

Cyclopentenon-Phytprostane
als Induktoren von pflanzlichen Abwehrreaktionen

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

vorgelegt von
Ingeborg Thoma
aus
München

Würzburg, 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Hedrich
1. Gutachter:	Prof. Dr. M. J. Müller
2. Gutachter:	Prof. Dr. M. Riederer

Tag des Promotionskolloquiums:

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
I.1	Oxylipine in Tieren.....	1
I.1.1	Prostaglandine	1
I.1.2	Isoprostane	3
I.2	Octadecanoide in Pflanzen	7
I.2.1	Jasmonate	7
I.2.2	Phytprostane	9
I.3	Lipidperoxidation durch ROS und NO[•].....	14
I.3.1	Chemische Eigenschaften von ROS.....	14
I.3.2	Chemische Eigenschaften von NO [•] in biologischer Umgebung.....	16
I.4	ROS und NO[•] in der pflanzlichen Abwehr	16
I.4.1	Hypersensitive Reaktion	17
I.4.2	Genaktivierung und Transskriptionsabhängige Abwehr.....	18
I.4.3	Schluss von Stomata.....	18
I.4.4	Signaltransduktion.....	19
I.5	Lipidperoxidation als Signal?	20
I.6	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	21
II.	MATERIAL.....	23
II.1	Pflanzliches Material.....	23
II.1.1	Zellkulturen	23
II.1.2	Ganze Pflanzenorgane.....	23
II.2	Chemikalien	24
II.3	Verbrauchsmaterial	24
II.4	Geräte	25
III.	METHODEN	28
III.1	Herstellung von Phytprostanen.....	28
III.1.1	Herstellung von PPE ₁ : Autoxidation von α -Linolensäure	28
III.1.2	Herstellung von PPA ₁ : Säurekatalysierte Dehydratisierung von PPE ₁	28
III.1.3	Herstellung von PPB ₁ : Basenkatalysierte Dehydratisierung von PPE ₁	29
III.2	Versuche mit pflanzlichen Zellkulturen und Pflanzen	30
III.2.1	Zeitabhängige Sekundärstoffakkumulation in Zellsuspensionskulturen in Erlenmeyerkolben	30

III.2.2	Biologische Testsysteme in Multischalen.....	31
III.2.3	Infektion von <i>Lycopersicon esculentum</i> mit <i>Botrytis cinerea</i>	33
III.3	Extraktion und Aufreinigung von Fettsäurederivaten aus pflanzlichem Material	34
III.3.1	Extraktion und Aufreinigung von Jasmonsäure.....	34
III.3.2	Extraktion und Aufreinigung von PPE ₁	34
III.3.3	Derivatisierung von Fettsäure-Derivaten.....	35
III.4	Chromatographische Methoden	37
III.4.1	Festphasenextraktion.....	37
III.4.2	Dünnschichtchromatographie.....	37
III.4.3	Analytische und präparative HPLC.....	38
III.4.4	Präparative Auftrennung an einer Lobar- Säule.....	38
III.4.5	Gaschromatographie.....	39
III.5	Spektroskopische Methoden.....	41
III.5.1	Circulardichroismus	41
III.5.2	Massenspektrometrie.....	41
IV.	ERGEBNISSE	42
IV.1	Herstellung und Isolierung von PPB₁ und PPA₁.....	43
IV.1.1	Herstellung und Isolierung von PPB ₁ -Regioisomeren.....	44
IV.1.2	Auftrennung der PPB ₁ -Regioisomere in Enantiomere.....	46
IV.1.3	Herstellung und Isolierung der PPA ₁ -Regioisomere.....	49
IV.2	Isolierung und Quantifizierung von Phytoprostanen <i>in planta</i>	55
IV.2.1	Zeitabhängigkeit der Phytoprostanbildung in getrocknetem Pflanzenmaterial ...	55
IV.2.2	Methode zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an PPA ₁ /PPB ₁ <i>in planta</i>	56
IV.2.3	Gemeinsame Bestimmung von PPA ₁ /PPB ₁ in Frischpflanzen und Zellkulturen.	59
IV.2.4	Methode zum separaten Nachweis von PPA ₁ und PPB ₁	60
IV.2.5	Selektiver Nachweis von PPA ₁ und PPB ₁	63
IV.2.6	Abbau von PPB ₁ in Zellkultur von <i>Eschscholtzia californica</i>	64
IV.3	Einfluss biotischer Faktoren auf die Phytoprostan-Biosynthese.....	66
IV.3.1	Untersuchung zum Vorkommen von PPA ₁ /PPB ₁ in der <i>lsd1</i> Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
IV.3.2	Einfluss von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen auf die Phytoprostan-Synthese ..	69
IV.4	Biologische Aktivität	71
IV.4.1	Untersuchungen zur Phytoalexin-Induktion.....	71
IV.4.2	PPA ₁ und PPB ₁ induzieren nicht die Jasmonsäure-Biosynthese.....	95
IV.4.3	PPA ₁ und PPB ₁ induzieren den Schluss von Stomata in <i>Vicia faba</i>	96

IV.5	Bestimmung von Phytoprostanen in Blütenpollen.....	99
V.	DISKUSSION	101
V.1	Biosynthese und Metabolismus von Phytoprostanen A₁ und B₁.....	101
V.2	Biologische Aktivität von Phytoprostanen.....	106
V.3	Ausblick.....	116
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	118
VI.	SUMMARY.....	121
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	124

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
13-HPOTE	13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
AcCN	Acetonitril
BHT	Butylhydroxytoloul
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)triflouracetamid
BY2	“bright yellow 2”
CD	Circulardichroismus
CHS	Chalkon Synthase
<i>Chs</i>	Gen für CHS
CI	chemische Ionisation
d	Deoxy-
DC	Dünnschichtchromatographie
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
EI	Elektronenstoßionisation
EOT	12,13(S)-Epoxy-9(Z), 11(E),15(Z)-octadecatriensäure
GC-MS	Gaschromatographie
griech.	altgriechisch
<i>Gst</i>	Gen für GST
GST	Gutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl konz	Salzsäure 37% (v/v)
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (high performance lipid chromatography)
iP	Isoprostan
K	Kinase
LB-Medium	Medium nach Luria und Bertani
LM	Laufmittel
LOX	Lipoxygenase
<i>lssl</i>	„lesion stimulating disease 1“-Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> WS
LS-Medium	Medium nach Linsmaier und Skoog
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MeOH	Methanol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
NH ₂	Aminopropyl
NICI	negative chemische Ionisation (negative ion chemical ionisation)

Abkürzungsverzeichnis

NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NO [•]	Stickstoffmonoxid
O ₂ ^{•-}	Superoxidationradikal
•O ₂ H	Hydroperoxyradikal
•OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
<i>opr3</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Defekt der OPDA-Reduktase
<i>Pal</i>	Gen für PAL
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
<i>Pin</i>	Gen für PIN
PIN	Proteinase-Inhibitor-Proteinen
PFB	Pentafluorbenzyl-
PFB-Br	α-Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol / Pentafluorbenzylbromid
PG	Prostaglandin
PP	Phytosterane
POTE	Peroxytriensäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SiOH	Silica-
SIPK	Salicylsäure-induzierte Protein-Kinase
SOD	Superoxid-Dismutase
SPE	Festphasenextraktion
t	Zeit(punkt)
t _{1/2}	Halbwertszeit
<i>t</i> -BuOOH	<i>tertiäres</i> Butylhydroperoxid
TG	Trockengewicht
TMS	Trimethylsilyl
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TPP	Triphenylphosphin
t _R	Retentionszeit
v/v	Volumen pro Volumen
WS	Wassilevskaija

