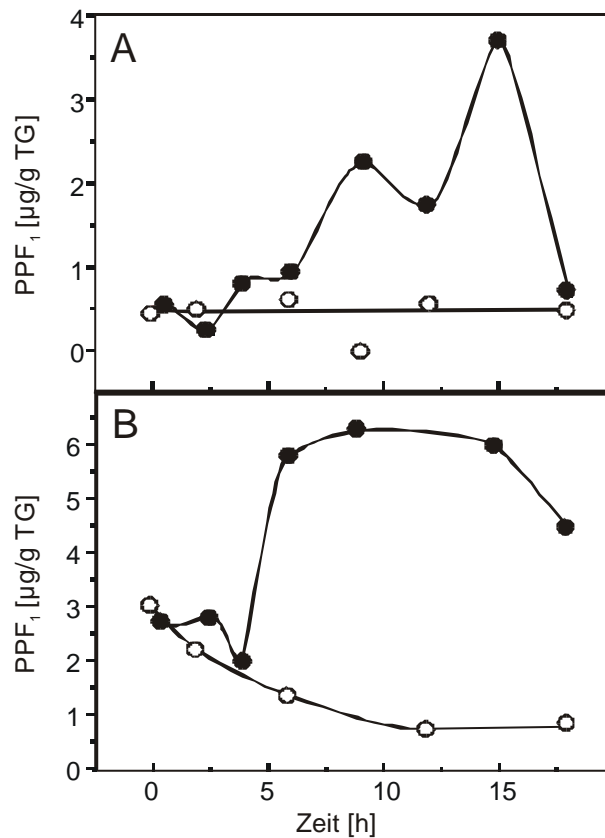


Abb. 40: Induktion freier (A) und veresteter (B) PPF₁ in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Zusatz von Paraquat (Endkonzentration 1 mM) (●) im Vergleich zu den PPF₁-Konzentrationen der Kontrolle (○).

IV.9.5 Behandlung von *Nicotiana tabacum*-Zellsuspensionskulturen mit Quecksilber(II)chlorid

Nicotiana tabacum-Zellsuspensionskulturen wurden mit einer Endkonzentration von 1 mM Quecksilber(II)chlorid behandelt.

Der Gehalt an freien PPF₁ stieg nach 2 h an und erreichte nach 4 h ungefähr das Dreifache der PPF₁-Konzentration der Kontrolle (Abb. 41 A). Der Gehalt an veresterten PPF₁ stieg nach 3.5 h auf ein Maximum an, das etwa ein Achtfaches (3.9 µg/g TG) der Konzentration nicht elicierter Zellen (0.5 µg/g TG) (Abb. 41 B) betrug. Anschließend fiel die Konzentration veresterter PPF₁ ab.

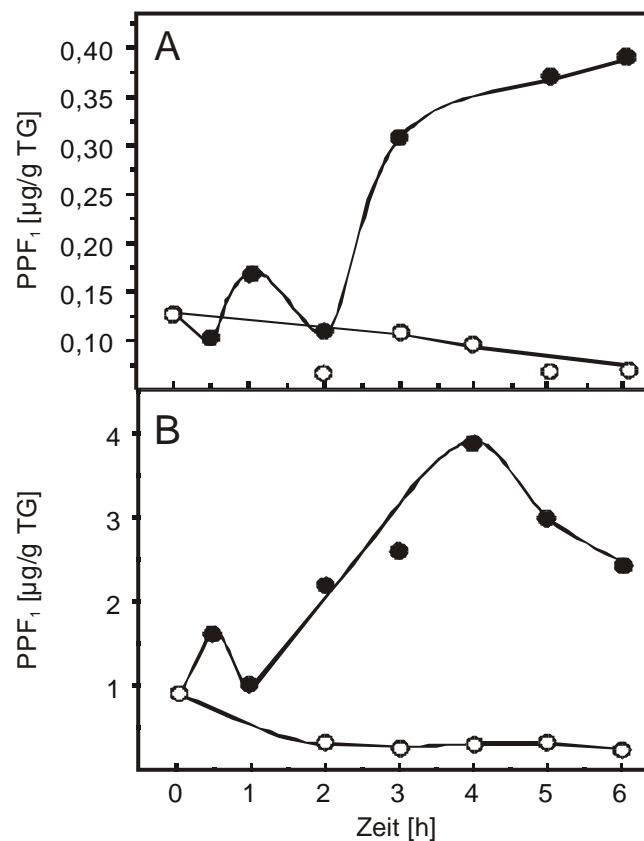


Abb. 41: Induktion freier (A) und veresterter (B) PPF₁ in *Nicotiana tabacum*-Zellsuspensionskulturen nach Zusatz von HgCl₂ (Endkonzentration 1 mM) (●) im Vergleich zu den PPF₁-Konzentrationen der Kontrolle (○).

IV.10 Induktion der PPF₁-Akkumulation in intakten Pflanzen

IV.10.1 Induktion der PPF₁-Akkumulation in frischen Pfefferminzblättern durch Verwundung

Orozco-Cárdenas und Ryan konnten 1999 zeigen, daß eine Verwundung von Tomatenpflanzen mit der Bildung von Wasserstoffperoxid einhergeht (Orozco-Cárdenas und Ryan, 1999).

Um zu überprüfen, ob Verwundung die PPF₁-Bildung induziert, wurden frische Pfefferminzblätter (*Mentha piperita*, Lamiaceae) abgeschnitten und mit einem Nagelbrett (12 Nägel/cm²) verwundet. Zusätzlich wurden intakte Blätter als Kontrolle aufbewahrt. Sowohl verwundete als auch unversehrte Blätter wurden in einer Kammer mit wassergesättigter Atmosphäre gelagert, was ein Austrocknen der Blätter verhinderte. Zu den in Abbildung 42 angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der verwundeten und der unversehrten Blätter entnommen und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter IV.8.1 beschrieben.

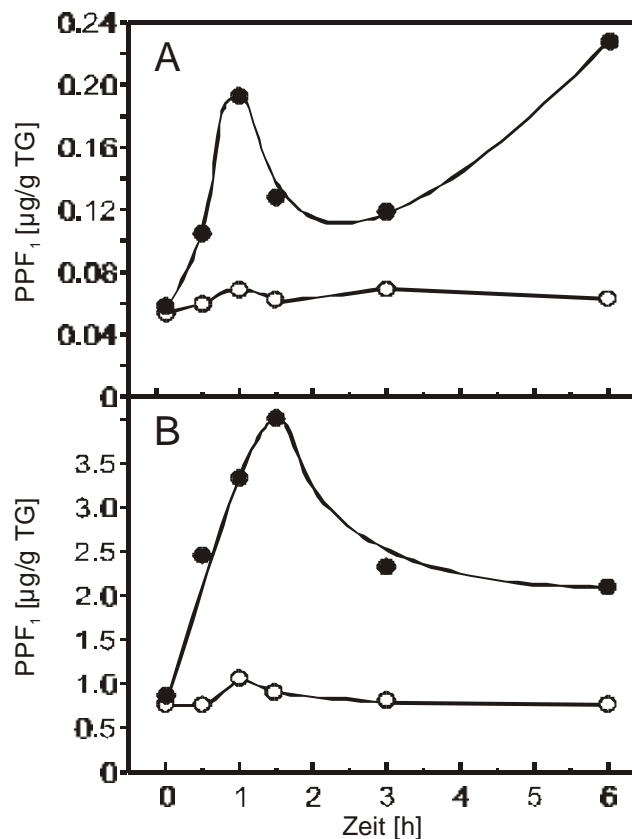


Abb. 42: Induktion freier (A) und veresterter (B) PPF₁ durch Verwundung (●) im Vergleich zu nicht verwundeten Blättern (○).

Die Konzentration an freien PPF₁ stieg innerhalb von 1 h auf ein Maximum von 0.19 µg/g TG (das Vierfache der Kontrolle) und fiel anschließend wieder ab. Ein weiterer Anstieg war nach

3 h zu beobachten (Abb. 42 A). Der Gehalt an veresterten PPF₁ nahm nach der Verwundung ebenfalls zu und erreichte nach 1.5 h ein Maximum von 4 µg/g TG (Abb. 42 B).

Das Abschneiden der Blätter stellt selbst eine Verwundung dar, wobei es allerdings nur zu einer schwachen Lipidperoxidation kam, wie der Verlauf der Kontrollwerte zeigte.

IV.10.2 Induktion der PPF₁-Akkumulation in Bohnen nach Besprühen mit Paraquat

In *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen konnte die PPF₁-Synthese durch Zusatz von Paraquat induziert werden (siehe IV.9.4). Da Paraquat das Photosystem I der Photosynthese hemmt, werden ROS vor allem in Chloroplasten unter Lichteinstrahlung gebildet. Daher ist zu erwarten, daß der Effekt von Paraquat bei intakten, im Licht stehenden Pflanzen sehr viel ausgeprägter ist als in heterotroph lebenden Zellsuspensionskulturen, so daß sowohl Lipidperoxidation als auch PPF₁-Bildung in den Pflanzen stark erhöht sind.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurden junge Bohnenpflanzen (*Vicia faba*, Fabaceae) mit einer 1 mM wäßrigen Paraquatlösung besprüht. Die Bohnenpflanzen waren 14 Tage alt und besaßen in der Regel bereits 6 Laubblätter. Als Kontrolle dienten Bohnenpflanzen der gleichen Aussaat, die nicht mit Paraquat behandelt wurden. Da Paraquat in die Photosynthese eingreift, wurden Blätter für die Analyse verwendet. Die Blätter der Bohnen wurden nach 3.5 h geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren, wobei sie zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich nekrotische Bereiche ausgebildet hatten. Diese nekrotischen Stellen deuten auf eine starke Lipidperoxidation hin (Mosier *et al.*, 1990). Wie unter IV.8.1 beschrieben wurde der Gehalt an PPF₁ im Pflanzenmaterial bestimmt. Die Konzentration freier PPF₁ war in den mit Paraquat behandelten Pflanzen im Vergleich mit der in unbehandelten Pflanzen nur unbedeutend erhöht, während die Konzentration membrangebundener PPF₁ unverändert war (Abb. 43).

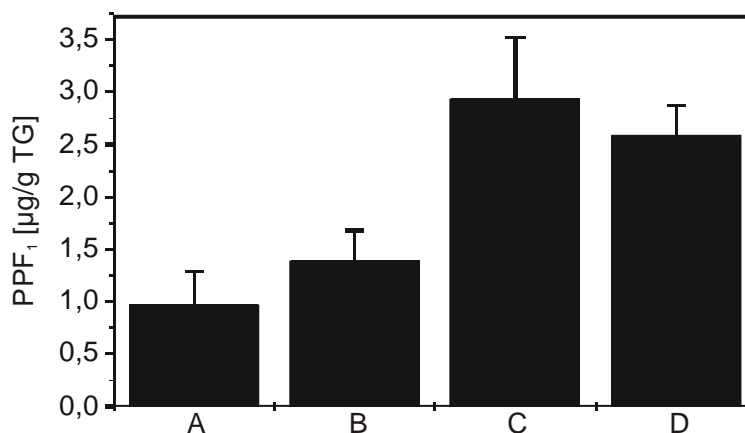


Abb. 43: Behandlung junger Bohnenpflanzen mit 1 mM Paraquat. A: Konzentration freier PPF₁ in den Kontrollpflanzen; B: Konzentration freier PPF₁ in den mit Paraquat behandelten Pflanzen; C: Konzentration veresteter PPF₁ in den Kontrollpflanzen; D: Konzentration veresteter PPF₁ in den mit Paraquat behandelten Pflanzen. Angegeben ist die Konzentration in µg PPF₁/g TG (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Anschließend wurde ein PPF₁-Konzentrationsverlauf über 30 h nach Besprühen von Pflanzen mit 100 µM Paraquat aufgenommen. Die Konzentration wurde von 1 mM auf 100 µM gesenkt, um die Ausbildung von Nekrosen zu verzögern. Optisch konnten jedoch auch bei der niedrigeren Konzentration erste Nekrosen der Blätter bereits nach 30 min beobachtet werden. Die Konzentration der freien PPF₁ schwankte sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Pflanzen über einen Zeitraum von 30 h um einen Wert von 0.5 µg/g TG (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der Kinetik freier PPF₁ erhärtete den bereits oben genannten Befund, daß Paraquat die Synthese der PPF₁ in Blättern nicht induziert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Hypothese, daß Lipidperoxidation immer mit einer entsprechend erhöhten Konzentration von PPF₁ korreliert. Das Ergebnis kann gegenwärtig nicht interpretiert werden.

IV.11 Messung der Sekundärstoffakkumulation in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen nach Zugabe von PPF₁

Mittels einfacher Testsysteme sollte überprüft werden, ob PPF₁ die Akkumulation von Phytoalexinen in verschiedenen pflanzlichen Zellsuspensionskulturen induzieren. Um den Testverfahren die größtmögliche Konstanz zu geben, wurden die Zellen immer nach einem bestimmten Rhythmus eingewogen, kultiviert, ausplattiert und elicitiert (siehe III.5.2). Um trotzdem auftretende natürliche Schwankungen zu berücksichtigen, wurde grundsätzlich gegen eine Negativkontrolle (Zellen mit entsprechendem Lösungsmittel ohne Elicitor) und Jasmonsäure als Positivkontrolle gemessen. Als PPF₁-Elicitor diente ein Autoxidationsgemisch, das theoretisch aus 32 Isomeren bestand (siehe IV.3.1). Dieses Gemisch wurde zwar säulenchromatographisch gereinigt, enthielt jedoch noch geringe Mengen an Verunreinigungen.

IV.11.1 Induktion der Benzophenanthridinalkaloidproduktion in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen

Dieser Test beruht auf der Produktion von antibiotisch wirksamen Benzophenanthridinalkaloiden wie Sanguinarin und Chelirubin (Abb. 44), die nach Elicitierung in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen gebildet werden. Die Alkaloide können aus den Zellen mit salzsaurem Ethanol extrahiert und die Konzentrationen anschließend mittels eines photometrischen Verfahrens bestimmt werden (siehe III.5.2.1).

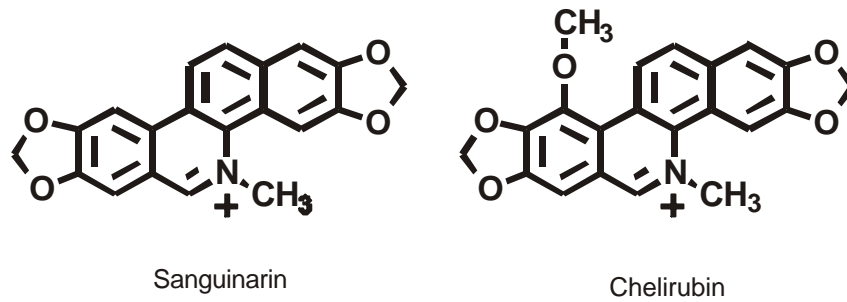


Abb. 44: Benzophenanthridinalkaloide von *Eschscholzia californica* (Papaveraceae).

In einem ersten Versuch wurde die Benzophenanthridinalkaloidproduktion in Abhängigkeit von der Konzentration an PPF₁ untersucht.

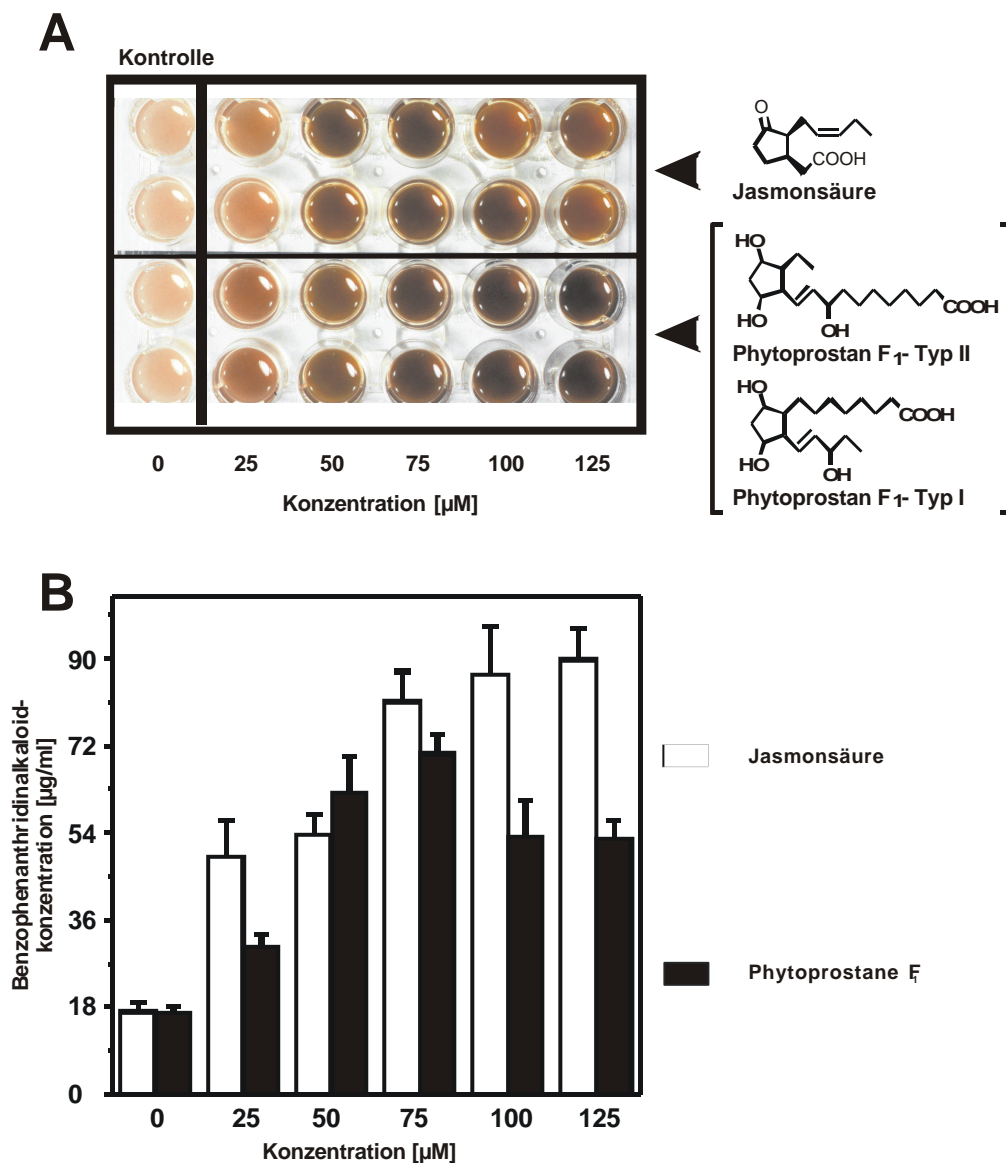


Abb. 45: Konzentrationsabhängigkeit der Benzophenanthridinalkaloidproduktion in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen. Abbildung A zeigt eine Multiwellschale: die rote Farbe wird durch die akkumulierten Alkaloide hervorgerufen. In Abbildung B ist die Auswertung in µg Benzophenanthridinalkaloide/ml Zellkultur (Mittelwert ± S.D., n = 3) dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von PPF₁ die Akkumulation von Benzophenanthridinalkaloiden steigert (Abb.45). Im Konzentrationsbereich zwischen 50–75 µM entsprach die durch PPF₁ induzierte Benzophenanthridinalkaloidproduktion der durch Jasmonsäure hervorgerufenen Alkaloidbildung, während in höheren Konzentrationsbereichen Jasmonsäure eine stärkere Alkaloidakkumulation hervorrief. Bei PPF₁-Konzentrationen oberhalb 125 µM starben die Zellen im Versuchsansatz ab, so daß die Versuche nicht ausgewertet werden konnten.