I. Einleitung

Die Bildung von oxygenierten Fettsäuren, welche unter dem Begriff Oxylipine zusammengefasst sind, ist eine der ersten Antworten von pflanzlichen Zellen auf verschiedene Formen von Stress (Feussner and Wasternack, 2002). Dabei werden Oxylipine meist enzymatisch synthetisiert, es sind aber auch nicht-enzymatische Reaktionen mit Sauerstoffradikalen möglich. Oxylipine in Tieren und Pflanzen weisen auffallende Ähnlichkeit in Struktur, Biosynthese und Funktion auf (Blee, 2002).

I.1 Oxylipine in Tieren

In Tieren werden Oxylipine hauptsächlich aus Arachidonsäure (20:4) gebildet, einer der häufigsten Fettsäuren in tierischen Membranlipiden. Unter diesen oxidierten Fettsäure-Derivaten finden sich die Eicosanoide (griech. εἰκοσιν = zwanzig), welche unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung in der Entzündungs- und Schmerzentstehung spielen, beispielsweise als Antwort auf Infektionen, Allergien und schädigende Umweltfaktoren (Blee, 2002).

I.1.1 Prostaglandine

Zu den Eicosanoiden zählt die Klasse der Prostaglandine, welche unter dem Einfluss der Prostaglandin-H-Synthase entstehen (Smith and Marnett, 1991). Durch Oxidation und Zyklisierung entsteht dabei aus Arachidonsäure Prostaglandin H₂, das enzymatisch zu den weiteren biologisch aktiven Prostaglandinen E, D und F umgesetzt wird. Das Grundgerüst der Prostaglandine weist einen Cyclopentanring mit zwei Seitenketten auf, die aufgrund der enzymatischen Synthese in ihrer sterischen Ausrichtung festgelegt sind und zueinander in *trans*-Stellung stehen. Die verschiedenen Prostaglandin-Klassen unterscheiden sich durch die Art der Sauerstoffsubstitution des Ringsystems mit Hydroxyl- bzw. Ketogruppen (siehe Abbildung I.1), was in der Nomenklatur durch einen Buchstaben beschrieben wird, der der Abkürzung PG nachgestellt ist. Ein numerischer Index gibt die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten an. So besitzt beispielsweise PGE₂ einen Cyclopentanring, welcher mit einer Hydroxylgruppe und einer Ketogruppe substituiert ist, und weist zwei Doppelbindungen in den Seitenketten auf. Im Falle von PGF₂ findet sich noch der zusätzliche Index α bzw. β , der die Stellung der Hydroxylgruppe an C9 wiedergibt: eine α -Hydroxylgruppe befindet sich immer unter, eine β -Hydroxylgruppe immer über der Ringebene.

PGE₂ und PGD₂ können spontan dehydratisieren, was zur Bildung von PGA₂, PGB₂ und PGJ₂-Derivaten führt. Diese Cyclopentenon-Prostaglandine konnten *in vivo* noch nicht eindeutig identifiziert werden, jedoch gibt es für die Existenz von PGA₂ und PGJ₂-Derivaten bereits starke Evidenzen (Straus and Glass, 2001).

I. Einleitung

Die biologischen Aktivitäten der Cyclopentan-Prostaglandine (z.B. PGE₂, PGD₂ und PGF₂) werden über G-Protein-gekoppelte Prostanoid-Rezeptoren vermittelt. Im Gegensatz dazu binden alle Cyclopentenon-Prostaglandine an cytosolische Proteine, wobei das Strukturelement der α,β -ungesättigten Ketogruppe essentiell ist (Straus and Glass, 2001). Beispielsweise hemmen PGA₂ und PGJ₂ die Zellproliferation und induzieren die Zelldifferenzierung, was möglicherweise mit ihrer Fähigkeit zusammenhängt, Wachstums- und Abwehrgene zu regulieren (Fukushima, 1990, 1992; Bui and Straus, 1998). In höheren Konzentrationen sind diese Cyclopentenon-Prostaglandine cytotoxisch und induzieren Apoptose (Fukushima, 1990, 1992; Kim et al., 1993). Im Falle von 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15dPGJ₂) und PGA₁ kommt die Apoptose-induzierende Wirkung durch Hemmung der Aktivität des Transskriptionsfaktors NF- κ B zustande, wofür die Cyclopentenon-Einheit verantwortlich gemacht wird (Rossi et al., 2000; Castrillo et al., 2003).

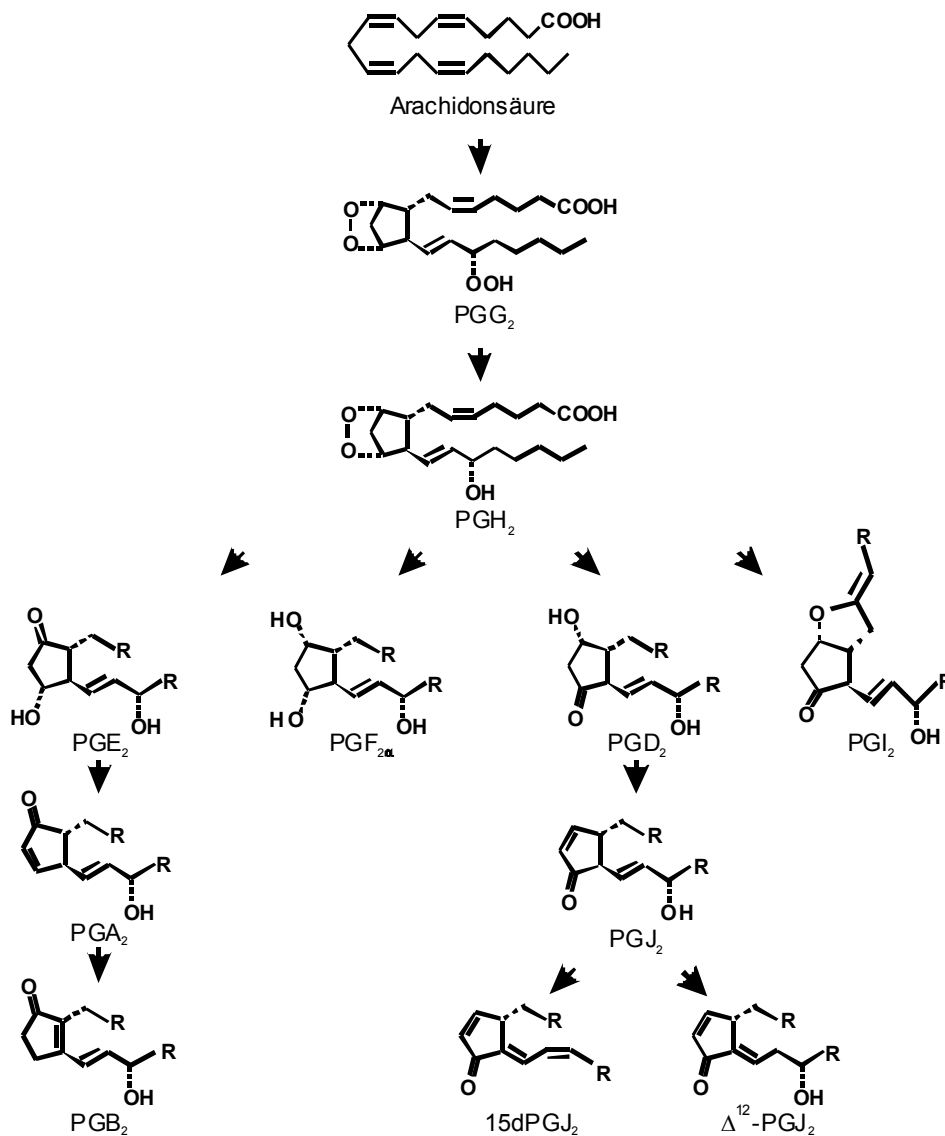


Abbildung I.1: Ringstrukturen verschiedener Prostaglandin-Klassen. Prostaglandine G₂, H₂, E₂, F_{2 α} , D₂ und I₂ (Prostacyclin) sind enzymatisch gebildete Prostaglandine des tierischen Organismus. PGA₂, B₂ und J₂-Derivate sind nicht-enzymatische gebildete Abbauprodukte.

I.1.2 Isoprostane

Neben der enzymatischen Synthese von Prostaglandinen kommt es durch eine radikal-katalysierte Peroxidation von Arachidonsäure zur Bildung von PGG-ähnlichen Strukturen. Diese PGG-ähnlichen Strukturen können nicht-enzymatisch zu D-, E- oder F-Ringverbindungen abgebaut werden (Morrow et al., 1990; Morrow et al., 1994). Da diese Verbindungen racemische Isomere von Prostaglandinen darstellen, wurden sie Isoprostane (iP) genannt (Rokach et al., 1997a; Taber et al., 1997).

Isoprostane akkumulieren in Folge von oxidativem Stress (Roberts and Morrow, 2002). Ihre Konzentration wird durch Rauchen, sowie bei einer Reihe von Krankheiten, die mit einer verstärkten Bildung freier Radikale einhergehen, erhöht, so beispielsweise bei Hypercholesterolemie, koronarer Herzkrankung, Asthma, Diabetes und Morbus Alzheimer (Janssen, 2001; Pratico et al., 2001). Darüber hinaus besitzen einige Isoprostane eine nachgewiesene biologische Aktivität, so sind iPE_2 Typ III und $\text{iPF}_{2\alpha}$ Typ III beispielsweise potente renale Vasokonstriktoren, lösen Bronchokonstriktion aus und modulieren die Plättchenaggregation (Janssen, 2001; Pratico et al., 2001; Roberts and Morrow, 2002). Daher werden Phytoprostane als Mediatoren von oxidativem Stress diskutiert.

I.1.2.1 Struktur und Synthese von Isoprostanen

Isoprostane sind strukturell nah verwandt mit den Prostaglandinen, so weisen beide Verbindungsklassen analoge Cyclopentan-Ringsysteme auf. Es gibt jedoch Unterschiede in der Länge der Seitenketten und in der Stereochemie, beispielsweise sind die Seitenketten der Isoprostane vornehmlich *cis*-konfiguriert, wohingegen die Prostaglandine Seitenketten in *trans*-Stellung aufweisen. Diese Unterschiede lassen sich durch unterschiedliche Synthesemechanismen von Prostaglandinen und Isoprostanen erklären (Rokach et al., 1997b). Es existieren zwei Vorschläge zum Reaktionsmechanismus der Isoprostan-Synthese, wobei die beiden Wege nach darin vorkommenden Zwischenprodukten benannt wurden, einem Endoperoxid und einem Dioxetan (Rokach et al., 1997b).

Abbildung I.2 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 Zyklisierung 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 iPG_2 bezeichnet werden.

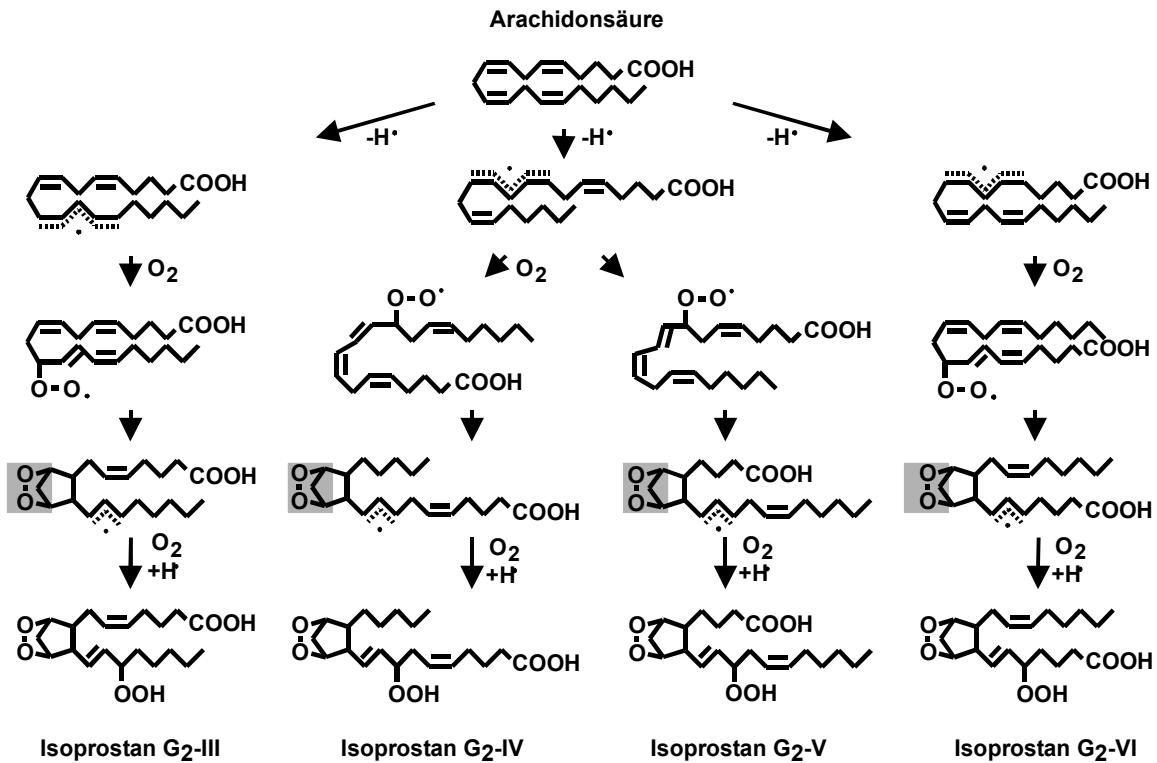


Abbildung 1.2: Endoperoxidmechanismus: postulierte Synthese von Isoprostanen aus Arachidonsäure. Als Intermediat tritt ein Endoperoxid auf (grau unterlegt). Theoretisch können vier regioisomere Verbindungen gebildet werden (Typ III-VI).