In einem weiteren Versuch wurde die Zeitabhängigkeit der Benzophenanthridinalkaloidproduktion in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Elicitierung mit Jasmonsäure bzw. PPF₁ untersucht. Die Alkaloidkonzentration der Elicitierungsansätze, denen 100 µM Elicitor (Endkonzentration) zugesetzt wurde, wurde über einen Zeitraum von 110 h verfolgt.

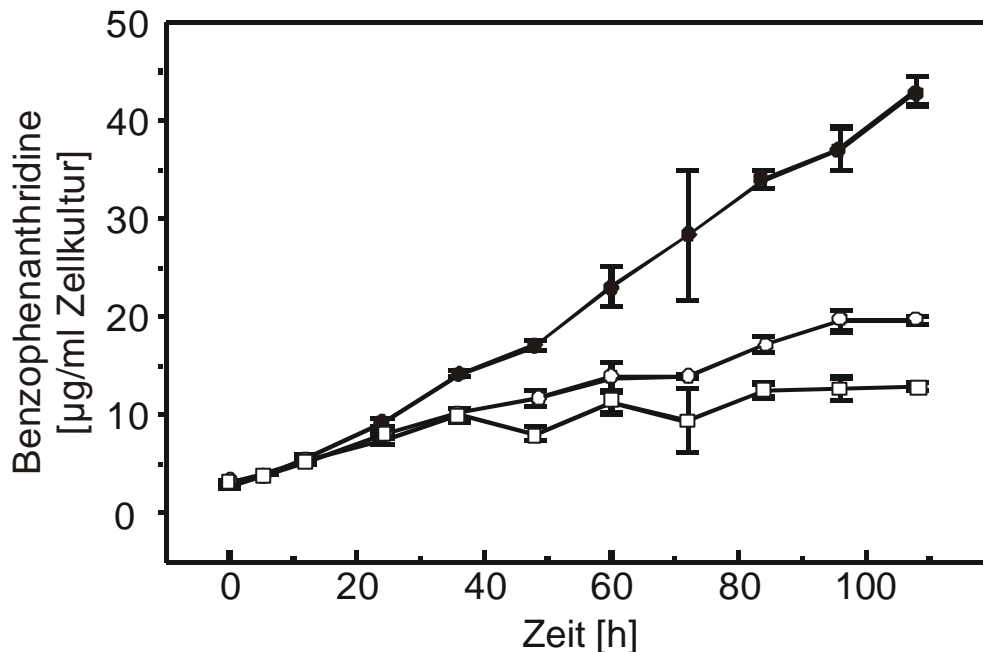


Abb. 46: Zeitlicher Verlauf der Alkaloidakkumulation in einer *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskultur nach Elicitierung mit 100 µM PPF₁ (○) bzw. 100 µM Jasmonsäure (■). Zusätzlich wurde zu den gegebenen Zeitpunkten die Alkaloidkonzentration in einer nicht behandelten Zellsuspensionskultur bestimmt (□). Angegeben sind die Konzentrationen in µg/ml Zellkultur (Mittelwert ± S.D., n = 3).

In Abbildung 46 ist das Ergebnis dieses Versuches graphisch dargestellt. Die Konzentration an Benzophenanthridinalkaloiden nach Elicitierung mit Jasmonsäure stieg bereits nach 20 h an und erreichte nach 110 h ein Maximum mit 44 µg Alkaloide/ml Zellkultur. Die Elicitierung mit 100 µM PPF₁ fiel in diesem Versuch deutlich schwächer aus (Maximum von 19 µg Alkaloide/ml Zellkultur).

Das PPF₁-Gemisch induzierte in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen die Synthese von Benzophenanthridinalkaloiden. In weiterführenden Versuchen wurde ein PPF₁-Gemisch über RP-HPLC aufgereinigt (siehe IV.3.3) und wiederum im *Eschscholzia californica*-Testsystem eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Zugabe von reinen Regioisomeren des Typs I (Abb. 19 Peak 1 und 3) und II (Abb. 19 Peak 2 und 4) die Benzophenanthridinalkaloidsynthese nicht steigerten. In Abbildung 47 ist das Ergebnis eines Multischalentests dargestellt, bei dem PPF₁ Typ I (Abb. 19 Peak 3) und II (Abb. 19 Peak 4) in Konzentrationen von 1-250 µM eingesetzt wurden.

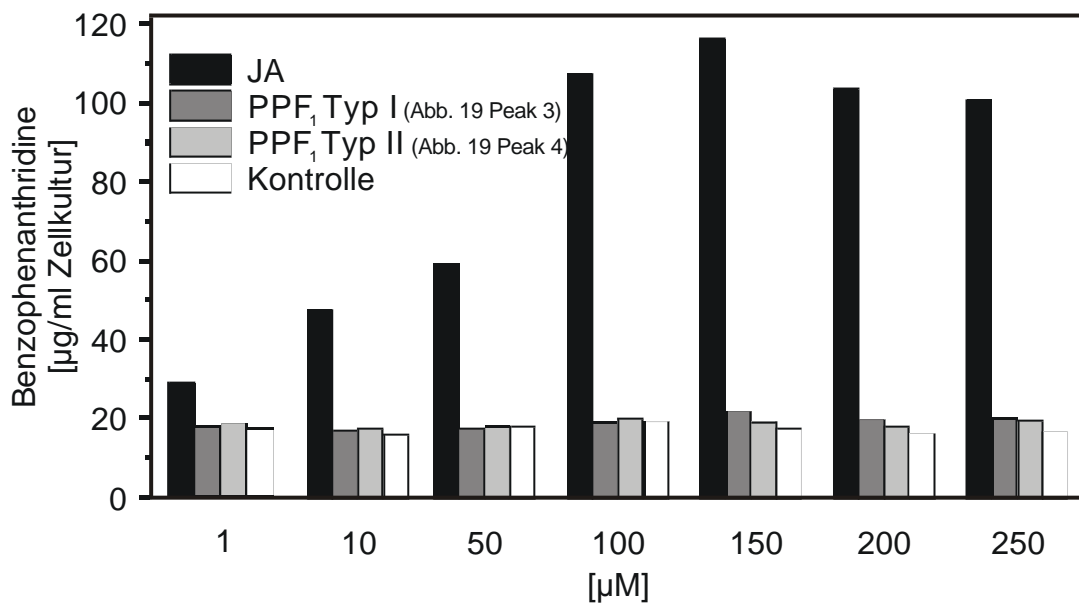


Abb. 47: Benzophenanthridinalkaloidakkumulation in *Eschscholzia californica*-Zellsuspensionskulturen nach Elicitor-Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen.

IV.11.2 Induktion der Isobavachalkonsynthese in *Crotalaria cobalticola*-Zellsuspensionskulturen

Ein weiteres Testsystem, in dem die eingesetzten Zellen mit der Bildung von Phytoalexinen auf Elicitorzugabe reagieren, wurde mit *Crotalaria cobalticola* (Fabaceae) erstmals von Gundlach (Gundlach *et al.*, 1992) beschrieben. *Crotalaria cobalticola* synthetisiert das antibiotisch wirksame Isobavachalkon (Abb. 48), ein isoprenyliertes Chalkonderivat, dessen Konzentration in der Zellkultur nach Elicitierung mit Hefezellwandfragmenten und Methyljasmonat binnen weniger Stunden ansteigt.

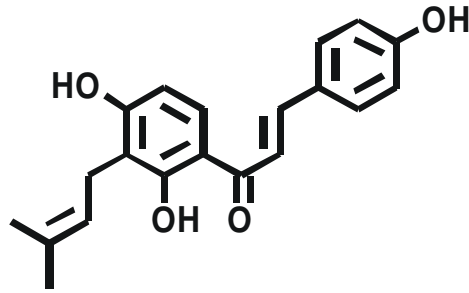


Abb. 48: Isobavachalkon: ein antibiotisch wirksamer Sekundärstoff in *Crotalaria cobalticola* (Fabaceae).

Dieses Testsystem wurde eingesetzt, um in einer weiteren Zellkultur die Induktion von Phytoalexinen durch Zugabe von PPF₁ zu untersuchen. Dazu wurde eine HPLC-Trennmethode entwickelt, die die selektive Quantifizierung von Isobavachalkon ermöglichte (siehe III.5.2.2). Abbildung 49 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Induktion der Isobavachalkonsynthese.

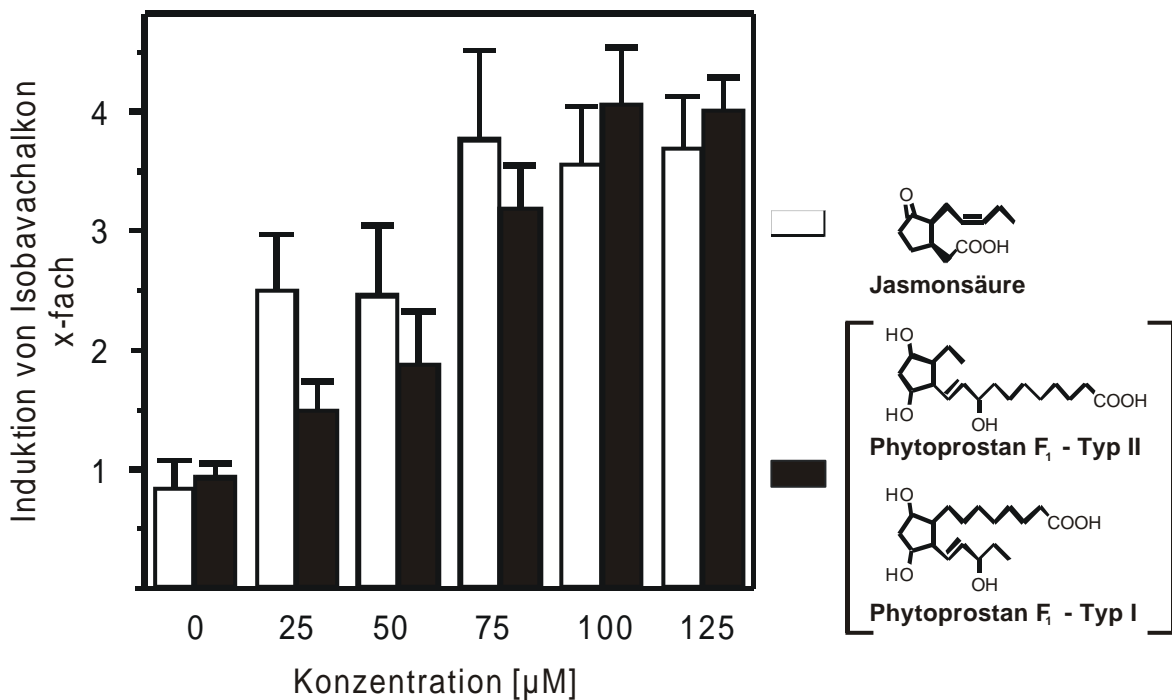


Abb. 49: Konzentrationsabhängigkeit der Isobavachalkonakkumulation bei Elicitierung mit Jasmonsäure bzw. PPF₁. Angegeben ist die Steigerung des Isobavachalkongehaltes der elicitierten Zellen in Bezug auf das Niveau unbehandelter Zellen (Mittelwert \pm S.D., n = 3).

Der Gehalt an Isobavachalkon stieg mit zunehmender Elicitorkonzentration an, wobei Jasmonsäure in dem niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 25 und 50 μ M eine stärkere Induktion erzielte als PPF₁. Im Konzentrationsbereich zwischen 75 und 125 μ M fiel die Steigerung des Isobavachalkongehaltes gleich stark aus. In einem weiteren Versuch wurde die Zeitabhängigkeit der Isobavachalkonsynthese vermessen, die in Abbildung 50 illustriert ist.

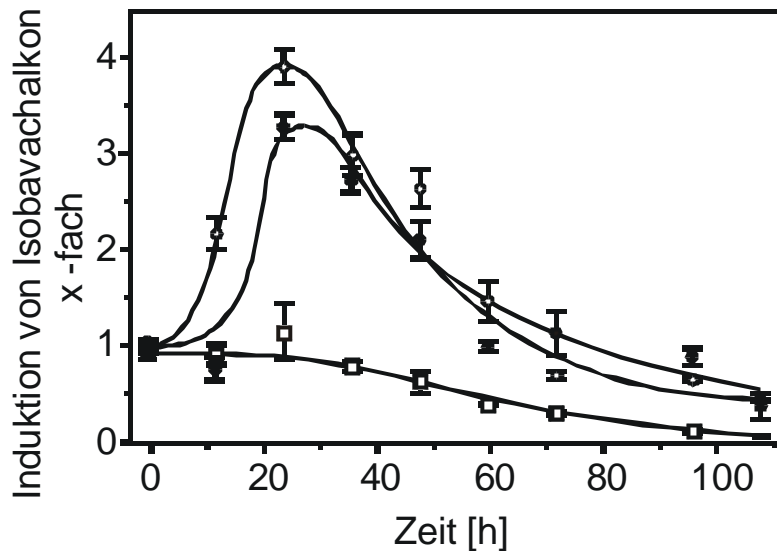


Abb. 50: Zeitlicher Verlauf der Isobavachalkonsynthese einer *Crotalaria cobalticola*-Zellsuspensionskultur nach Zugabe von 100 µM Jasmonsäure (●), 100 µM PPF₁ (○) oder Methanol als Kontrolle (□). Angegeben ist die Steigerung in Bezug auf das Niveau unbehandelter Zellen (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Der Gehalt an Isobavachalkon durchlief bereits nach 24 h ein Maximum und sank dann innerhalb der folgenden 60 h fast auf das Niveau der Kontrolle ab. Die Abnahme der Isobavachalkonkonzentration kann so gedeutet werden, daß diese Verbindung ein Intermediat der Biosynthese weiterer, vermutlich glykosylierter Flavonoide ist.

IV.11.3 Induktion der Isochinolinalkaloidbiosynthese in *Thalictrum tuberosum*-Zellsuspensionskulturen

Thalictrum tuberosum (Ranunculaceae) akkumuliert antibiotisch wirksame Isochinolinalkaloide. Zu diesen Isochinolinalkaloiden gehören Scoulerin, Columbamin und Berberin, die sich über HPLC trennen und photometrisch bei 280 nm detektieren lassen. In Abbildung 51 sind die drei Alkaloide entsprechend ihres Auftretens im Biosyntheseweg dargestellt.

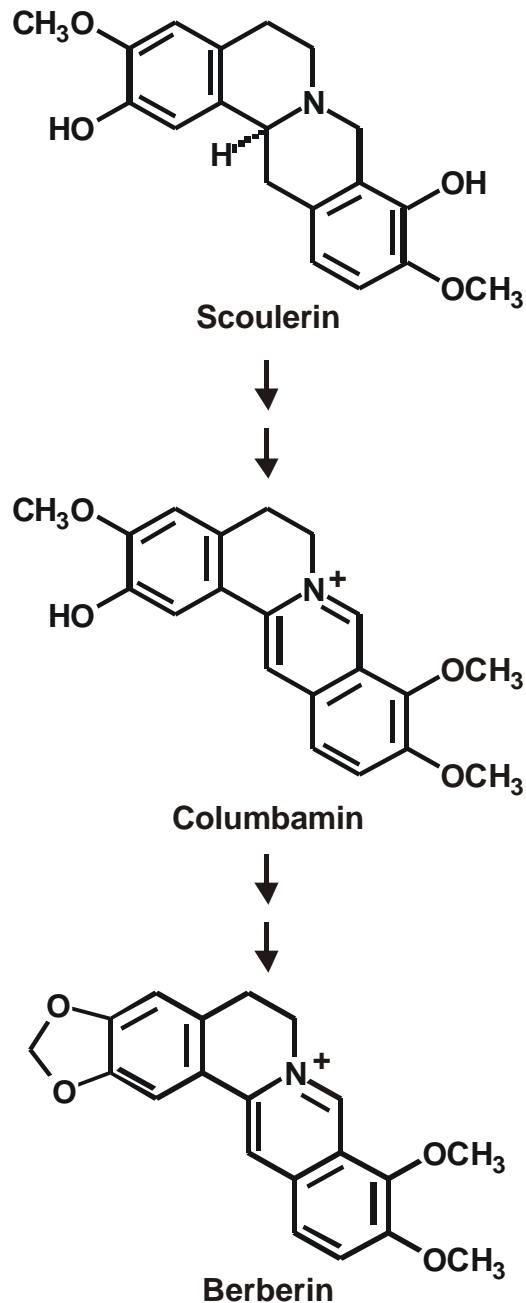


Abb. 51: Isochinolinalkaloide von *Thalictrum tuberosum* (Ranunculaceae).