Strukturelle Voraussetzung für die Synthese eines Cyclopentan-Ringes 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 dieser Einheit sind beliebig, daher können aus Arachidonsäure, die zwei 1,4,7-Oktatrieneinheiten besitzt, insgesamt vier verschiedene Regioisomere entstehen. Diese werden mit den römischen Ziffern III bis VI bezeichnet (Rokach et al., 1997a).

Corey und Wang stellten einen alternativen Mechanismus vor, über den Isoprostane entstehen können (1994) (Abbildung I.3). Die Synthese nach dem Dioxetan-Mechanismus 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-Endoperoxylradikal, das nach Aufnahme eines Wasserstoffradikals die PGG-Ringstruktur aufweist.

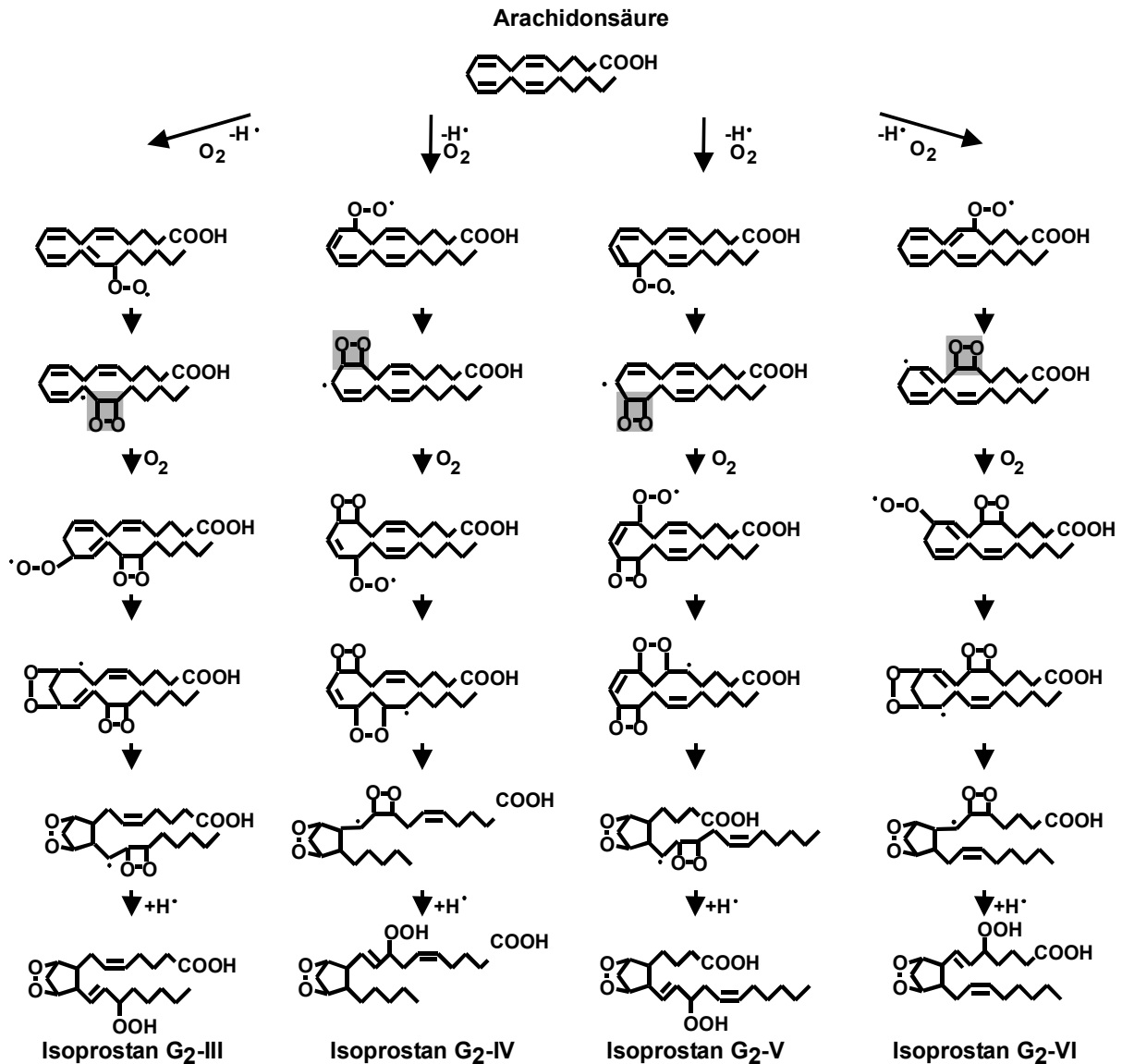


Abbildung 1.3: Dioxetan-Mechanismus: ein weiterer Syntheseweg zur Darstellung von Isoprostanen durch radikal-katalysierte Oxidation. Als Intermediat tritt ein Dioxetan auf (grau unterlegt).

Dieser Syntheseweg führt zu denselben Regioisomeren wie der Endoperoxid-Mechanismus (Abbildung 1.3). Im Gegensatz zum Endoperoxid-Mechanismus können durch den Dioxetan-Mechanismus jedoch auch Isoprostane gebildet werden, deren Seitenketten zueinander in *trans*-Stellung stehen. Während des Ringschlusses behindert das sterisch anspruchsvolle Dioxetan den disrotatorischen Ringschluss, so dass auch der symmetrieverbotene conrotatorische Angriff stattfindet. Das Verhältnis der *trans*-konfigurierten Produkte zu den *cis*-konfigurierten Produkten beträgt beim Dioxetan-Mechanismus 1:3, wohingegen beim Endoperoxidmechanismus nur ca. 3% der *trans*-Verbindungen entstehen (O'Connor et al., 1984).

Theoretisch können alle 4 Regioisomere durch beide Mechanismen gebildet werden. Der jeweilige Beitrag der beiden Wege an der Entstehung von Isoprostanen *in vivo* ist jedoch noch unklar (Rokach et al., 1997b).

Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Isoprostan-Synthese nach dem Dioxetan-Mechanismus unwahrscheinlich ist (Yin et al., 2003). Bisher wurde angenommen, dass die Bildung von Isoprostanen des Typ III aus 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15-HPETE) ausschließlich über den Dioxetan-Mechanismus verläuft. Yin et al. stellten nun einen Mechanismus vor, nach dem die 15-Hydroperoxygruppe eines Cholesterol-Esters von 15-HPETE durch β -Fragmentierung entfernt werden kann. Dieser Reaktion folgt eine Addition von Sauerstoff an C11, wodurch racemische 11-HPETE entsteht. Diese kann in den Endoperoxidmechanismus eingeschleust werden, wodurch Isoprostane vom Typ III gebildet werden. Dabei entstehen aus optisch reinen 15-HPETE racemische Isoprostane, wohingegen über den Dioxetan-Mechanismus optisch reine Isoprostane gebildet werden würden. Darüberhinaus konnten Yin et al. die Zwischenstufen der β -Fragmentierung mittels LC-MS nachweisen.