Die Elicitierung der Zellsuspensionskulturen und die anschließende methanolische Extraktion der Alkaloide erfolgte wie unter III.5.2.3 beschrieben. Die quantitative Bestimmung der Alkaloide wurde photometrisch nach der Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen bestimmt. Die Eichgerade der Referenzsubstanz Berberin zeigte dabei einen linearen Verlauf ($r = 0.992$). In Abbildung 52 ist der Alkaloidgehalt pro ml Zellsuspensionskultur nach Zugabe von 0, 100, 200 und 250 μM (Endkonzentration) Elicitor dargestellt.

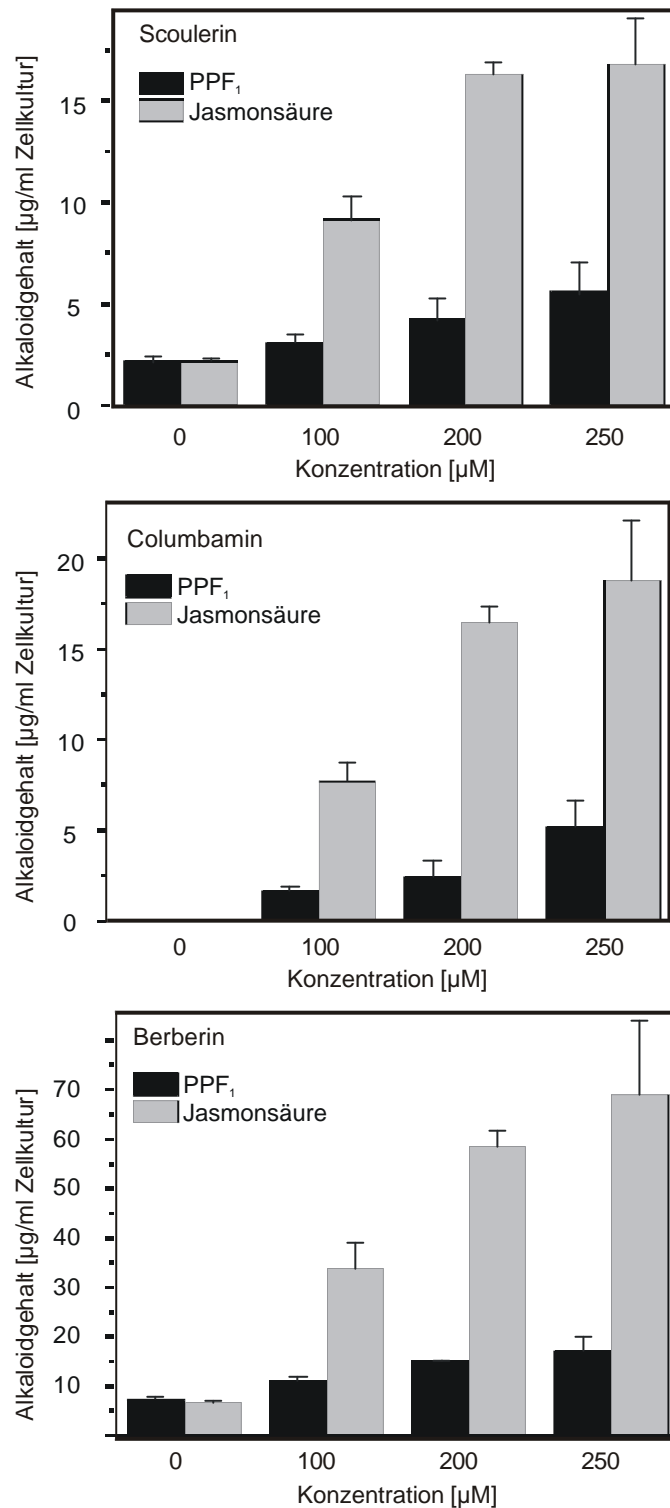


Abb. 52: Steigerung des Isochinolinalkaloidgehaltes in *Thalictum tuberosum*-Zellsuspensionskulturen nach Zugabe steigender Konzentrationen an Jasmonsäure bzw. PPF₁. Angegeben ist die Konzentration in µg Alkaloid/ml Zellkultur (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, daß der Gehalt an Isochinolinalkaloiden in *Thalictum tuberosum*-Zellsuspensionskulturen nach Zugabe von PPF₁ zum Medium gesteigert wurde. Im Vergleich zu Jasmonsäure ist die Steigerung des Gehalts an Isochinolinalkaloiden durch PPF₁ jedoch schwach.

V. Diskussion

V.1 Vorkommen von Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen in Pflanzen

Seit der Entdeckung der Prostaglandine im Tier wurde immer wieder von dem Auffinden von Prostaglandinen in Pflanzen berichtet (Attrep *et al.*, 1980; Janistyn, 1982). Diese Befunde sind insofern überraschend, da mit Ausnahme von einigen niederen Pflanzen (Algen, Moose und Farne) und verschiedenen Pilzen das Vorkommen der Ausgangssubstanz der Prostaglandin-Biosynthese, Arachidonsäure, auf das Tierreich begrenzt ist. Arachidonsäure macht in einigen Rotalgen bis zu 20%, in diversen niederen Pflanzen bis zu 40% und in manchen Pilzen bis zu 70% des Totalfettsäuregehaltes aus (Bundy, 1985).

In vielen Untersuchungen wurden Prostaglandine durch Enzym- oder Radio-Immunoassays, durch chromatographische Verfahren oder über Bioassays nachgewiesen. Diese analytischen Methoden sind im Falle von pflanzlichen Extrakten jedoch nicht spezifisch, da Pflanzen trihydroxylierte Verbindungen der Linol- und Linolensäure enthalten. Diese Verbindungen weisen ein ähnliches chromatographisches Verhalten wie PGE₂ und PGF₂ auf und darüber hinaus besitzen sie eine PGE₂-ähnliche Aktivität in biologischen Testsystemen (Hamberg und Gardner, 1992; Panossian *et al.*, 1983). Für eine eindeutige Identifizierung müssen Prostaglandine daher über Methoden wie EI-MS oder NMR analysiert werden. Mittels dieser Verfahren konnten PGE₂ und PGF₂ in der Rotalge *Gracilaria lichenoides* (Gregson *et al.*, 1979; Ichiro *et al.*, 1992), PGA₁ in *Allium cepa* (Attrep *et al.*, 1980) und PGF₂ in *Kalanchoe blossfeldiana* (Janistyn, 1982) nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der Prostaglandin-Funde in Algen handelt es sich dabei aber um vereinzelte Berichte, die bisher nicht bestätigt wurden. Neben der Verfügbarkeit des Substrates ist für die Biosynthese von Prostaglandinen auch eine PGH-Synthase-Enzymaktivität essentiell, die trotz vielfacher Bemühungen bislang noch nicht für Pflanzen gezeigt werden konnte (Hamberg und Gardner, 1992; Sanz *et al.*, 1998). Daß sich der Nachweis einer PGH-Synthase-Enzymaktivität allerdings durchaus schwierig gestalten kann, zeigte das Beispiel der Korallen *Plexaura homomalla* und *Gersemina fructicosa*. Obwohl *Plexaura homonalla* hohe Mengen an Prostaglandinen akkumuliert (2-3% bezogen auf das Trockengewicht) und deshalb in den 70iger Jahren sogar die Hauptquelle für die Gewinnung dieser Verbindungen war, konnte erst im Jahr 2000 durch homologe Klonierung eine PGH-Synthase in den Korallen identifiziert werden (Koljak *et al.*, 2000; Valmsen *et al.*, 2001). Dies war der erste Nachweis einer PGH-Synthase in Invertebraten. Koljak *et al.* folgerten, daß sowohl die Enzyme von Invertebraten, als auch die der Vertebraten von einer "Ur-PGH-Synthase" abgeleitet sind.

Seit 1990 weiß man durch die Arbeiten von Morrow *et al.*, daß eine PGH-Synthase-Enzymaktivität nicht zwingend notwendig ist, um Prostaglandin-ähnliche Verbindungen aus Arachidonsäure (Isoprostane) *in vivo* zu synthetisieren (Morrow *et al.*, 1990a). Voraussetzung für die Entstehung von Isoprostanen ist das Vorhandensein von Arachidonsäure und molekularem Sauerstoff.

Um zu untersuchen, ob Isoprostane nicht nur im tierischen Organismus gebildet werden, sondern auch in niederen Pflanzen, untersuchten wir ein Lebermoos, *Marchantia polymorpha*. Dieses Lebermoos enthält bis zu 7% Arachidonsäure (bezogen auf den Totalfettsäuregehalt) (Chiou *et al.*, 2001). Für die Untersuchungen wurden Zellen einer *Marchantia polymorpha*-Zellsuspensionskultur direkt nach der Ernte aufgearbeitet (siehe IV.1). Jedoch konnten keine Isoprostane in den Zellen detektiert werden. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch durch Einfrieren und anschließendem Auftauen der Zellen eine Lipidperoxidation forciert. Nach Aufarbeitung der so oxidativ geschädigten Zellen konnten tatsächlich iPF_2 in *Marchantia polymorpha* nachgewiesen werden (siehe IV.1, Abb. 16). Allerdings erforderte selbst die Detektion im NICI-Modus der MS, welche in der Literatur als sensitivste Nachweismethode für Prostanoiden beschrieben ist, eine Aufarbeitung von ca. 10 g Pflanzenmaterial. Zwar kann man mit NICI-MS Prostanoiden noch im pg-Bereich detektieren, jedoch basiert die Identifizierung allein auf der Bestimmung der Retentionszeit und des Molekülionenpeaks [M]. Charakteristische Fragmentationen einer Substanz erhält man bei dieser Detektion nicht. Um einen sicheren Nachweis einer Substanz zu erbringen, sollte diese daher über GC-EI-MS vermessen werden. Hierbei sind die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster einer Verbindung für deren Identifizierung ausschlaggebend. Um ein EI-Massenspektrum von Prostaglandinen (nach Aufarbeitung und Derivatisierung) zu erhalten, braucht man ca. 1 µg dieser Substanz in der zu untersuchenden Matrix. Für die Pflanzenaufarbeitung bedeutet dies, daß die Menge des zu untersuchenden Pflanzenmaterials hätte drastisch erhöht werden müssen. So wurden beispielsweise für den Nachweis von PGA_1 mittels GC-EI-MS 15-22 kg Zwiebeln aufgearbeitet (Attrep *et al.*, 1980).

Da, wie zuvor erwähnt, weder das Vorkommen von C20-Fettsäuren noch eine PGH-Synthase-Aktivität für höhere Pflanzen beschrieben ist, stellt sich die Frage, ob tatsächlich PGA_1 nachgewiesen wurde. Denkbar wäre eine Detektion von iPA_1 : einige Isoprostane sind lediglich Stereoisomere von Prostaglandinen, die ähnliche Fragmentierungsmuster im EI-Massenspektrum (sieht man von geringen Fragmentintensitätsunterschieden ab) aufweisen. Dies ist in Abbildung 53 am Beispiel von $PGF_{2\alpha}$ und $iPF_{2\alpha}$ -III illustriert. Dies bedeutet, daß der Nachweis über EI-MS nicht ausreicht, um Isoprostane sicher von Prostaglandinen zu unterscheiden.

Für die Synthese von Isoprostanen ist lediglich die Anwesenheit einer ungesättigten Fettsäure erforderlich, d.h. im Fall von iPA_1 muß Eicosatriensäure, die biogenetische Vorstufe der Arachidonsäure, vorhanden sein. Um 1 µg iPA_1 durch Autoxidation zu erzeugen, benötigt man ca. 100 µg Eicosatriensäure. Dies bedeutet, daß die Einbringung von 100-1000 µg Eicosatriensäure in 15-22 kg Pflanzenmaterial ausreichend wäre, um eine nachweisbare Menge an iPA_1 zu erzeugen. Es wäre dabei denkbar, daß Eicosatriensäure durch Kontaminationen wie beispielsweise Pilze in die Proben eingebracht und während der Probenaufarbeitung zu Isoprostanen autoxydiert wurde. Bei den oben genannten Prostaglandin-Funden in höheren Pflanzen ist es daher möglich, daß statt Prostaglandine

Isoprostane detektiert wurden, die durch Verunreinigungen der Proben mit Eicosatriensäure bzw. Arachidonsäure entstanden sind.

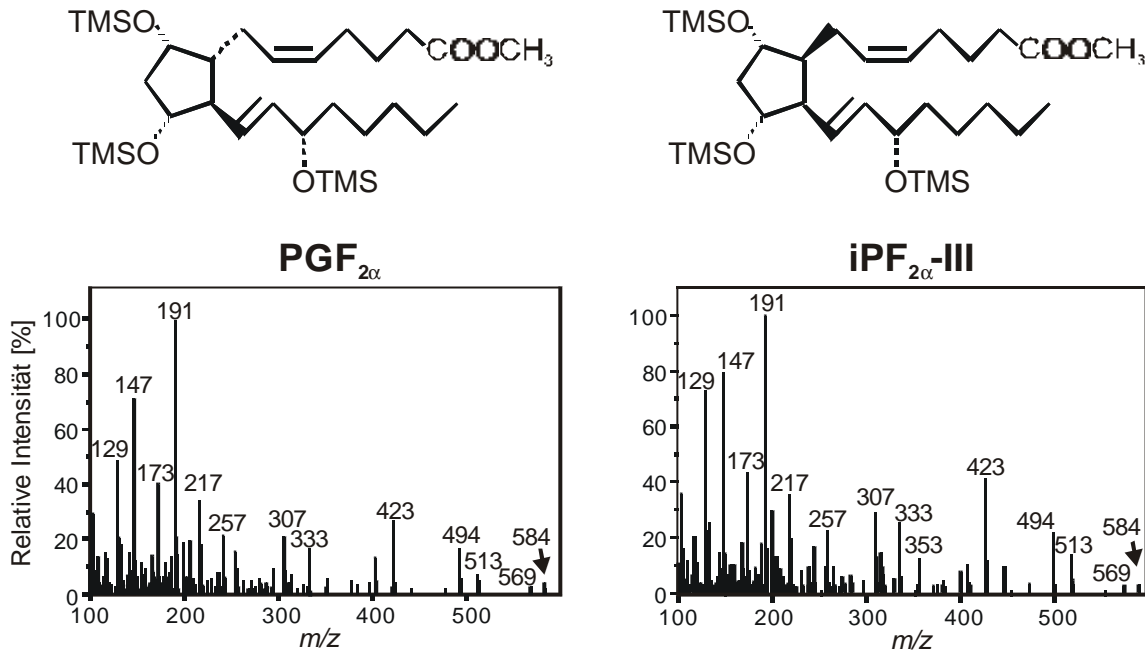


Abb. 53: EI-Massenspektren der Methyl ester-TMS-Ether-Derivate von PGF_{2α} und iPF_{2α}-III, wobei sich die Verbindungen nur durch die Konfiguration an C8 unterscheiden.

V.2 Phytoprostane: Marker von Lipidperoxidation *in vitro* und *in vivo*

Lipidperoxidation ist im Lebensmittelbereich von großer Bedeutung, da die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zum „Ranzigwerden“ von Ölen und damit zum Nährwertverlust von Nahrungsmitteln, die ungesättigte Fettsäuren enthalten, führt. In den letzten Jahren wurde Lipidperoxidation auch in der Humanmedizin immer bedeutsamer, da viele Krankheitsbilder mit dem Auftreten von freien Radikalen und dem sogenannten „oxidativen Stress“ in Verbindung gebracht werden. In Tabelle 9 sind einige dieser Erkrankungen und Intoxikationen aufgeführt.

| | |
|--|---|
| • Diabetes (Davi <i>et al.</i> , 1999) | • CCl ₄ -induzierte Lebervergiftung (Morrow <i>et al.</i> , 1990a) |
| • Alzheimer (Pratico <i>et al.</i> , 1998b) | • Koronare Reperfusionsschäden (Delanty <i>et al.</i> , 1997) |
| • Atherosklerose (Pratico <i>et al.</i> , 1997) | • Rauchen (Reilly <i>et al.</i> , 1996) |
| • Allergisches Asthma (Dworski <i>et al.</i> , 1999) | • Alkohol-induzierte Leberschädigung (Alechnik <i>et al.</i> , 1998) |

Tab. 9: Erkrankungen bzw. Intoxikationen, die mit dem Auftreten von freien Radikalen in Verbindung gebracht werden und bei denen eine erhöhte Isoprostankonzentration gemessen werden kann [Review-Artikel (Roberts und Morrow, 2000)]. Die Isoprostankonzentration korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung bzw. mit der Stärke der Noxe.

Der Begriff „oxidativer Stress“ kann bis heute jedoch nicht genau definiert werden. Die grundlegenden Fragen, die sich zu diesem Thema stellen, sind: Welches Maß an Lipidperoxidation einer Zelle kann als normal betrachtet werden? Welche Konzentration an ROS kann von einer Zelle entgiftet werden und bei welcher kommt es zu einer Zellschädigung?

Bislang nutzte man eine Vielfalt von Indizes (z.B. Malondialdehyd, Tab. 10), deren Konzentrationsanstieg mit dem „oxidativen Stress“ einherging, jedoch sind die genutzten Verbindungen nicht immer spezifisch und häufig chemisch instabil. Daher wurden große Anstrengungen unternommen, um einen Marker für Lipidperoxidation zu etablieren, der sich durch chemische Stabilität und zuverlässige Nachweismöglichkeiten auszeichnet. In Tabelle 10 ist eine Auswahl häufig gebrachter Marker und deren Vor- und Nachteile aufgeführt.

Isoprostane stellen eine neue Klasse von Marker für Lipidperoxidation dar. Sie sind spezifische Produkte der Lipidperoxidation, die einer genauen Quantifizierung zugänglich sind (siehe I.2.) und sich durch chemische Stabilität auszeichnen. Bei der Etablierung eines Markers für Lipidperoxidation wurden Isoprostane mit F-Ringsystem bevorzugt, da sie sich durch besondere Stabilität auszeichnen (Roberts und Morrow, 2000).

Isoprostane konnten in allen biologischen Geweben und Flüssigkeiten gesunder Personen nachgewiesen werden, was zum ersten Mal die Möglichkeit eröffnete, Lipidperoxidation in ungeschädigtem Gewebe genau zu quantifizieren (Roberts und Morrow, 2000).

| | |
|-------------------|--|
| Aldehyde | Hauptprodukte der Oxidation von ω -6 Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) sind 4-Hydroxynonenal und Hexenal (Esterbauer <i>et al.</i> , 1991), die von ω -3 Fettsäuren (z.B. α -Linolensäure) Propanal und 4-Hydroxyhexenal. Diese Aldehyde sind die am meisten verbreitetsten Aldehyde in biologischen Geweben. Sie können durch GC-MS-Analysen bestimmt werden. Da sie jedoch mit DNA, RNA oder Proteinen reagieren und darüber hinaus auch noch flüchtig sind, ist eine genaue und zuverlässige Quantifizierung kaum möglich. |
| Malondialdehyd | Ein anderer weitverbreiteter Marker der Lipidperoxidation ist Malondialdehyd. Es wird häufig durch den Thiobarbitursäure-reaktive-Substanzen-Test detektiert, wobei nach Erhitzen von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure ein rosa gefärbtes Chromophor entsteht, welches photometrisch bei 532 nm vermessen werden kann. Dieser Test ist allerdings bei Verwendung von biologischem Material ungenau, da viele Substanzen mit Thiobarbitursäure ein solches Chromophor bilden. Daneben ist ebenfalls bekannt, daß Malondialdehyd als ein Nebenprodukt der PGH-Synthase-Aktivität in Blutplättchen gebildet wird (Hamberg <i>et al.</i> , 1975), d.h. daß Malondialdehyd nicht nur durch nicht-enzymatische Lipidperoxidation entsteht. Ein Vergleich des Thiobarbitursäuretests mit einer GC-MS-Analyse von Malondialdehyd zeigte die Unzuverlässigkeit des Testes sehr deutlich auf: das photometrische Verfahren lieferte eine 10fach höhere Konzentration als die GC-MS-Analyse, was vor allem auf das Erhitzen der Probe und das damit einhergehende Degradieren von Peroxiden zu Aldehyden zurückgeführt werden kann (Gutteridge, 1986; Yeo <i>et al.</i> , 1994). |
| Konjugierte Diene | Das Messen von konjugierten Dienen bei 230-235 nm zeigt in Fettsäureautoxidationsansätzen den Beginn der Lipidperoxidation an. Eine Bestimmung von konjugierten Dienen in biologischen Flüssigkeiten hingegen ist nicht zuverlässig, da bei 230-235 nm eine Vielzahl von Substanzen Licht adsorbieren. Darüber hinaus werden konjugierte Diene nach Probennahme <i>ex vivo</i> weitergebildet und so spiegelt die Analyse nach Aufarbeitung der Probe nicht den Zustand bei Probennahme wieder (Dormandy und Wickens, 1987). |
| Ethan/Pentan | Die Bestimmung von Ethan und Pentan in der Atemluft stellte bislang die Methode zur nicht-invasiven Messung der Lipidperoxidation dar, da ω 3-Fettsäuren Ethan und ω 6-Fettsäuren Pentan liefern, wenn sie oxidieren (Reily <i>et al.</i> , 1974). Jedoch ist die genaue quantitative Erfassung der Ethan-/Pentanentstehung durch ihre Flüchtigkeit, ihr Vorkommen in der Umwelt und durch die mögliche Bildung durch Bakterien extrem erschwert. |

Tab. 10: Gebräuchliche Marker zur Bestimmung des Ausmaßes der Lipidperoxidation in tierischen und pflanzlichen Geweben.

Die oben genannten Lipidperoxidationsmarker, ausgenommen Isoprostane, finden ebenfalls Anwendung in Pflanzen und auch hier führt ihre Instabilität und Flüchtigkeit zu ungenauen Ergebnissen.

Mit der Entdeckung der PPF₁ eröffnet sich eine neue Perspektive für die Quantifizierung von Lipidperoxidation in Pflanzen: PPF₁ sind wie iPF₂ stabile Endprodukte der Lipidperoxidation, die durch GC-MS sensitiv und selektiv detektiert werden können. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnten PPF₁ nicht nur in Linolensäureautoxidationsansätzen quantifiziert werden, sondern auch in fetten Ölen nach Hydrolyse von Triglyceriden. Als Marker der oxidativen Degradierung bzw. zur Bestimmung der Nahrungsmittelqualität sollte jedoch der PPF₁-Gehalt dem Linolensäuregehalt gegenübergestellt werden. In Sojaöl wurden 8.2 µg (entspricht 2.5×10^{-8} mol) PPF₁ und 130.8 mg (entspricht 4×10^{-4} mol) Linolensäure/g Öl gefunden (siehe IV.7), d.h. PPF₁ und Linolensäure lagen im Verhältnis 1:16000 vor. Im Leinöl hingegen konnten 105.7 µg (entspricht 3×10^{-7} mol) PPF₁ und 790.3 mg (entspricht 2.4×10^{-3} mol) Linolensäure/g Öl nachgewiesen werden, d.h. PPF₁ und Linolensäure lagen in einem Verhältnis von 1:8000 vor. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Lipidperoxidation im Leinöl stärker fortgeschritten war als im Sojaöl. Die Konzentration der PPF₁ und damit das Ausmaß der Lipidperoxidation hängt von mehreren Faktoren ab, beispielsweise dem Linolensäuregehalt, dem Alter, der Art der Lagerung und dem Tocopherolgehalt eines Öles. Um die Wertigkeit eines Produkt wiederzugeben, sollte man Molverhältnisse der PPF₁ zur Linolensäure festlegen. Hierfür müßten die Messungen jedoch mittels Massenspektrometrie erfolgen, was einen relativ großen Derivatisierungs- und Geräteaufwand bedeutet. Eine Methodik, die von vielen, auch kleinen, Lebensmittelabteilungen durchführbar wäre, ist der Nachweis mit Hilfe eines Enzymimmunoassays. Für das C20-homologe iPF_{2α}-III existiert ein solcher Test bereits, der auch kommerziell erhältlich ist. Bei Anwendung dieser Methodik wäre die Erarbeitung von Grenzwerten des PPF₁-Gehaltes für Lebensmittel notwendig. Weiterhin müßten die Ergebnisse der PPF₁-Linolensäurebestimmung mit Daten, die durch klassische Verfahren wie beispielsweise Peroxidbestimmung oder dem Malondialdehydtest erhalten wurden, verglichen werden. Somit sind die erhaltenen Werte nur erste Ergebnisse, die einen möglichen neuen, chemisch stabilen Marker von Lipidperoxidation in Pflanzenmaterialien vorstellen. Zur Etablierung von PPF₁ als Marker im Lebensmittelbereich sind noch weitere, umfassendere Untersuchungen notwendig.

PPF₁ können nicht nur als Marker für Lipidperoxidation von isolierten pflanzlichen Inhaltsstoffen, wie z.B. fetten Ölen, sondern auch von Pflanzengewebe dienen. Linolensäure liegt in Pflanzen zu über 90% verestert in Membranen und nur zu einem kleinen Teil frei vor. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit pflanzliche Lipide sowohl mit als auch ohne vorherige Hydrolyse vermessen (siehe IV.8).

Als erstes Versuchsmaterial wurden Teedrogen auf das Vorkommen und den Gehalt an PPF₁ untersucht. Es war zu erwarten, daß in getrocknetem Pflanzenmaterial eine massive Lipidperoxidation stattgefunden hat, da antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe (Vitamin E, Phenole, Ascorbat, Glutathion etc.) und Enzymsysteme oxidiert bzw. abgebaut sind. In den verwendeten Teedrogen konnten Konzentrationen zwischen 2406-20010 ng/g TG für freie und 2680-47280 ng/g TG für veresterte PPF₁ nachgewiesen werden (IV.8.4.1, Tab. 7). Die

leicht schwankenden Verhältnisse von freien zu veresterten PPF₁ von 1:1 bei Colchici semen im Vergleich zu 1:3 bei Hyperici herba, sind vermutlich auf unterschiedliche Lipaseaktivitäten zurückzuführen.

In intakten Zellen findet ebenfalls eine –wenn auch im Vergleich zu toten Zellen stark reduzierte– Autoxidation statt. Unter physiologischen Bedingungen können Radikale und ROS in der Atmungskette, während der Photosynthese sowie durch Cytochrom P450-Enzyme gebildet werden (Lamb und Dixon, 1997), wobei die Radikale durch vorhandene antioxidative Systeme inaktiviert werden können. Zu diesen Systemen gehören Katalasen, Peroxidasen, Superoxiddismutasen und das Glutathionsystem, das aus oxidiertem und reduziertem Glutathion, sowie der Glutathion-Peroxidase und -Reduktase besteht. Neben diesen enzymatischen Schutzmechanismen sind in der Pflanzenzelle noch niedermolekulare Stoffe, wie z.B. Vitamin E oder Carotinoide, enthalten, die langlebige, stabile Radikale bilden und so eine Propagierung radikalischer Reaktionen unterdrücken können. Trotz der hohen Effizienz dieser Schutzsysteme kann es in ungeschädigten wie auch in geschädigten Pflanzen zur Oxidation von Geweben bzw. Gewebekomponenten kommen. Eine solche oxidative Schädigung wird häufig mit dem Begriff „oxidativer Stress“ bezeichnet. Allerdings gibt es bislang noch kein allgemein akzeptiertes Maß, um das Ausmaß vom „oxidativen Stress“ zu erfassen. Der Nachweis von PPF₁ in Pflanzenzellen (intakte Pflanzen: 43-1380 ng freie PPF₁/g TG bzw. 470-11690 ng veresterte PPF₁/g TG; Zellsuspensionskulturen: 23-316 ng freie PPF₁/g TG bzw. 150-3320 ng veresterte PPF₁/g TG) ermöglicht es, das Ausmaß der Autoxidation in unbeschädigten Pflanzenzellen zu quantifizieren. Diese Befunde zeigen die Möglichkeit auf, PPF₁/Linolensäure-Verhältnisse festzulegen und diese als „normal“ oder „erhöht“ einzustufen. Hierfür sind weitere umfassende Untersuchungen notwendig.

Darüber hinaus sind PPF₁ vermutlich ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet. Diese Hypothese stützt sich auf den Nachweis von PPF₁ in insgesamt 16 verschiedenen Pflanzenarten aus 13 systematisch weit entfernten Pflanzenfamilien, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Zudem ist die Ausgangsverbindung der PPF₁-Synthese, α -Linolensäure, ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet ist.

Das Verhältnis von PPE₁ zu PPF₁ gibt Hinweise auf das Milieu in dem eine Lipidperoxidation stattfindet: PPF₁ werden durch direkte Reduktion aus PPG₁ gebildet, während durch Umlagerung und Reduktion D- bzw. E-Ringverbindungen entstehen. Diese Umlagerung findet bevorzugt in einem wässrigen Milieu stattfinden (Halbwertszeit PPG₁ ca. 5 min.; siehe IV.3.1), während PPF₁ eher in einem aprotischen Milieu gebildet werden, da unter den zuletzt genannten Bedingungen PPG₁ länger der direkten Reduktion zur Verfügung stehen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Konzentration an PPF₁ und PPE₁ in Linolensäureautoxidationsansätzen [MeOH/Wasser (1:1, v/v) bzw. Tetrachlorkohlenstoff] und in frischen Pfefferminzblättern bestimmt. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

| Probe | PPF ₁ | PPE ₁ | Verhältnis PPF ₁ zu PPE ₁ |
|--------------------------------------|------------------|------------------|--|
| µg/g TG | | | |
| Frische Blätter | | | |
| frei | 0.076 ± 0.004 | 0.037 ± 0.005 | 2:1 |
| verestert | 11.24 ± 1.52 | 0.13 ± 0.004 | 86:1 |
| Linolensäure- autoxidationsansatz | | | |
| protisches | | | |
| Lösungsmittel | 2380 ± 60 | 5550 ± 340 | 0.41:1 |
| aprotisches | | | |
| Lösungsmittel | 11660 ± 3600 | 300 ± 10 | 39:1 |

Tab. 11: Vergleich des PPF₁- und PPE₁-Konzentrationsverhältnisses *in vivo* und *in vitro*. Gehalt an PPF₁ und PPE₁ in Pfefferminzblättern [µg/g TG] und Linolensäureautoxidationsansätzen [µg/g Linolensäure]. Es muß beachtet werden, daß bedingt durch die Aufarbeitungsmethode veresterte PPA₁/B₁ und PPE₁ nicht getrennt werden können. Die Angaben stammen aus der Dreifachbestimmung einer GC-MS-Analyse (Mittelwert ± S.D., n = 3).

Im *in vitro*-System steht die Umlagerungsreaktion der PPG₁ zu PPE₁ in direkter Konkurrenz zur Reduktion zu PPF₁. Die Reduktion der PPG₁ kann während der 10 Tage Autoxidation durch Linolensäure oder Lipidperoxidationsprodukte oder bei der Aufarbeitung des Linolensäureautoxidationsansatzes durch Zugabe von Triphenylphosphin stattfinden. Es zeigte sich, daß das protische Lösungsmittel die Umlagerung zu PPE₁ begünstigt, während im Tetrachlorkohlenstoffautoxidationsansatz vorzugsweise PPF₁ entstehen. Dabei könnten PPG₁ im aprotischen Lösungsmittel stabilisiert und spätestens bei der Aufarbeitung des Autoxidationsansatzes durch Triphenylphosphin zu PPF₁ reduziert werden.

In vivo ist die Situation der PPF₁-Bildung viel komplexer. Membranen stellen ein unpolares Milieu dar. In diesen werden PPG₁ möglicherweise ähnlich wie in einem unpolaren Lösungsmittel stabilisiert. Die Konzentration der veresterten PPG₁ hängt von der Konzentration an ROS und von der Kapazität der Pflanzenzelle die Bildung von ROS zu unterdrücken ab.

PPG₁ sind potentielle Substrate für reduzierende Enzyme wie beispielsweise der Glutathion-Peroxidase, so daß eine PPF₁-Bildung gegenüber der Umlagerung zu PPE₁ bevorzugt würde. Bei dem Vergleich der Konzentrationsverhältnisse von PPF₁ zu PPE₁ fällt auf, daß diese in der Zelle sowohl für veresterte als auch für freie Phytoprostane zu Gunsten der PPF₁ verschoben sind, was auf eine direkte Reduktion des PPG₁ zu PPF₁ hindeutet.

Freie PPF₁ werden vermutlich durch Herauslösen von veresterten PPF₁ aus Membranen erzeugt. Da dieser Vorgang wahrscheinlich von Lipasen katalysiert wird, hängt die PPF₁-Konzentration im Cytosol zum einen von Lipaseaktivitäten und zum anderem vom Metabolismus freier PPF₁ ab (Abb. 54). Über die Präferenzen dieser Enzymsysteme ist noch

nichts bekannt. Alternativ könnten freie PPF₁ auch aus freier Linolensäure gebildet und dann in Membranen eingebaut oder metabolisiert werden. Jedoch ist dieser Weg vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

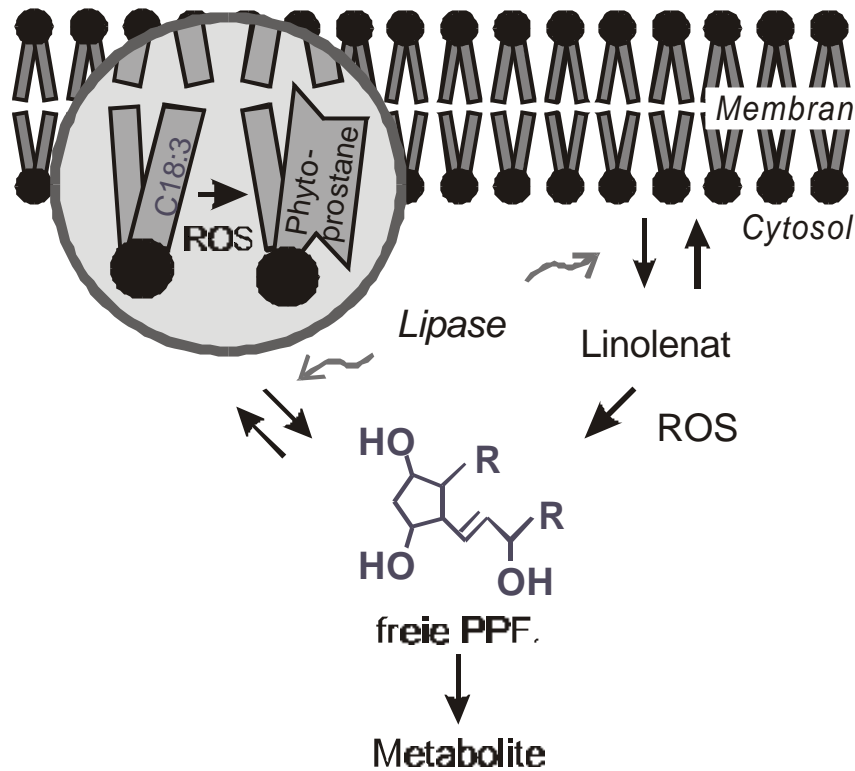


Abb. 54: Hypothetische Bildung von Phytoprostanen in der Pflanzenzelle.