In den vorgestellten Mechanismen hat die Substitution der 1,4,7-Oktatrieneinheit keinen Einfluss auf die Reaktion, so dass die Synthese von Isoprostanoïden auch mit anderen mindestens dreifach ungesättigten Fettsäuren als Ausgangssubstanz ablaufen kann. So können beispielsweise im Gehirn aus Docosahexatriensäure ebenfalls Isoprostanoïde, so genannte Neuroprostane, gebildet werden.

I.1.2.1.1 Synthese anderer Isoprostan-Klassen aus Isoprostan G₂

Die ersten Isoprostane, die bei der radikal-katalysierten Oxygenierung und Zyklisierung von Arachidonsäure entstehen können, sind iPG₂. Das Endoperoxid ist in wässriger Lösung instabil (Stehle, 1982), daher lagert sich iPG₂ spontan zu iPE₂ und iPD₂ um (Morrow et al., 1994). Darüberhinaus entstehen durch direkte Reduktion der Peroxide iPF₂ (Morrow et al., 1992a). IPE₂/iPD₂ und iPF₂ konnten *in vivo* nachgewiesen werden.

IPE₂ und iPD₂ sind in wässriger oder proteinhaltiger Lösung instabil und dehydrieren nicht-enzymatisch zu iPA₂ und iPJ₂ (Chen et al., 1999). Diese Verbindungen entstehen ebenfalls *in vivo*.

Anders als Prostaglandine können Isoprostane sowohl aus freier, als auch aus veresterter Arachidonsäure in Membranen gebildet werden. Die veresterten Isoprostane wiederum können durch Phospholipasen freigesetzt werden (Morrow et al., 1992a).

I.2 Octadecanoide in Pflanzen

Höhere Pflanzen können keine Arachidonsäure synthetisieren und sind somit nicht zur Bildung von Prostaglandinen oder Isoprostanen fähig. Stattdessen benutzen sie α -Linolensäure (18:3) – neben Linolsäure (18:2) mit 40% Anteil am Fettsäuregehalt die häufigste ungesättigte Fettsäure in pflanzlichen Membranen (Conconi et al., 1996) – zur Synthese von prostaglandin-ähnlichen Verbindungen wie Jasmonaten oder Isoprostanoiden (Mueller, 1998).

I.2.1 Jasmonate

Jasmonate werden enzymatisch aus α -Linolensäure gebildet (Mueller, 1997) (Abbildung I.4), wobei die Ähnlichkeit von Struktur und Biosynthese von Jasmonaten zu Prostaglandinen immer wieder hervorgehoben wurde (Mueller, 1997; Liechti and Farmer, 2002).

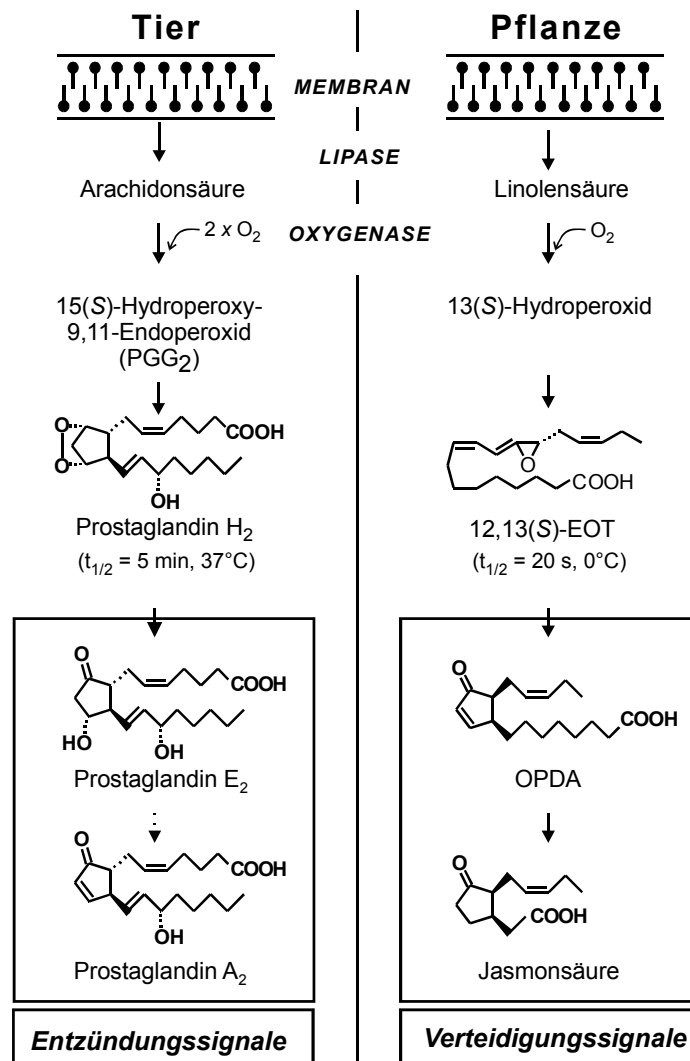


Abbildung I.4: Biosynthese der Jasmonate (EOT = Epoxytriensäure, OPDA = 12-Oxo-Phytodiensäure).

Jasmonsäure und ihre Vorläuferverbindung 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) sind physiologische Signalstoffe bei Fruchtreifung, Rankenspiralisierung, Knollenbildung, Stoffspeicherung und Fortpflanzung. Darüberhinaus sind Jasmonate als Botenstoffe in die pflanzliche Abwehr gegen Pathogene und Fraßfeinde involviert (Mueller, 1997).

Sowohl OPDA als auch Jasmonsäure sind potente Aktivatoren von Abwehrgenen (Stintzi et al., 2001), wobei vermutlich reaktive Sauerstoffspezies als „second messenger“ an der Induktion der Genexpression beteiligt sind (Orozco-Cardenas et al., 2001). Die verstärkte Genexpression führt unter anderem zu einer *de novo*-Synthese von Proteinase-Inhibitor-Proteinen (PIN) (Farmer and Ryan, 1990) und Phytoalexinen (Gundlach et al., 1992). Letztere sind induzierbare, niedermolekulare sekundäre Pflanzenstoffe, die antimikrobiell wirken und somit Teil des pflanzlichen Abwehrsystems sind.

OPDA und Jasmonsäure erfüllen überwiegend die gleichen Funktionen, jedoch gibt es auch Reaktionen, an denen nur einer der beiden Signalstoffe beteiligt ist. Beispielsweise führt der Mangel an Jasmonsäure in der Arabidopsis-Mutante *opr3*, welche OPDA, aber nicht Jasmonsäure bildet (Schaller et al., 2000), zu Sterilität der männlichen Pflanzen (Stintzi et al., 2001). Auf der anderen Seite ist OPDA und nicht Jasmonsäure der entscheidende Signalstoff für die Rankenspiralisierung von *Bryonia dioica* (Weiler et al., 1993). Außerdem ist OPDA in Abwesenheit von Jasmonsäure ausreichend für die Abwehrreaktion von *A. thaliana* gegen den Fraßfeind *Bradysia impatiens* (Stintzi et al., 2001). Darüber hinaus lassen sich durch Gabe von exogener OPDA oder durch Verwundung einige Abwehrgene aktivieren, die nicht durch Jasmonsäure beeinflusst werden (Stintzi et al., 2001). Diese Unterschiede im Wirkspektrum der beiden Jasmonate werden in Analogie zu den Cyclopentenon-Prostaglandinen im Tier auf das Strukturelement des α,β -ungesättigten Ketons von OPDA zurückgeführt (Weber, 2002).

I.2.2 Phytoprostane

Analog zu der Entdeckung von Isoprostanen in tierischen Organismen konnte 1998 gezeigt werden, dass in Pflanzen ebenfalls Prostaglandin-ähnliche Verbindungen durch nicht-enzymatische Oxidation von Fettsäuren gebildet werden (Parchmann and Mueller, 1998) (Abbildung I.5). Als Ausgangsmaterial für die Synthese dient dabei α -Linolensäure (18:3), eine der häufigsten ungesättigten Fettsäuren in pflanzlichen Membranen. Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit waren bereits zwei Klassen dieser Isoprostanoide, die E- und F-Ringverbindungen, *in planta* nachgewiesen worden (Parchmann and Mueller, 1998; Imbusch and Mueller, 2000b).

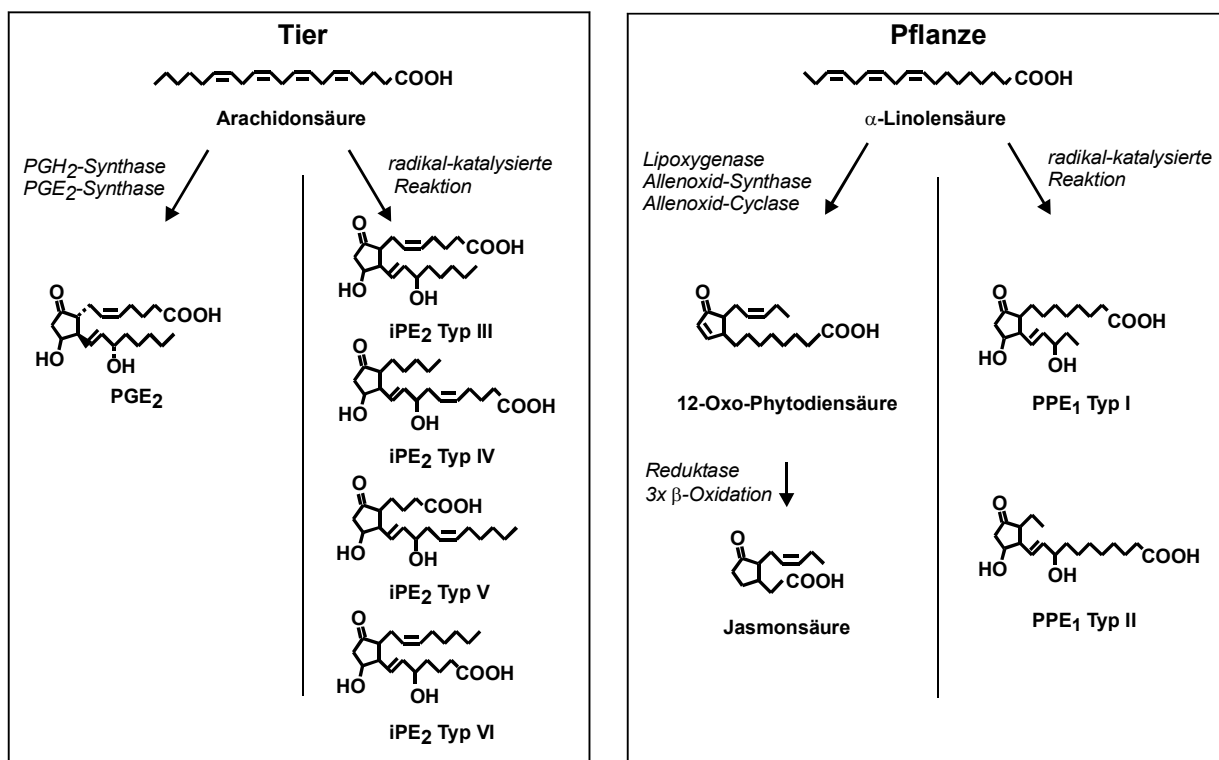


Abbildung I.5: Biosynthese-Wege von prostanoiden Verbindungen in Tier und Pflanze.

I.2.2.1 Nomenklatur

Die aus α -Linolensäure entstandenen Isoprostanoide sind um zwei C-Atome kürzer als die vorher beschriebenen C_{20} -Isoprostane, daher sind die pflanzlichen Isoprostanoide als Dinor-Isoprostane zu bezeichnen. Dinor-Isoprostane können jedoch nicht nur aus α -Linolensäure in Pflanzen, sondern auch in tierischen Zellen durch Autoxidation von γ -Linolensäure oder aus Isoprostanen durch β -Oxidation entstehen. Die Existenz dieser verschiedenen Dinor-Isoprostan-Strukturen führt bei der Anwendung der Isoprostan-Nomenklaturen nach Taber et al. (1997) oder Rokach et al. (1997a) zu komplizierten Namensgebungen. Daher wurden die Abkömmlinge aus dem Octadecanoid-Weg aufgrund ihres auf Pflanzen beschränkten Vorkommens Phytoprostane genannt (Thoma et al., 2003a).

Aus α -Linolensäure können zwei Regioisomere der Phytoprostane gebildet werden, welche nach der Nomenklatur von Rokach et al. (1997a) als Typ I und Typ II bezeichnet werden.

I.2.2.2 Hypothetische Synthesemechanismen der Phytoprostane

In Kapitel I.1.2.1 wurden hypothetische Mechanismen für die Bildung von Isoprostanen durch radikal-katalysierte Oxidation von Arachidonsäure vorgestellt. Da eine Fettsäure lediglich eine 1,4,7-Oktatrieneinheit aufweisen muss, um sich als Ausgangsmaterial für die Isoprostane-Synthese zu eignen, können aus α -Linolensäure ebenfalls Isoprostanoide gebildet werden (Rokach et al., 1997b; Mueller, 1998).

Die mögliche Synthese von Phytoprostanen G_1 (PPG_1) aus α -Linolensäure über den Endoperoxid- bzw. den Dioxetan-Mechanismus (siehe I.1.2.1) ist in Abbildung I.6 dargestellt. Der Dioxetan-Mechanismus wurde während der Erstellung der vorliegenden Arbeit widerlegt. Aus 9-POTE könnte jedoch PPG_1 Typ II auch durch β -Fragmentierung entstehen. Da α -Linolensäure nur eine 1,4,7-Oktatrieneinheit aufweist, können aus ihr im Gegensatz zu Arachidonsäure lediglich zwei regioisomere Strukturen, Typ I und II, entstehen.