Die Untersuchungen der Pfefferminzblätter deuten daraufhin, daß PPF₁ vorzugsweise in Membranen gebildet werden, da die Konzentration veresterter PPF₁ um mehr als das 140fache höher ist als die freier PPF₁.

Dies sind bislang nur erste Ergebnisse, die die oben genannten Vermutungen zulassen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu zeigen, daß (i) Phytoprostane in Membranen gebildet werden, (ii) sie dort durch Lipasen herausgelöst werden und (iii) PPG₁ durch direkte Reduktion, beispielsweise mittels Glutathion, zu PPF₁ umgesetzt werden.

V.3 Induzierbarkeit und mögliche Signalfunktion der PPF₁

Ein stark erhöhtes Vorkommen von Radikalen bzw. ROS in der Pflanzenzelle findet man während des Abwehrgeschehens beispielsweise beim Angriff durch Pathogene. Diese Situation wird als „oxidative burst“ (oxidativer Ausbruch) bezeichnet (Lamb und Dixon, 1997; Sandermann jr., 2000) und geht mit der Aktivierung einer membrangebundenen NADPH-Oxidase einher (Abb. 55) (Lamb und Dixon, 1997; Sandermann jr., 2000). Bei dem Befall von Zellen mit avirulenten Pathogenen kann ein zweiter, massiver und länger

andauernder „oxidative burst“ beobachtet werden (Lamb und Dixon, 1997). Diese zweite Phase ist abhängig von der Expression spezifischer Abwehrgene; unter anderem kann die sogenannte Hypersensitivitätsreaktion eingeleitet werden, die mit einem Anstieg der ROS-Konzentration einhergeht und häufig mit dem Tod des befallenen und des direkt umgebenden Gewebes endet.

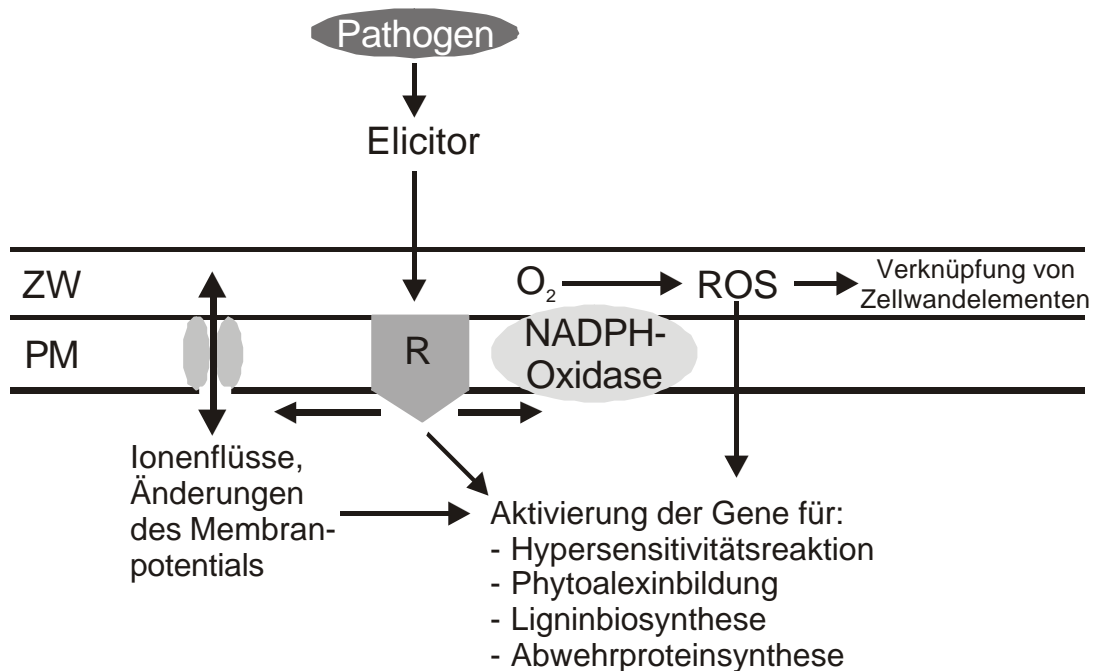


Abb. 55: Mögliche Abwehrmechanismen einer Pflanzenzelle gegen Pathogenbefall und deren mögliche Zusammenhänge. ZW (Zellwand); PM (Plasmamembran); R (Rezeptor); ROS (Reaktive Sauerstoffspezies, engl.: reactive oxygen species) (nach Taiz und Zeiger, 2000).

Um den Verlauf der PPF₁-Bildung während einer „oxidativen Stress-Situation“ zu verfolgen, wurden in der vorliegenden Arbeit Zellsuspensionskulturen mit Agentien behandelt, von denen bekannt ist, daß sie eine verstärkte Bildung von ROS induzieren: Paraquat, t-BuOOH, FeSO₄, HgCl₂ und CuAc₂ (Cuypers *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 1999; Mosier *et al.*, 1990; Stohs und Bagachi, 1995). In diesen Versuchen stieg sowohl die Konzentration freier als auch die Konzentration veresterter PPF₁ in den Zellen an (siehe IV.9), wobei sich die Konzentrationsverläufe im Ausmaß und zeitlichem Verlauf unterschieden. Vermutlich korreliert die PPF₁-Akkumulation mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation, die wiederum vom Stimulus, dessen Konzentration und vom antioxidativen Potential der Zellen abhängig ist.

Der Befund, daß die Konzentration veresterter PPF₁ verglichen mit der freien PPF₁ meist um den Faktor 10 höher lag (siehe IV.8.9), läßt die Schlußfolgerung zu, daß ROS veresterte Linolensäure angreifen und oxidieren können. Vermutlich werden PPF₁ in Membranlipiden gespeichert und durch aktivierte Lipasen herausgelöst, wie es in *Arabidopsis thaliana* für 12-Oxo-Phytodiensäure, eine Cyclopentanverbindung der Jasmonatkaskade, gezeigt werden konnte (Stelmach *et al.*, 2001).

Ein weiterer Stimulus, der mit der Bildung von ROS in Verbindung gebracht wird, ist die Verwundung von Pflanzen. So berichteten Orozco-Cárdenas und Ryan beispielsweise, daß H_2O_2 systemisch in Blättern verschiedener Pflanzenfamilien nach Verwundung produziert wird (Orozco-Cárdenas und Ryan, 1999). Um festzustellen, ob Verwundung ebenso zur Synthese von PPF_1 führt, wurden Pfefferminzblätter verletzt und anschließend der PPF_1 -Konzentrationszeitverlauf beobachtet (IV.10.1). Dabei erfolgte direkt nach Verletzung ein transienter Konzentrationsanstieg freier und veresterter PPF_1 . Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß eine Verwundung von Pflanzen zu Lipidperoxidation und damit zur PPF_1 -Akkumulation führt.

Im Gegensatz zu diesen Daten, die die Hypothese unterstützen, daß die PPF_1 -Konzentration im direkten Zusammenhang mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation steht, stehen die Ergebnisse der Behandlung von Bohnenpflanzen mit Paraquat. In diesem Versuch konnte keine PPF_1 -Akkumulation verfolgt werden, obwohl Paraquat zur Lipidperoxidation führt (Mosier *et al.*, 1990) (IV.10.2). Derzeit kann dieser Befund nicht erklärt werden. Eine Erklärung könnte in einem möglichen Verbrauch antioxidativer Systeme liegen. So wäre es denkbar, daß durch die Behandlung mit Paraquat die Konzentration an ROS in einem kurzen Zeitraum rapide ansteigt. Die entstandenen ROS könnten die antioxidativen Ressourcen der Zelle, wie beispielsweise Glutathion, aufbrauchen, so daß entstandene PPG_1 nicht mehr zu PPF_1 reduziert werden können, sondern zu PPE_1 umgelagert werden. Diese Vermutung muß jedoch noch experimentell belegt werden.

Betrachtet man die PPF_1 -Konzentrationsverläufe der oben genannten Kinetiken, so ist häufig nach einem Anstieg der Konzentration eine Abnahme dieser zu verzeichnen. Wie bereits erwähnt, werden veresterte PPF_1 vermutlich durch Lipasen aus Membranen gelöst und anschließend in freier Form metabolisiert (Abb. 54). Während bislang noch keine PPF_1 -Metabolite in Pflanzen bekannt sind, sind Abbauschritte und Metabolite von Prostanoiden in Tieren hingegen gut charakterisiert (Marks und Fürstenberger, 1999). So findet bei Prostaglandinen und Isoprostanen häufig eine Oxidation der Hydroxylgruppen der Seitenketten und eine β -Oxidation statt, welche sowohl vom Carboxylende als auch - nach vorangegangener Oxidation - vom Methylende her starten kann (Marks und Fürstenberger, 1999) (Abb. 56). Es ist zu erwarten, daß sich der Metabolismus von Prostanoiden in tierischen und pflanzlichen Organismen aufgrund verschiedener Enzymausstattungen der Zellen unterscheidet. Dabei kann in Erwägung gezogen werden, daß die Abbaureaktionen der Phytoprostane denen der Jasmonsäure ähneln, da sie strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Damit können folgende Metabolisierungsschritte vermutet werden:

- Glykosylierung der Hydroxygruppen
- Oxidation der Hydroxygruppen
- Reduktion der Doppelbindung
- Oxidation des Methylendes

- β -Oxidation der Seitenketten
- Konjugation der Carboxylfunktion beispielsweise mit Aminosäuren (Abb. 55).

Diese hypothetischen Reaktionen müssen noch experimentell überprüft werden.

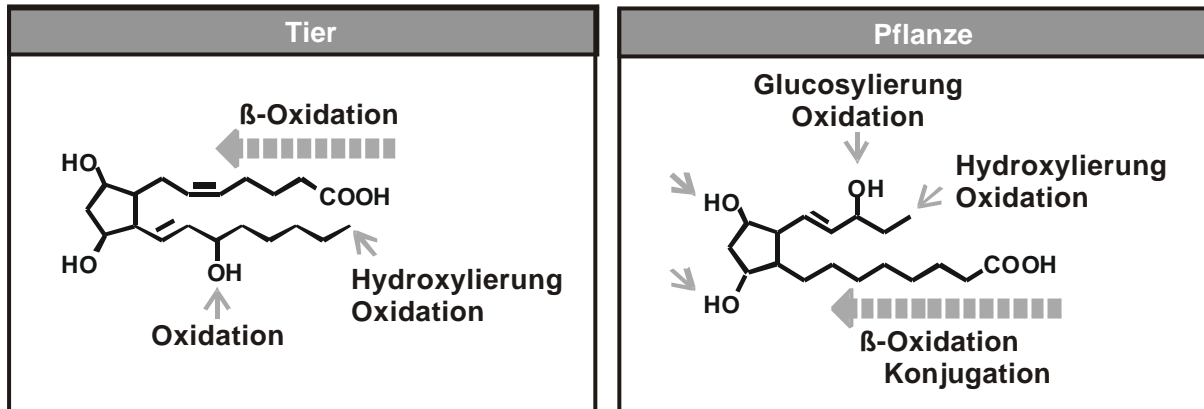


Abb. 56: Metabolismus der Isoprostane und Prostaglandine im Tier und mögliche Metabolisierung der PPF₁ in der Pflanze.

Die beim „oxidative burst“ entstehenden ROS wirken direkt als protektive Agentien gegen Pathogene. Sie verursachen die oxidative Quervernetzung von Zellwandelementen und mindestens eines der ROS, H₂O₂, wird als Mediator des „oxidative burst“ diskutiert (Lamb und Dixon, 1997, Sandermann jr., 2000; Orozco-Cárdenaz *et al.*, 2001). H₂O₂ soll dabei die Rolle eines „second messengers“ einnehmen (Orozco-Cárdenaz *et al.*, 2001). In Folge können Defensivgene aktiviert werden, die zur Akkumulation von Phytoalexinen und Abwehrproteinen führen und den programmierten Zelltod einleiten.

In diesem Zusammenhang ist die hohe strukturelle Verwandtschaft der PPF₁ zu den enzymatisch gebildeten Jasmonaten bemerkenswert. Jasmonate sind Pflanzenhormone, die unter anderem am Abwehrgeschehen beteiligt sind (siehe I.3.4). PPF₁ könnten an Jasmonatrezeptoren binden und so eine Abwehrantwort auslösen. Solche zufällige Kreuzreaktionen konnten für die C₂₀-homologen iPF₂ im Tier mit Thromboxan- bzw. Prostaglandinrezeptoren gezeigt werden (siehe I.2.3.4). Aufgrund der Induzierbarkeit und der biologischen Aktivität der iPF₂ werden sie heute als Mediatoren des „oxidativen Stress“ diskutiert. Es stellte sich daher die Frage, ob PPF₁ - analog den iPF₂ im Tier - in der Pflanzenstressphysiologie eine Rolle als Mediator spielen. In den gewählten Testsystemen [*Eschscholzia californica* (IV.11.1), *Crotalaria cobalticola* (IV.11.2) und *Thalictrum tuberosum* (IV.11.3)] induzierte die Zugabe eines PPF₁-Gemisches zu den Zellen eine Phytoalexinakkumulation. Dagegen waren die im *Eschscholzia californica*-Testsystem eingesetzten reinen PPF₁-Regioisomere nicht aktiv (Abb. 47). Da diese jedoch nur vier racemische PPF₁-Isomere aus insgesamt 32 PPF₁-Isomeren waren, muß ein Ziel nachfolgender Arbeiten die Isolierung bzw. die Synthese von weiteren stereochemisch

definierten PPF₁-Isomeren sein, die in den oben genannten Testsystemen auf ihre biologische Aktivität getestet werden müssen.

Die massive Synthese von ROS während des „oxidative burst“ kann zur Oxidation zellulärer Strukturen führen, wobei hier vor allem die Lipidperoxidation von Membranen zu Zellschäden bis hin zum Zelltod führen kann (Bowler und Fluhr, 2000). Veresterte Fettsäureoxidationsprodukte in Membranen können die Membranintegrität stören und ein Plasmaleck verursachen. In dieser Hinsicht wurde postuliert, daß F-Ring-Isoprostanoide aufgrund ihrer stark geknickten Struktur, den drei Hydroxygruppen und dem anhängenden lipophilen Rest an der Entwicklung eines Membranlecks beteiligt sind (Lawson *et al.*, 1999; Morrow *et al.*, 1992a; Rokach *et al.*, 1997a). Ähnliches kann für PPF₁ in Pflanzen angenommen werden, da PPF₁ ebenfalls die genannten strukturellen Charakteristika aufweisen. Jedoch ist nicht bekannt, in welchen Konzentrationen membrangebundene oxygenierte Fettsäurederivate letal für Zellen sind.

Zusammenfassend liefern diese Befunde erste Evidenzen für eine Hypothese, welche als Ausgangsbasis weiterer Untersuchungen zum Geschehen bei „oxidativem Stress“ dienen soll (Abb. 57): PPF₁ fungieren als Signalstoffe einer „oxidativen Stress“-Situation in Pflanzen. Dabei wäre es denkbar, daß PPF₁ selbst Mediatoren der oxidativen Zellverletzung sind (wie es für die C20 homologen iPF im Tier diskutiert wird) oder in andere Signalkaskaden, wie beispielsweise der Jasmonatkaskade, eingreifen und so das Abwehrgeschehen beeinflussen.

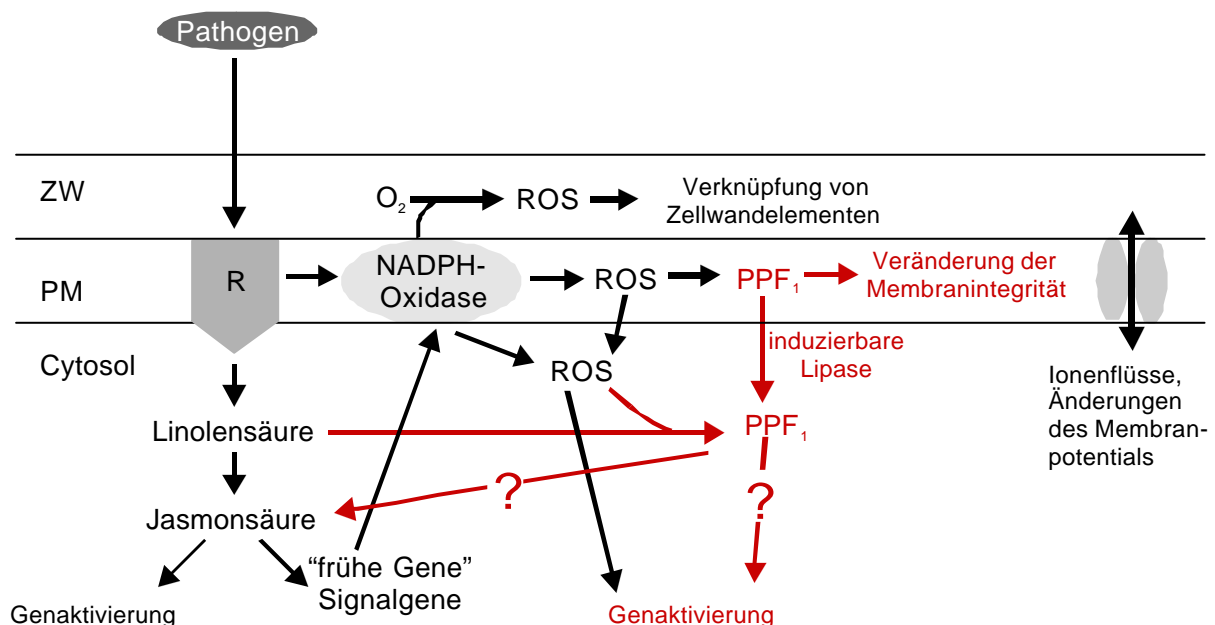


Abb. 57: Mögliche Beteiligung der PPF₁ bei der Pathogenabwehr. PM (Plasmamembran); R (möglicher Rezeptor); ROS (Reaktive Sauerstoffspezies, engl.: reactive oxygen species); ZW (Zellwand).

Es drängt sich ein Vergleich zwischen enzymatischen und der möglichen nicht-enzymatischen Signalwege in Tieren und höheren Pflanzen auf. Diese Signalwege sind in Abbildung 57 direkt gegenübergestellt.

Zwischen Jasmonaten und Prostaglandinen sind Parallelen zu erkennen, die nicht nur struktureller, sondern auch funktioneller Art sind (Bergey *et al.*, 1996). So sind beide Substanzgruppen Cyclopentanverbindungen, die am Abwehrgeschehen des jeweiligen Organismus beteiligt sind. Diese Parallelen können heute auf iPF_2 als mögliche Mediatoren des „oxidativen Stress“ im tierischen und PPF_1 im pflanzlichen System erweitert werden. Beide Substanzgruppen sind Cyclopentanverbindungen und werden über Radikal-katalysierte Oxidation gebildet. Die Konzentration von biologisch aktiven iPF_2 im Tier steigt mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation, verursacht durch Erkrankungen oder Intoxikationen, an. Die Konzentration an PPF_1 in Pflanzen steigt vermutlich ebenfalls mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation und PPF_1 weisen eine biologische Aktivität in Pflanzen auf. Während iPF_2 aufgrund der oben genannten Befunde als Mediatoren des „oxidativen Stress“ diskutiert werden, erfordert die Beurteilung der PPF_1 hinsichtlich einer möglichen Funktion als Mediatoren des „oxidativen Stress“ noch weitere Untersuchungen.

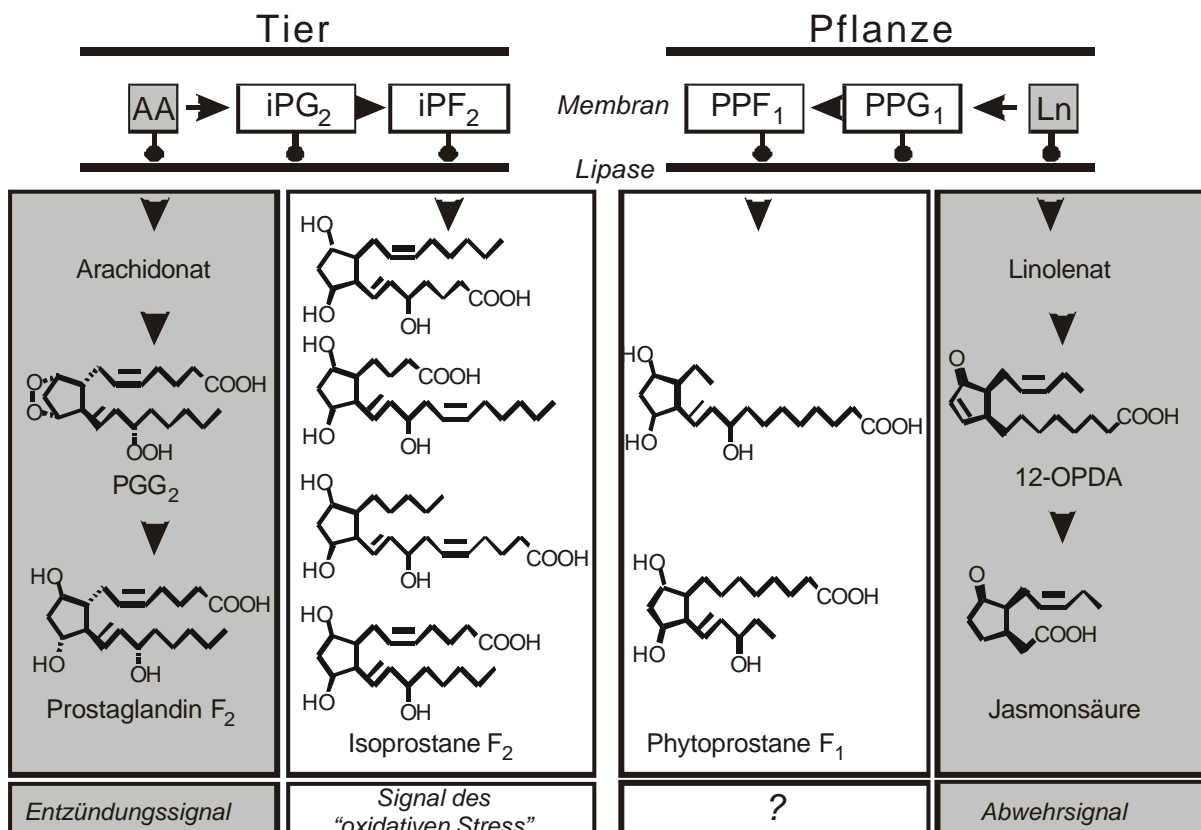


Abb. 58: Enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildete Cyclopentanverbindungen im tierischen und pflanzlichen Organismus. AA (Arachidonsäure); Ln (Linolensäure).

V.4 Biologische Aktivität im Tier

Prostaglandine sind Mediatoren im tierischen Organismus, die eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen regeln (siehe I.1.4, Tab. 2). Die strukturverwandten Isoprostane sind ebenfalls biologisch aktiv und werden als Signalstoffe, die bei „oxidativem Stress“ gebildet werden, diskutiert. Beide Verbindungsklassen werden endogen im Körper gebildet, rasch metabolisiert und wirken daher nur in der direkten Umgebung des Bildungsortes. Oral aufgenommene Prostanoiden werden schlecht resorbiert und schnell metabolisiert, so daß sie vermutlich auf diesem Wege keine Effekte im Tier erzielen. Metabolisch stabilere Prostaglandin-Analoga müssen bei oraler Anwendung mindestens in einer Dosierung von 100 µg verabreicht werden. Es ist denkbar, daß PPF₁ aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu PGF_{2α} und iPF_{2α}-III Wechselwirkungen mit deren Rezeptoren eingehen können und so eine biologische Aktivität im Tier besitzen.

Aufgrund des Nachweises von PPF₁ in allen in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen, kann davon ausgegangen werden, daß PPF₁ in vielen pflanzlichen Lebensmitteln vorkommen. Bei oraler Aufnahme werden Phytoprostane vermutlich schlecht resorbiert und rasch metabolisiert, so daß eine systemische Wirkung der Phytoprostane im tierischen Organismus vermutlich nicht zu erwarten ist. Dagegen könnten lokale Kontakte von Phytoprostanen mit Schleimhäuten, beispielsweise am Auge oder in den Bronchien, Reizungen hervorrufen.

Die topische Anwendung von PGF₂-Esteren oder -Analoga am Auge (ca. 1-10 µg/Auge) wird therapeutisch zur Senkung des Augeninnendrucks bei Glaukompatienten verwendet (McKibbin und Menage, 1999). Für iPF₂-III konnte gezeigt werden, daß es ein potenter Vasokonstriktor der Retinageschiffe ist (Lahaie *et al.*, 1998; Michoud *et al.*, 1998). Ein sehr interessantes Ergebnis wurde 2001 von Hou *et al.* veröffentlicht: Ein Metabolit des iPF_{2α}-III (15-F_{2t}-Isoprostane, 8-isoPGF_{2α}), 2,3-Dinor-5,6-dihydro-iPF_{2α}-III, besitzt eine vergleichbare biologische Aktivität wie sein Precursor in bezug auf Vasokonstriktion von Retina- und Gehirngeschiffen, sowie hinsichtlich der Steigerung des intrazellulären Calciumspiegels in Astrogliazellen (Hou *et al.*, 2001). Bis zu diesen Untersuchungen war kein Metabolit eines Prostanoids beschrieben, der eine biologische Aktivität aufweist, da die Metabolisierung vor allem der Inaktivierung von Prostanoiden dient. Dieser Befund zeigte zum ersten Mal, daß auch C18-Prostanoiden im tierischen Organismus hoch wirksame Verbindungen sein können.

Desweiteren konnte bei einer intratrachealen Verabreichung von iPF_{2α}-III (Verabreichung von 354 bzw. 3540 ng/Tier) eine Dosis-abhängige Verengung der Atemwege festgestellt werden. In höheren Dosen verursachte iPF_{2α}-III eine Plasmaexsudation (Okazawa *et al.*, 1997).

In diesem Zusammenhang sind die hohen Konzentrationen freier PPF₁ in frischen Birkenpollen (siehe IV.8.5) bemerkenswert. Der Gehalt an freien PPF₁ in *Betula pendula/pubescens*-Pollens (32440 ng/g) ist ca. eine Größenordnung höher als der Gehalt freier PPF₁ in anderen frischen Pflanzenorganen, auch wenn der Gehalt an veresterten PPF₁ annähernd dem anderer frischer Pflanzenorgane entspricht (Tab. 6). Da PPF₁ vermutlich gut wasserlöslich sind, ist es

denkbar, daß sie aus Pollen oder autoxidiertem Pflanzenstaub, der ins Auge oder in die oberen Atemwege gelangt ist, durch das wäßrige Milieu des tierischen Gewebes extrahiert werden und eventuell wie ihre C20-Homologen eine biologische Aktivität im Tier ausüben.

Bei ersten Versuchen, die mit reinen PPB₁-Isomeren vorgenommen wurden (unveröffentlichte Daten Thoma, 2000), zeigte sich, daß diese schwache bronchokonstriktorische Eigenschaften besitzen. Jedoch sind die C20-homologen Verbindungen, PGB₁, ebenfalls nur schwache Bronchokonstriktoren. Besonders stark wirksame Bronchokonstriktoren sind Prostanoiden mit F-Ringsystem wie beispielsweise PGF₁, PGF₂ und iPF_{2α}-III, wie bei intratrachealer Verabreichung dieser Substanzen am Meerschweinchen beobachtet werden konnte. Daher galt das Hauptaugenmerk den PPF₁. In ersten Versuchen wurden Meerschweinchen mit einem Isomerengemisch der PPF₁ behandelt (Dr. Jan Lötval, Lung Pharmacology Group, Dep. of Respiratory Medicine und Allergology, Sahlgrenska Hospital, Göteborg), wobei allerdings keine Bronchokonstriktion beobachtet wurde. Jedoch könnten aktive Isomere in dem Isomerengemisch in zu niedrigen Konzentrationen vorhanden gewesen sein. Und so bleibt zu zeigen, ob reine PPF₁-Isomere eine Bronchokonstriktion auslösen.

V.5 Ausblick

Phytprostane F_1 (PPF_1) sind Autoxidationsprodukte von α -Linolensäure, die sich durch chemische Stabilität und ihr vermutlich ubiquitäres Vorkommen im Pflanzenreich auszeichnen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich PPF_1 prinzipiell als Marker von Lipidperoxidation.

Die Induzierbarkeit der PPF_1 -Akkumulation durch „oxidativen Stress“ und die Induktion der Phytoalexinakkumulation bei Stimulation mit PPF_1 läßt die Vermutung zu, daß PPF_1 , ähnlich den Isoprostanen F_2 im Tier, Signalstoffe der oxidativen Zellverletzung darstellen. Diese Hypothese gilt es durch weitere Untersuchungen zu überprüfen. Eines der ersten Ziele dieser Versuche muß die Isolierung bzw. Synthese reiner PPF_1 -Isomere mit definierter Stereochemie sein, da bislang nur vier racemische PPF_1 -Diastereomere aus insgesamt theoretisch 32 Isomeren isoliert und untersucht wurden. Diese wiesen keine biologische Aktivität auf.

Die transienten PPF_1 -Konzentrationsverläufe nach Behandlung von pflanzlichen Zellen mit verschiedenen Stimuli lassen auf eine rasche Metabolisierung der PPF_1 schließen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie PPF_1 ihre Wirkung vermitteln. Erste Vorversuche (Daten nicht gezeigt) lassen die Vermutung zu, daß PPF_1 die Synthese von Jasmonsäure induzieren. Diese Befunde müssen jedoch noch bestätigt werden. Alternativ wäre es auch denkbar, daß PPF_1 aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Jasmonaten an Jasmonatrezeptoren binden. Allerdings sind die postulierten Jasmonatrezeptoren bislang noch nicht identifiziert worden.

Neben diesen „pflanzlichen“ Aspekten sollte eine mögliche Wirkung von PPF_1 auf den tierischen Organismus genauer untersucht werden. Voraussetzung für diese Untersuchungen ist die Verfügbarkeit von PPF_1 -Isomeren mit definierter Konfiguration.

VI. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Synthese von Prostaglandin-Analoga in Pflanzen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Isoprostane F₂ (iPF₂) konnten erstmals in einer Pflanze, *Marchantia polymorpha*, mittels GC-MS-Analyse nachgewiesen werden. In lebenden Zellen war die iPF₂-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Erst nach Abtöten und Lagerung der Zellen konnten iPF₂ eindeutig identifiziert werden. Die Bildung von Isoprostanen erfolgte vermutlich nicht-enzymatisch durch Autoxidation endogener Arachidonsäure.
2. Durch Autoxidation von α -Linolensäure *in vitro* wurden Prostaglandin F₂-ähnliche Verbindungen erhalten, die als Phytoprostane F₁ (PPF₁) bezeichnet werden. Mittels säulenchromatographischer Aufreinigung wurde ein PPF₁-Gemisch gewonnen, das theoretisch aus 2 Regioisomeren (Typ I und II) mit jeweils 16 Stereoisomeren besteht. Durch nachfolgende Reinigung über RP-HPLC konnten aus diesem Gemisch reine PPF₁-Regioisomere vom Typ I und II isoliert werden, die erstmals über hochauflösende Massenspektroskopie und NMR spektroskopisch charakterisiert werden konnten.
3. Es wurde eine GC-NICI-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von PPF₁ in biologischem Material entwickelt, welche sich durch eine hohe Spezifität und Linearität auszeichnet. Dieses Verfahren trennt offenkettige Triole, die durch Autoxidation von α -Linolensäure entstehen und eine Quantifizierung der PPF₁ stören können, ab. [¹⁸O]₃PPF₁ wurden aus Linolensäure durch Autoxidation unter ¹⁸O₂-Atmosphäre hergestellt. Die [¹⁸O]₃PPF₁-Isomerenmischung wurde quantifiziert und als interner Standard für GC-MS-Analysen verwendet. Die Nachweisgrenze für PPF₁ lag bei 100 pg.
4. PPF₁ konnten in freier und veresterter Form in pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden. Die Konzentration nicht veresterter PPF₁ belief sich in pflanzlichen Zellkulturen auf 23-316 ng/g TG, während in intakten Pflanzen Konzentrationen zwischen 43-1380 ng/g TG bestimmt werden konnten. Veresterte PPF₁ lagen in einer ca. 10fach höheren Konzentration vor. Eine Ausnahme bildeten Pollen verschiedener *Betula*-Arten, bei denen die Konzentration freier PPF₁ (1-32 μ g/g TG) die Konzentration veresterter PPF₁ (1-26 μ g/g TG) überstieg. In verschiedenen getrockneten Pflanzenmaterialien konnte eine um ca. den Faktor 10 erhöhte Konzentration an PPF₁ in Vergleich zu frischen Pflanzenmaterialien gemessen werden. Nicht veresterte PPF₁ konnten aus dem getrocknetem Pflanzenmaterial bei der Zubereitung eines Tees zu 90% in den wäßrigen Auszug extrahiert werden.

5. Insgesamt wurden 16 verschiedenen Pflanzenarten aus 13 systematisch weit entfernten Pflanzenfamilien untersucht, wobei in jeder Spezies PPF₁ nachgewiesen wurden. Diese Befunde lassen die Hypothese zu, daß PPF₁ ebenso wie der Precursor, α -Linolensäure, ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet sind.
6. „Oxidativer Stress“, ausgelöst durch die Zugabe von t-BuOOH, Kupfer(II)acetat, Eisen(II)sulfat und Quecksilber(II)chlorid zu pflanzlichen Zellsuspensionskulturen, führte zu einem Konzentrationsanstieg sowohl freier als auch veresterter PPF₁ in den Zellen. Die Steigerung der Konzentration variierte je nach Art und Konzentration des Agens. Damit konnte erste Evidenz dafür erhalten werden, daß die PPF₁-Konzentration vom Ausmaß der Lipidperoxidation einer Zelle abhängt.
7. Nach Verwundung von Pfefferminzblättern kommt es zu einem transienten Konzentrationsanstieg von freien und veresterten PPF₁. Die Steigerungen beliefen sich auf ca. das 4.5fache bzw. 2.7fache der Konzentrationen nicht verwundeter Zellen. Daraus kann geschlossen werden, daß eine Verwundung von Pflanzen zu einer Lipidperoxidation führt.
8. Der Zusatz eines vorgereinigten PPF₁-Gemisches zu *Eschscholzia californica*-, *Crotalaria cobaticola*-, *Thalictrum tuberosum*-Zellsuspensionskulturen führte zur Akkumulation von Phytoalexinen in den Zellen.
Aus dem Befund, daß die Konzentration der PPF₁ bei „oxidativem Stress“ anstieg und daß der Zusatz von PPF₁ zu verschiedenen Zellkulturen eine Phytoalexinakkumulation hervorrief, kann abgeleitet werden, daß PPF₁ biologisch relevante Lipidperoxidationsprodukte sind. Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob PPF₁ Mediatoren von „oxidativem Stress“ *in vivo* sind.
9. PPF₁ wurden über RP-HPLC aufgetrennt, um reine PPF₁-Isomere zu isolieren. Dabei wurden vier reine racemische Regioisomere in einer Menge erhalten, die es erlaubte ihre Struktur aufzuklären und ihre biologische Aktivität zu testen. Alle vier erhaltenen PPF₁-Isomere induzierten im *Eschscholzia californica*-Testsystem jedoch keine Steigerung der Phytoalexinakkumulation.