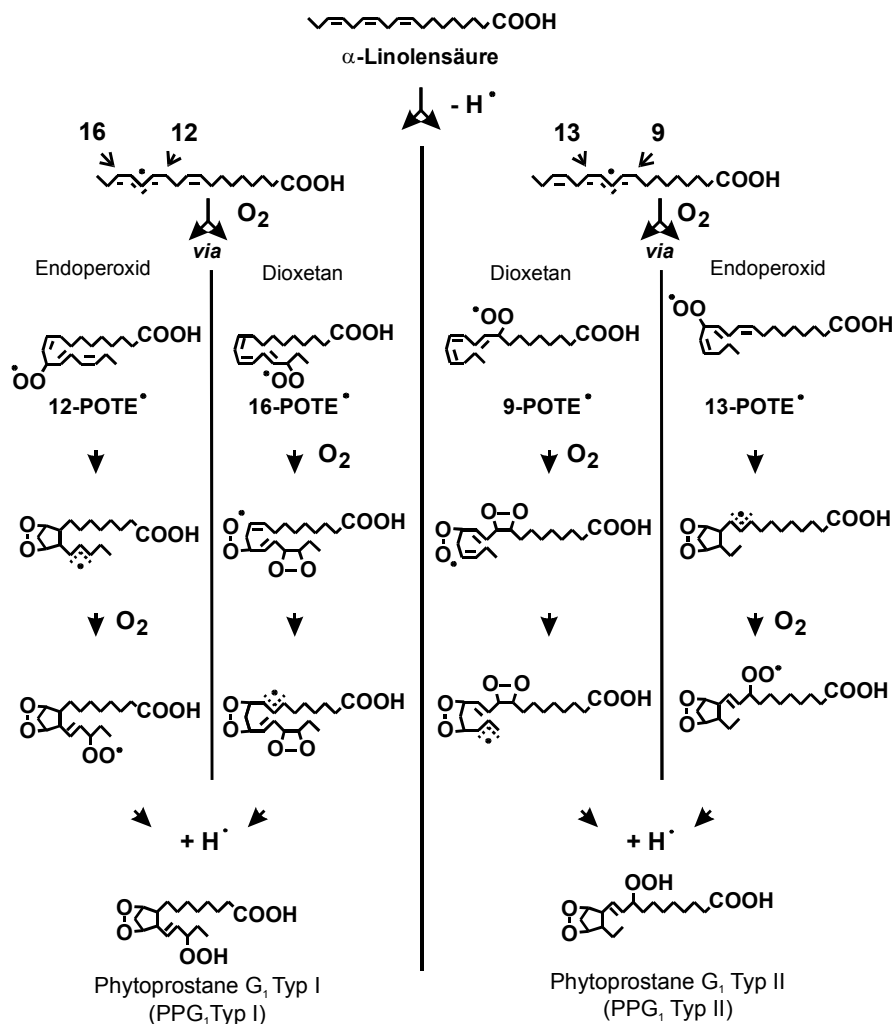


Abbildung I.6: Postulierte Synthese der Phytoprostane G_1 (PPG_1) nach dem Endoperoxid- und Dioxetan-Mechanismus (POTE = Peroxytriensäure).

Ausgehend von den Phytoprostanen G₁ (PPG₁) können alle weiteren Phytoprostan-Ringstrukturen auf nicht-enzymatischem Wege gebildet werden (Abbildung I.7) (Mueller, 1998).

- Die Reduktion der Hydroperoxidgruppe der Seitenkette führt zu den Phytoprostanen H₁ (PPH₁).
- PPH₁ können zu Phytoprostanen F₁ (PPF₁) reduziert werden.
- Durch Umlagerung und Reduktion der PPH₁ entstehen Phytoprostane E₁ (PPE₁) und D₁ (PPD₁).
- Aus PPE₁ werden durch Dehydratisierung Phytoprostane A₁ (PPA₁) gebildet und durch anschließende Isomerisierung Phytoprostane B₁ (PPB₁).
- PPD₁ können zu Phytoprostanen J₁ (PPJ₁) und Deoxy-PPJ₁ (dPPJ₁) dehydratisieren.

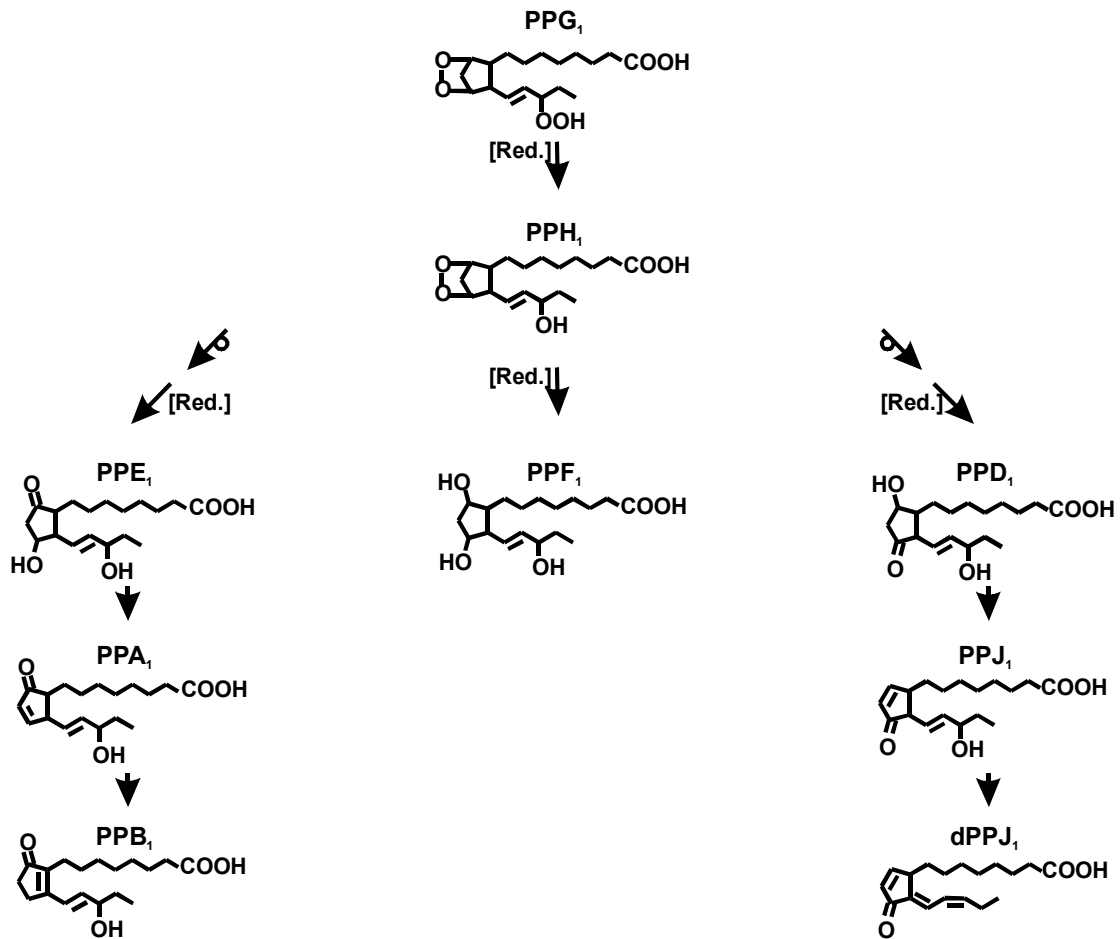


Abbildung I.7: Umwandlung der PPG₁ Typ I in andere Phytoprostan-Klassen.