VI. Summary

Investigations of the synthesis of prostaglandin-like compounds in plants revealed the following results:

1. For the first time, Isoprostanes F₂ (iPF₂) were detected in a plant, *Marchantia polymorpha*, using a GC-MS-analysis method. In intact cells, the iPF₂-concentration was below the limit of detection. After forcing lipidperoxidation by a freeze damage of the cells, iPF₂ could be unequivocally identified.
2. PGF₂-like compounds, termed phytoprostanes F₁ (PPF₁), were prepared by autoxidation of α -linolenic acid. PPF₁ were isolated and purified by column-chromatography and yielded a complex isomeric mixture of PPF₁ comprising two regioisomers (type I and II). In addition, each regioisomer is theoretically comprised of 16 isomers. The mixture of PPF₁ was analyzed by RP-HPLC and PPF₁ were partially resolved. For the first time, pure regioisomers type I and II were isolated and analyzed by HR-MS and NMR.
3. A highly sensitive GC-NICI-MS-method was developed to quantify PPF₁ in plant material. Accuracy and precision of the method were validated. Using this method, acyclic trihydroxylated linolenic acid derivatives, which can interfere with the quantification of PPF₁, were separated from PPF₁. [¹⁸O]₃PPF₁ were synthesized by autoxidation of linolenic acid under an ¹⁸O₂-atmosphere and used as internal standard for GC-MS-analysis. The lower limit of detection of PPF₁ was approximately of 100 pg.
4. PPF₁ were found in plant cells in free and esterified form. The concentration of free PPF₁ amounted to 23-316 ng/g of dry weight in plant cell cultures and 43-1380 ng/g of dry weight in plant cells, whereas the concentrations of esterified PPF₁ were 10times higher. Birch pollen were an exception due to the fact that the concentration of free PPF₁ (1-32 μ g/g of dry weight) exceeded the levels of esterified PPF₁ (1-26 μ g/g of dry weight). Dried plant drugs contained PPF₁ concentrations which were about 10times higher than in fresh plant material. About 90% of free PPF₁ were extracted by preparing a tea from dried plant material.
5. Altogether PPF₁ were detected in 16 different plant species belonging to 13 systematically different plant families. These findings and the fact that the precursor of PPF₁, linolenic acid, exists ubiquitously in the plant kingdom suggests that PPF₁ also occur ubiquitously in the plant kingdom.
6. "Oxidative stress", which was triggered by the addition of t-BuOOH, copper(II)acetate, iron(II)sulfate and mercury(II)chloride in plant cell cultures, induced elevated levels of

PPF₁ in comparison with non-treated cells. The increase of the concentration depended on the stimulus itself and its concentration. Therefore we concluded that levels of PPF₁ are directly correlated to the status of lipidperoxidation in a cell.

7. Wounding of peppermint leaves lead to an increase of the levels of free and esterified PPF₁. The rise of PPF₁ levels were about 4.5 or 2.7times in comparison to the levels of PPF₁ in control cells respectively.
8. The addition of a prepurified mixture of PPF₁ to *Eschscholzia californica*-, *Crotalaria cobaticola*- and *Thalictrum tuberosum*-cell suspension cultures triggered accumulation of phytoalexines. With respect to these findings, we can say that PPF₁ are biologically active substances. However, at this time it is not clear if PPF₁ are mediators of “oxidative stress”.
9. In an attempt to identify the biologically active PPF₁-isomers, PPF₁ were resolved by RP-HPLC. However, only four racemic isomers out of 32 theoretically possible PPF₁ isomers were obtained in sufficient quantity and purity to allow structure determination and biologically testing. All of the four purified isomers were inactive in the *Eschscholzia californica*-bioassay. Thus, the biologically active isomer yet remains to be identified.

VII. Literaturverzeichnis

- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., & Turner, W. B. (1971). "Metabolites of *Lasidiodiplodia theobromae*." *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1623-27.
- Alechnik, S. I., Leo, M. A., Aleynik, M. K., & Lieber, C. S. (1998). "Increased circulating products of lipid peroxidation in patient with alcoholic liver disease." *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22, 192-196.
- Attrep, K. A., Bellman, W. P., Attrep, M. J., Lee, J. B., & Braselton, W. E. J. (1980). "Separation and identification of prostaglandin A₁ in onion." *Lipids*, 15, 292-297.
- Audoly, L. P., Rocca, B., Fabre, J.-E., Koller, B. H., Thomas, D., Loeb, A. L., Coffmann, T. M., & FitzGerald, G. A. (2000). "Cardiovascular Response to the Isoprostanes iPF₂α-III and iPE₂-III Are Mediated via the Thromboxane A₂ Receptor In Vivo." *Circulation*, 101, 2833-2840.
- Austin, S. C., & Funk, C. D. (1999). "Insight into prostaglandin, leukotrien, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions." *Prostaglandins and other Lipid Mediators*(58), 231-252.
- Barrow, S. E., & Taylor, G. W. (1987). "Gas chromatography and mass spectrometry of eicosanoids. In: Prostaglandins and related substances (Benedetto, C., McDonald-Gibson, R.G., Nigam, S. and Slater, T.F., Hrsg.) IRL Press, Oxford." .
- Beale, M. H., & Ward, J. L. (1998). "Jasmonates: key players in the plant defence." *National Product Reports*.
- Bell, E., Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). "A chloroplast lipoxygenase is required for wound induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8675-8679.
- Bergey, D. R., Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1996). "Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibit analogies to defense signaling in animals." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12053-12058.
- Bernardo, A., Levi, J., & Minghetti, L. (2000). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) and its natural ligand 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ in the regulation of microglial functions." *Eur. J. Neurosci.*, 12, 2215-2223.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Xia, Z.-Q., & Zenk, M. H. (1995). "The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4099-4105.
- Blee, E. (1998). "Phytooxylipins and plant defense reactions." *Prog. Lipid Res.*, 37, 33-72.
- Bowler, C., & Fluhr, R. (2000). "The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross tolerance." *Trends Plant Sci.*, 5, 241-246.
- Brash, A. R., Baertschi, S. W., Ingram, C. D., & Harris, T. M. (1988). "Isolation and characterization of natural allene oxides: Unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3382-3386.

- Bundy, G. L. (1985). "Nonmammalian sources of eicosanoids." *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, J. E. Pike and D. R. Morton, eds., Raven Press, New York, 229-262.
- Burk, R. F., Hill, K. E., Awad, J. A., Morrow, J. D., Kato, T., Cockell, K. A., & Lyons, P. R. (1995). "Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P." *Hepatology*, 21, 561-569.
- Burke, A., Lawson, J. A., Meagher, E. A., Rokack, J., & FitzGerald, G. A. (2000). "Specific Analysis in Plasma and Urine of 2,3-Dinor-5,6-dihydro-isoprostane F₂α-III, a Metabolite of Isoprostane F₂α-III and an Oxidation Product of γ-Linolenic Acid." *J. Biol. Chem.*, 275(4), 2499-2504.
- Chiou, S.-Y., Su, W.-W., & Su, Y.-C. (2001). "Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture." *J. Biotech.*, 85, 247-257.
- Corey, E. J., Shih, C., Shih, N.-Y., & Shimoji, K. (1984). "Preferential formation of 8-*epi*-prostaglandin F₂α via the corresponding endoperoxide by a biomimetic cyclization." *Tetrahedron Lett.*, 25, 5013-5016.
- Corey, E. J., & Wang, Z. (1994). "Conversion of arachidonic acid to the prostaglandin endoperoxide PGG₂, a chemical analog of the biosynthetic pathway." *Tetrahedron Lett.*, 35, 539-542.
- Creelman, R. A. (1998). "Jasmonate perception: characterisation of COI1 mutants provides first clues." *Trends Plant Sci.*, 3, 367-368.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). "Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4114-4119.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). "Biosynthesis and action of jasmonates in plants." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 355-381.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., & Mullet, J. E. (1992). "Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4939-4941.
- Croft, K. P. C., Jüttner, F., & Slusarenko, A. J. (1993). *Plant Physiol.*, 101, 13-24.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Clijsters, H. (1999). "The Chemical Behaviour of Heavy Metals Plays a Prominent Role in the Induction of Oxidative Stress." *Free Rad. Res.*, 31, 39-43.
- Davi, G., Ciabattini, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F., & Patrono, C. (1999). "In vivo formation of 8-*iso*-prostaglandin F₂α and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation." *Circulation*, 99, 224-229.

- Delanty, N., Reilly, M. P., Pratico, D., Lawson, J. A., McCarthy, J. F., Wood, A. E., Ohnishi, S. T., Fitzgerald, D. J., & Fitzgerald, G. A. (1997). "8-*epi*-PGF₂ α generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress *in vivo*." *Circulation*, 95, 2492-2499.
- Demole, E., Lederer, E., & Mercier, D. (1962). "Isolement et determination de la structure du jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique de l'essence de jasmin." *Helv. Chim. Acta*, 45, 675-85.
- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W., & Ryan, C. A. (1995). "Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4095-4098.
- Dormandy, T. L., & Wickens, D. G. (1987). "The experimental and clinical pathology of diene conjugation." *Chem. Phys. Lipids*, 45, 356-364.
- Dworski, R., Murray, J. J., Roberts, L. J., II, Oates, J. A., Morrow, J. D., Fisher, L., & Sheller, J. R. (1999). "Allergen-induced synthesis of F₂-isoprostanes in atopic asthmatics: evidence for oxidative stress." *Am. J. Resp. Crit. Care Med*, 160, 1947-1951.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). "Chemistry and Biosynthesis of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes." *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 81-128.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). "Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 7713-7716.
- 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.
- Fukunaga, M., Makita, N., Roberts, L. J., Morrow, J. D., Takahashi, K., & Badr, K. F. (1993a). "Evidence of the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells." *Am. J. Physiol.*, 264, C1619-C1624.
- Fukunaga, M., Takahashi, K., & Badr, K. F. (1993b). "Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-*iso*-prostaglandin E₂, an E₂-isoprostane." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195, 507-515.
- Galle, K., Bladt, S., & Wagner, H. (1994). "Mahonia- DC- und HPLC-Analyse der Rinde von Mahonia aquifolium und anderer Mahonia-Arten." *DAZ*, 49, 35-44.
- Garcia, A., Baquedano, F. J., Navarro, P., & Castillo, F. J. (1999). "Oxidative Stress Induced by Copper in Sunflower Plants." *Free Rad. Res.*, 31, 45-50.
- Gerhardt, B. (1983). "Localization of β -oxidation enzymes in peroxisomes isolated from nonfatty plant tissues." *Planta*, 159, 238-246.
- Gerwick, W. H. "Eicosanoids in Nonmammals." .
- Gniwotta, C., Morrow, J. D., Roberts, L. J., & Kühn, H. (1997). "Prostaglandin F₂-like compounds, F₂-Isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions." *Arteroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 3236-3241.

- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., & Rosahl, S. (2001). "Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells." *JBC*, 276(9), 6267-6273.
- Gregson, R. P., Marwood, J. F., & Quinn, R. J. (1979). "The occurrence of prostaglandins PGE₂ and PGF₂α in a plant - the red algae *Gracilaria lichenoides*." *Tetrahedron Lett.*, 46, 4505-4506.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2389-2393.
- Gutteridge, J. M. C. (1986). "Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation." *Free Rad. Res. Commun.*, 1, 173-184.
- Hamberg, M. (1988). "Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 156, 543-550.
- Hamberg, M., & Gardner, H. W. (1992). "Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance." *Biochim. Biophys. Acta*, 1165(1), 1-18.
- Hamberg, M., Sanz, A., & Castresana, C. (1999). "α-Oxidation of fatty acids in higher plants: identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX) as an α-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid." *J Biol Chem*, 274, 24503-24513.
- Hamberg, M., Svensson, J., & Samuelson, B. (1975). "Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides." *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2294-2298.
- Heneka, M. T., Klockgether, T., & Feinstein, D. L. (2000). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Ligands Reduce Neuronal Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Cell Death In Vivo." *J. Neurosci.*, 20, 6862-6867.
- Hou, X., Roberts II, L. J., Taber, D. F., Morrow, J. D., Kanai, K., Gobeil jr., F., 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." *AJP-Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281, R391-R400.
- Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J., & Ryan, C. A. (1996). "An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is comprised in signalling for defense against insect attack." *Plant Cell*, 8, 2067-2077.
- Ichiro, N., Kazuhiko, S., & Masahisa, T. (1992). "Purification of prostaglandins from the far east seaweed *Gracilaria verrucosa* using nonpolar porous resins." *Japan Patent 04112866*, Chem. Abstr. 1992; 117: 90040z.
- Imbusch, R., & Mueller, M. J. (2000). "Formation of isoprostane F₂-like compounds (phytoprostanes F₁) from α-linolenic acid in plants." *Free Radical Biol. Chem.*, 28(2), 720-726.
- Imbusch, R., & Mueller, M. J. (2000). "Analysis of Oxidative Stress and Wound -Inducible Dinor Isoprostanes F₁ (Phytoprostanes F₁) in Plants." *Plant Physiol*, 124(1-11).

- Itoh, S., Lu, R., Bao, Y., Morrow, J. D., Roberts, L. J., & Schuster, V. L. (1996). "Structural determinants of substrates for the prostaglandin transporter PGT." *Mol. Pharmacol.*, 50, 736-742.
- Janistyn, B. (1982). "Gas chromatographic-mass spectroscopic identification of prostaglandin F_{2α} in flowering *Kalanchoe blossfeldiana* v. Poelln." *Planta*, 154, 485-487.
- Kanai, N., Lu, R., Satriano, J. A., Bao, Y., Wolkoff, A. W., & Schuster, V. L. (1995). "Identification and characterization of a prostaglandin transporter." *Science*, 268(5212), 866-869.
- Kang, K. H., Morrow, J. D., Roberts, L. J., Newman, J. H., & Banerjee, M. (1993). "Airway and vascular effects of 8-*epi*-prostaglandin F_{2α} in isolated perfused rat lung." *J. Appl. Physiol.*, 74, 460-465.
- Kato, T., Yamaguchi, Y., Abe, N., Uyehara, T., Nakai, T., Kodama, M., & Shiobara, Y. (1985). *Tetrahedron Lett.*, 26, 2357-2360.
- Kinsella, B. T., O'Mahony, D. J., & FitzGerald, G. A. (1997). "The human thromboxane A₂ receptor α-isoform (TPα) functionally couples to the G proteins G_q and G₁₁ *in vivo* and is activated by the isoprostane 8-*epi*-prostaglandin F_{2α}." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281(2), 957-964.
- Koljak, R., Järving, I., Kurg, R., Boeglin, W. E., Varvas, K., Valmsen, K., Ustav, M., Brash, A. R., & Samel, N. (2000). "The Basis of Prostaglandin Synthesis in Coral: Molecular Cloning and Expression of a Cyclooxygenase from the Artic Soft Coral *Gersemia fruticosa*." *JBC*.
- Kromer, B. M., & Tippins, J. R. (1996). "Coronary artery constriction by the isoprostane 8-*epi* prostaglandin F_{2α}." *Br. J. Pharmacol.*, 119, 1276-1280.
- Lahaie, I., Hardy, P., Hou, X., Hassessian, H., Asselin, P., Lachapelle, P., Almazan, G., Varma, D. R., Morrow, J. D., Roberts, L. J., & Chemtob, S. (1998). "A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F_{2α} on retinal vessels." *Am. J. Physiol.*, 274, R1406-R1416.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). "The oxidative burst in plant disease resistance." *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 48, 251-275.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Holländer-Czytko, H., & Weiler, E. W. (1996). "Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates." *Plant Mol. Biol.*, 31, 323-335.
- Lawson, J. A., Rokach, J., & FitzGerald, G. A. (1999). "Isoprostanes: Formation, Analysis and Use As Indices of Lipid Peroxidation *in Vivo*." *J. Biol. Chem.*, 274(35), 24441-24444.
- Lim, R. W., Varnum, B. C., & Herschman, H. R. (1987). "Cloning of tetradecanoylphorbol ester induced "primary response" sequences and their expression

- in density-arrested swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant." *Oncogene*, 1, 257-262.
- Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). "Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- Litu, T.-Z., Stern, A., & Morrow, J. D. (1998). "The Isoprostanes: Unique Bioactive Products of Lipid Peroxidation." *J. Biomed. Sci.*, 5, 415-420.
- Longmire, A. W., Swift, L. L., Roberts, L. J., Awad, J. A., Burk, R. F., & Morrow, J. D. (1994). "Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes." *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1173-1177.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J., Hrsg. (1982). "Molecular cloning: A laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Marks, F., & Fürstenberger, G. (1999). *Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids*, WILEY-VCH.
- Marley, R., Harry, D., Anand, R., Fernando, B., Davies, S., & Moore, K. (1997). "8-Isoprostaglandin F_{2α}, a product of lipid peroxidation, increases portal pressure in normal and cirrhotic rats." *Gastroenterology*, 112, 208-213.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., & Browse, J. (1997). "Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5473-5477.
- McKibbin, M., & Menage, M. J. (1999). "The effect of once-daily latanoprost on intraocular pressure and pulsatile ocular blood flow in normal tension glaucoma." *Eye*, 13, 1-4.
- Michal, G. (1998). *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Michoud, E., Lecompte, M., Lagarde, M., & Wiernsperger, N. (1998). "In vivo effect of 8-epi-PGF_{2α} on retinal circulation in diabetic and non-diabetic rats." *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 59, 349-355.
- Mobert, J., Becker, B. F., Zahler, S., & Gerlach, E. (1997). "Hemodynamic effects of isoprostanes (8-iso-prostaglandin F_{2α} and E₂) in isolated guinea pig hearts." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29, 789-794.
- Morham, S. G., Langenbach, R., Loftin, C. D., Tiano, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A., & Smithies, O. (1995). "Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse." *Cell*, 83, 473-482.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, H. J., Blair, I. A., & Roberts, L. J. (1992a). "Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed *in situ* in phospholipids." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10721-10725.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K. F., Roberts, L. J., & Burk, R. F. (1992b). "Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-

- isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation." *J. Clin. Invest.*, 90, 2502-2507.
- Morrow, J. D., Harris, T. M., & Roberts, L. J. (1990a). "Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids." *Anal. Biochem.*, 184, 1-10.
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., & Roberts, L. J. (1990b). "A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9383-9387.
- 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, L. J. (1994). "Free radical-induced generation of isoprostanes *in vivo*. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes." *J. Biol. Chem.*, 269, 4317-4326.
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1994). "Mass spectrometry of prostanoids: F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism." *Methods Enzymol.*, 233, 163-174.
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1996). "The isoprostanes: current knowledge and directions for future research." *Biochem. Pharmacol.*, 51(1), 1-9.
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1997). "The isoprostanes: unique bioreactive products of lipid peroxidation." *Prog. Lipid Res.*, 36, 1-21.
- Mosier, D. G., Peterson, D. E., & Regehr, D. L. (1990). "Herbicide - Mode of Action." *Cooperative Extension Service, Kansas State University, Manhattan.*
- Mueller, M. J. (1997). "Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis." *Physiol. Plant.*, 100, 653-663.
- Mueller, M. J. (1998). "Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes." *Chem. Biol.*, 5, 323-333.
- Mueller, M. J., & Brodschelm, W. (1994). "Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry." *Anal. Biochem.*, 218, 425-435.
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., & Zenk, M. H. (1993). "Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7490-7494.
- Narvaéz-Vásquez, J., Florin-Christensen, J., & Ryan, C. A. (1999). "Positional Specificity of a Phospholipase A Activity Induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors in Tomato Leaves." *The Plant Cell*, 11, 2249-2260.
- Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J. N., Hicks, E., Coffman, T. M., Anderson, P. A. W., Malouf, N. N., & Koller, B. H. (1997). "The prostaglandin receptor EP₄ triggers remodelling of the cardiovascular system at birth." *Nature*, 390, 78-81.

- Nugteren, D. H., Vonkeman, H., & Van Dorp, D. A. (1967). "Non-enzymatic conversion of all-*cis* 8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E₁." *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 86, 1237-1245.
- O'Connor, D. E., Mihelich, E. D., & Coleman, M. C. (1981). "Isolation and characterisation of bicyclo endoperoxides derived from methyl linolenate." *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 223-224.
- O'Connor, D. E., Mihelich, E. D., & Coleman, M. C. (1984). "Stereochemical course of the autoxidative cyclization of lipid hydroperoxides to prostaglandin-like bicyclo endoperoxides." *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 3577-3584.
- Okazawa, A., Kawikova, I., Cui, Z. H., Skoogh, B. E., & Lotvall, J. (1997). "8-*epi*-PGF₂α induces airflow obstruction and airway plasma exudation *in vivo*." *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155, 436-441.
- Orozco-Cárdenas, M. L., & Ryan, C. A. (1999). "Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via octacecanoid pathway." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 6553-6557.
- Orozco-Cárdenaz, M. L., Narváes-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). "Hydrogen peroxide acts as second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate." *The Plant Cell*, 13, 179-191.
- Panossian, A. G., Avetissian, G. M., Mnatsakanian, V. A., Batrakov, S. G., Vartanian, S. A., Gabrielian, E. S., & Amroyan, E. A. (1983). "Unsaturated polyhydroxy acids having prostaglandin-like activity from *Bryonia alba* II. Major components." *Planta Med.*, 47, 17-25.
- Parchmann, S. (1999). "Prostaglandin-Analoga in Pflanzen: 12-oxo-Phytodiensäure und Dinor-Isoprostane." *Herbert Utz Verlag*.
- Parchmann, S., & Mueller, M. J. (1998). "Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from α-linolenic acid in plants." *J. Biol. Chem.*, 273, 32650-32655.
- Porter, N. A., Zuraw, P. J., & Sullivan, J. A. (1984). "Peroxymercuration-demercuration of lipid hydroperoxides." *Tetrahedron Lett.*, 25, 807-810.
- Pratico, D., Barry, O. P., Lawson, J. A., Adiyaman, M., Hwang, S.-W., Khanapure, S. P., Iuliano, L., Rokach, J., & FitzGerald, G. A. (1998a). "iPF₂α-I: An index of lipid peroxidation in humans." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3449-3454.
- Pratico, D., & FitzGerald, G. A. (1996). "Generation of 8-*epi*prostaglandin F₂α by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2." *J. Biol. Chem.*, 271, 8919-8924.
- Pratico, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L., Lawson, J. A., Rokach, J., Maclouf, J., Violi, F., & FitzGerald, G. A. (1997). "Localization of distinct F₂-isoprostanes in human atherosclerotic lesions." *J. Clin. Invest.*, 100, 2028-2034.
- Pratico, D., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1995). "Cyclooxygenase-dependent formation of 8-*epi*-PGF₂α in human platelets." *J. Biol. Chem.*, 270, 9800-9808.

- Pratico, D., MY Lee, V., Trojanowski, J. Q., Rokach, J., & Fitzgerald, G. A. (1998b). "Increased F₂-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation *in vivo*." *FASEB J.*, 12, 1777-1783.
- Pratico, 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, 14916-14924.
- Pryor, W. A., Stanley, J. P., & Blair, E. (1976). "Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides." *Lipids*, 11, 370-379.
- Rakwal, R., Tamogami, S., & Kodama, O. (1996). "Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production." *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1046-1048.
- Reilly, M., Delantray, N., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1996). "Modulation of oxidant stress *in vivo* in chronic cigarette smokers." *Circulation*, 94, 19-25.
- Reily, C. A., Cohen, G., & Lieverman, M. (1974). "Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation." *Science*, 183, 208-212.
- Roberts, L. J., Montine, T. J., Markesbery, 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." *J. Biol. Chem.*, 273, 13605-13612.
- Roberts, L. J., Moore, K. P., Zackert, W. E., Oates, J. A., & Morrow, J. D. (1996). "Identification of the major urinary metabolite of the F₂ isoprostane 8-isoprostaglandin F₂ α in humans." *J. Biol. Chem.*, 271, 20617-20620.
- Roberts, L. J., & Morrow, J. D. (1997). "The generation and actions of isoprostanes." *Biochim. Biophys. Acta*, 1345, 121-135.
- Roberts, L. J., II, & Morrow, J. D. (2000). "Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*." *Free Rad. Biol. Med.*, 28(4), 505-513.
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G., & Sánchez-Serrano, J. (1998). "Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and acid-independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal*, 3, 153-165.
- Rokach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S.-W., Adiyaman, M., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1997a). "The isoprostanes: a perspective." *Prostaglandins*, 54, 823-851.
- Rokach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S.-W., Adiyaman, M., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1997b). "Nomenclature of Isoprostanes: A proposal." *Prostaglandins*, 54, 853-873.
- Sandermann jr., H. (2000). "Active oxygen species as mediators of plant immunity: three case studies." *Biol. Chem.*, 381, 649-653.

- Sanz, A., Moreno, J. I., & Castresana, C. (1998). "PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase." *Plant Cell*, 10, 1523-1537.
- Schaller, F. (2001). "Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules." *J. Exp. Bot.*, 52(354), 11-23.
- Schaller, F., & Weiler, E. W. (1997). "Molecular cloning and characterisation of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*." *J. Biol. Chem.*, 272, 28066-28672.
- 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(6), 1511-1516.
- Serhan, C. N., Haeggström, J. Z., & Leslie, C. C. (1996). "Lipid mediator network in cell signaling: update and impact of cytokines." *FASEB J.*, 10, 1147-1158.
- Sinzinger, H., Oguogho, A., & Kaliman, J. (1997). "Isoprostane 8-*epi*-prostaglandin F_{2α} is a potent contractor of human peripheral lymphatics." *Lymphology*, 30, 155-159.
- Song, W. C., Funk, C. D., & Brash, A. R. (1993). "Molecular cloning of allen oxide synthase: a cytochrome P 450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8519-8523.
- Stehle, R. G. (1982). "Physical chemistry, stability, and handling of prostaglandins E₂, F_{2α}, D₂, & I₂: a critical summary." *Methods Enzymol.*, 86, 436-458.
- Stelmach, B. A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert- Zsilavec, M., & Weiler, E. W. (2001). "A Novel Class of Oxylipins, sn1-O-(12-Oxophytodienoyl)- sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*." *JBC*, 276(16), 12832-12838.
- Stintzi, A., & Browse, A. (2000). "The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis." *PNAS*, 97(19), 10625-10630.
- Stohs, S. J., & Bagachi, D. (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 321-326.
- Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K.-Y., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negeshi, M., Ichikawa, A., & Narumiya, S. (1997). "Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor." *Science*, 277, 681-683.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2000). *Physiologie der Pflanzen*, Spektrum Verlag.
- Takabashi, K., Nammour, T. M., Fukunaga, M., Ebert, J., Morrow, J. D., Roberts, L. J., Hoover, R. L., & Badr, K. F. (1992). "Glomerular action of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-*epi*-prostaglandin F_{2α}, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors." *J. Clin. Invest.*, 90, 136-141.

- Valmsen, K., Järving, I., Boeglin, W. E., Varvas, K., Koljak, R., Pehk, T., Brash, A. R., & Samel, N. (2001). "The origin of 15R-prostaglandins in the caribbean coral *Plexaura homomalla*: molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase." *PNAS*, 98(14), 7700-7705.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., & Botting, R. M. (1998). "Cycloosygenases 1 and 2." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 97-120.
- Varvas, K., Järving, I., Koljak, R., Valmsen, K., Brash, A. R., & Samel, N. (1999). "Evidence of a Cyclooxygenase-related Prostaglandin Synthesis in Coral." *J. Biol. Chem.*, 274(15), 9923-9929.
- Vick, B. A., Feng, P., & Zimmerman, D. C. (1980). "Formation of 12-(18O)oxo-cis-10, cis-15-phytodienoic acid from 13-(18O)hydroperoxylinolenic acid by hydroperoxide cyclase." *Lipids*, 15, 468-471.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984). "Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species." *Plant Physiol.*, 75, 458-461.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1987). "Pathway of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts." *Plant. Physiol.*, 85, 1073-1078.
- Vick, B. A., & Zimmermann, D. C. (1984). "Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species." *Plant Physiology*, 75, 458-461.
- Walter, M. F., Blumberg, J. B., Dolnikowski, G. G., & Handelsmann, G. J. (2000). "Streamlined F₂-Isoprostane Analysis in Plasma and Urine with High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectroscopy." *Anal. Biochem.*, 280, 73-79.
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D., & Farmer, E. E. (1999). *Plant Cell*, 11, 485-493.
- Weiler, E. W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Liß, H., Andert, L., & Spengler, P. (1993). "Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendrill coiling response of *Bryonia dioica*." *Phytochemistry*, 32, 591-600.
- Weiler, E. W., Kutchan, T. M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., & Bublitz, F. (1994). "The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants." *FEBS Lett.*, 345, 9-13.
- Weiler, E. W., Laudert, D., Schaller, F., Stelmach, B., & Hennig, P. (1998). "Fatty acid-derived signaling molecules in the interaction of plants with their environment." *Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions*, E. Romeo, ed., Plenum Press, New York, 179-205.
- Xie, D.-X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). "*COII*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility." *Science*, 280, 1091-1094.

- Yeo, H. C., Helbock, H. J., Chyu, D. W., & Ames, B. N. (1994). "Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry." *Anal. Biochem.*, 220, 391-396.
- Ziegler, J., Hamberg, M., Miersch, O., & Parthier, B. (1997). "Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds." *Plant Physiol.*, 114, 565-573.
- Zimmerman, D. C., & Feng, P. (1978). "Characterization of a prostaglandin-like metabolite of linolenic acid produced by a flaxseed extract." *Lipids*, 13, 313-316.

Teile der folgenden Arbeit fanden Eingang in folgende Veröffentlichungen:

Imbusch, R., and Mueller, M. J. (2000). "Analysis of Oxidative Stress and Wound -Inducible Dinor Isoprostanes F₁ (Phytoprostanes F₁) in Plants." *Plant Physiol*, 124(1-11).

Imbusch, R., and Müller, M. J. (2000). "Formation of isoprostane F₂-like compounds (phytoprostanes F₁) from α -linolenic acid in plants." *Free Radical Biol. Chem.*, 28(2), 720-726.

Vorträge:

„Phytoprostanes - a novel group of Prostaglandine-like compounds in plants“
Anlässlich des „Second European Graduate Student Meeting 2000“ in Frankfurt/Main, 3-5 Mai 2000

Posterpräsentationen:

Imbusch, R., Parchmann, S., Mueller, M. J. (2000) Phytoprostanes - a novel group of Prostaglandine-like compounds in plants.
Second European Graduate Student Meeting 2000 in Frankfurt/Main, 3-5 Mai 2000

Imbusch, R., Parchmann, S., Mueller, M. J. (2001) Phytoprostanes - a novel group of Prostaglandine-like compounds in plants.
Nonmammalian Eicosanoids 2000 in Berlin, 29-31 Mai 2000

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. J. Müller für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine fortwährende Unterstützung in wissenschaftlicher Hinsicht und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und sein Engagement waren mir stets ein Ansporn.

Herrn Dr. W. Spahl (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) gilt mein Dank für die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren. Herrn Dr. H. Lerche (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) danke ich für die Erstellung von NMR-Spektren.

Von unschätzbarem Wert war die gute Zusammenarbeit mit allen Kolleginnen und Kollegen im Labor. Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. S. Krischer, Herrn M. Krischke, Frau I. Thoma und Frau Dr. S. Parchmann. Im gleichen Maße danke ich Frau M. Eisenmann und Herrn W. Rödel für ihre tatkräftige und kompetente Unterstützung. Das außerordentlich gute Arbeitsklima und die Kameradschaft waren die Grundlage einer besonders guten Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. M. Ruffer bedanken für wertvolle wissenschaftliche Ratschläge, wie auch für den persönlichen Rückhalt durch Freundschaft und Vertrauen.

Für anregende fachliche Diskussionen und wertvolle Hinweise zur Anfertigung der Arbeit möchte ich mich bei Frau Dr. G. Gresser und Frau Dr. C. Löffler bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meinen Eltern und der Familie, die mir durch ihre Unterstützung und Förderung diese Ausbildung erst ermöglichten, sowie Klaus, der mir den privaten Rückhalt gab, das nötige Durchhaltevermögen aufzubringen diese Arbeit zu Ende zu führen. Ebenso danke ich meinen Freunden, vor allem Angela, Dorte und Jens und Familie Hartmann, die mir mit technischer Hilfestellung und Freundschaft stets zur Seite standen.

Lebenslauf

Ruth Imbusch
Hauptstr. 38
97218 Gerbrunn
Telefon: 0931-4047969
E-Mail: imbusch@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Persönliche Angaben Geburtsdatum: 30.04.1971

Geburtsort: Vechta

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung 1977 – 1981, Grundschule Alexander, Vechta

1981 – 1990, Gymnasium Liebfrauenschule, Vechta

Studium 10.1990 – 05.1995, Studium der Pharmazie an der Technischen
Universität Braunschweig

Famulatur 15.07. – 31.08.91, Johannesapotheke, Bakum, Niedersachsen

01.09. – 30.09.92, Johannesapotheke, Bakum, Niedersachsen

Erster Abschnitt der 02.09.1993
Pharmazeutischen
Prüfung

Zweiter Abschnitt der 26.05.1995
Pharmazeutischen
Prüfung

Praktikum zur
praktischen
Ausbildung 1. Halbjahr: Forschungspraktikum im Labor von Prof. Dr. R.
Croteau an der Washington State University, Pullman, WA, USA

2. Halbjahr: Apothekenpraktikum in der Adler Apotheke, Bremen
unter Aufsicht von Herrn Gossiau

Dritter Abschnitt der 17.07.1996
Pharmazeutischen
Prüfung

Approbation 31.07.1996

Arbeitsverhältnisse 08. – 09.1996
Vertretung in der Insel- und Bad- Apotheke, Wangerooge

10.1996
Vertretung in der Hinrichsapotheke, Hannover

11.1996 – 02.1997
Vertretung in der Adler Apotheke, Barsinghausen

Lebenslauf

03.1997

Vertretung in der Propstei Apotheke, Vechta

04.1997

Vertretung in der Scarabeus Apotheke, Hildesheim

05. – 07.1997

Vertretung in der Apotheke im Kaufland, Freising

07.1997

Vertretung in der Mühlenapotheke, Uetze

08.1997

Vertretung in der Sonnenapotheke, Hessisch Oldendorf

09.1997

Vertretung in der Apotheke im Kaufland, Freising

10.1997 – 07.2000

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München

seit 08.2000

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ludwigs-Maximilians-Universität, Würzburg

Stipendien

Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds zur
Forschungsausbildung im Labor von Prof. Dr. R. Croteau

Gerbrunn, den 04.11.2001

Ruth Imbusch