I.2.2.3 Nachweis von Phytoprostanen *in vitro* und *in planta*

Die Identifizierung von Phytoprostanen in autoxidierter Linolensäure, sowie in Zellkulturen und Frischpflanzen gelang in unserem Labor erstmals 1998 (Parchmann and Mueller, 1998). Die Analyse von E-Ring-Verbindungen war aufgrund der großen Anzahl von 32 isomeren Strukturen sehr kompliziert, weswegen der Nachweis von PPE₁ über deren Isomerisierungsprodukte PPB₁ geführt wurde. Durch alkalische Dehydratisierung reduziert sich die Anzahl der Chiralitätszentren von vier auf eins (Abbildung I.8), wodurch an Stelle von 16 PPE₁-Isomeren nur noch vier Isomere von PPB₁ vorlagen. Diese konnten nun vergleichsweise leicht aufgetrennt und analysiert werden. Die Struktur der PPB₁ wurde anschließend über hochauflösende Massenspektrometrie und NMR bestätigt (Parchmann and Mueller, 1998; Thoma et al., 2003b).

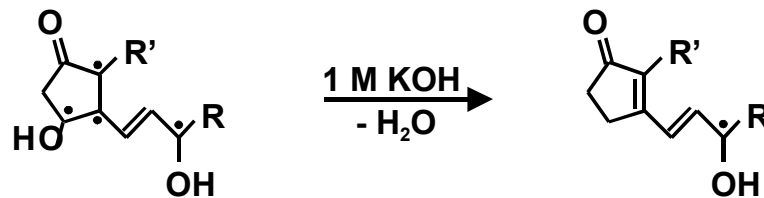


Abbildung I.8: Umsetzung der PPE₁ zu PPB₁ durch alkalische Dehydratisierung. Die Anzahl der Chiralitätszentren (•) reduziert sich dabei von vier auf eins.

Mit Hilfe dieser Methode konnten PPE₁ erstmals eindeutig in pflanzlichen Zellkulturen von vier verschiedenen Pflanzenspezies (1,9 - 34,7 ng/g TG) und in fünf Teedrogen von verschiedenen Pflanzenorganen (Blätter, Blüten, Samen, 122 - 2055 ng/g TG) nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Konzentration von PPB₁ entsprach in Teedrogen-Material annähernd dem von PPE₁, während ihr Gehalt in pflanzlichen Zellkulturen unter der Nachweisgrenze lag (Parchmann and Mueller, 1998).

Auch PPF₁ konnten *in vitro* und *in planta* identifiziert werden (Imbusch and Mueller, 2000b), wobei zusätzlich zu den frei vorliegenden PPF₁ auch veresterte Phytoprostane nachgewiesen wurden. Da die Vorstufe der Phytoprostane, α -Linolensäure, hauptsächlich in Membranlipide verestert vorliegt, würde man Phytoprostane ebenfalls verestert in Membranen erwarten. Die Konzentration freier PPF₁ belief sich in pflanzlichen Zellkulturen auf 23 - 316 ng/g TG und in intakten Pflanzen auf 43 - 1380 ng/g TG, während für veresterte PPF₁ ca. 10-fach höhere Gehalte gefunden wurden. Im Vergleich zu frischen Zellen konnte in verschiedenen getrockneten Pflanzenmaterialien eine um ca. den Faktor 10 erhöhte Konzentration an freien und veresterten PPF₁ gemessen werden. Insgesamt wurden 16 verschiedene Pflanzenarten aus 13 systematisch weit entfernten Pflanzenfamilien untersucht. Dabei wurden in jeder Pflanze PPF₁ nachgewiesen, so dass man davon ausgehen kann, dass PPF₁ ubiquitär vorkommen (Imbusch and Mueller, 2000b).

Kürzlich konnten PPD₁ und ihre Metabolite dPPJ₁ *in vitro* und *in planta* nachgewiesen werden (Krischke et al., 2003). DPPJ₁ Typ I sind besonders interessante Verbindungen, da sie Dehydro-Produkte des etablierten Signalstoffs OPDA darstellen (Abbildung I.9).

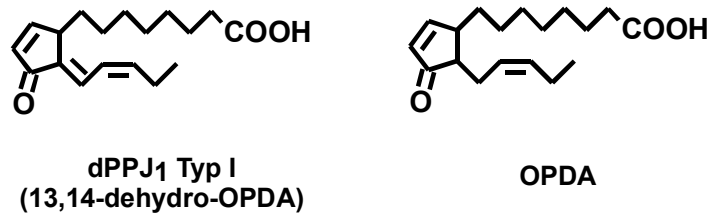


Abbildung I.9: Strukturen von dPPJ₁ und OPDA

Die Konzentrationen an PPD₁ und dPPJ₁ wurden für drei verschiedene Pflanzenspezies bestimmt. Die Gehalte lagen zwischen 348 und 3995 ng/g TG (PPD₁) bzw. zwischen 294 und 2413 ng/g TG (dPPJ₁) und waren somit deutlich höher als die ebenfalls ermittelte Konzentration von OPDA (67 – 549 ng/g TG).

I.2.2.4 Bedeutung von oxidativem Stress für die Biosynthese von Phytoprostanen

In Tieren induzieren freie Radikale die Bildung von Isoprostanen (I.1.2.1). So konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an iPF_{2α} durch Rauchen und im Verlauf von Krankheiten, die mit einer Akkumulation von Radikalen einhergehen, wie Alzheimer, Hypercholesterolemie, koronarer Herzerkrankung und Diabetes, ansteigt (Pratico et al., 2001). Ebenso wird die Akkumulation von iPF₂, iPE₂/D₂ und iPA₂/J₂ in Mäuselebern durch Gabe von Chloroform induziert (Morrow et al., 1990; Morrow et al., 1994; Chen et al., 1999). Dies wird auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeführt, die beim Metabolismus von Chloroform entstehen und zum Teil Lipidperoxidation auslösen können (siehe I.3).

Auch für einige Phytoprostane konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Synthese durch ROS induziert werden kann (Parchmann, 1999; Imbusch and Mueller, 2000a). So konnte durch Zugabe von 1 mM *t*-BuOOH die Konzentration an PPE₁ in Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) transient gesteigert werden (Parchmann, 1999). Dabei nahm insbesondere der Gehalt an PPE₁ Typ II (210 ng/g TG) zu, wohingegen die Konzentration von Typ I lediglich bei 60 ng/g TG lag. Im Vergleich dazu lag der Gehalt in nicht behandelten Zellen bei 17 (Typ II) bzw. 15 ng/g TG (Typ I).

Ebenso konnte die Bildung von PPF₁ durch Generation von oxidativem Stress in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) induziert werden (Imbusch and Mueller, 2000a). Die Zugabe von 10 mM *t*-BuOOH oder 0,5 mM Cu²⁺ führte zu 6 bis 10-fachen Steigerungen der Konzentrationen von freien und veresterten PPF₁. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass freie und veresterte PPF₁ in Blättern von *Mentha piperita* nach Verwundung mit einem Nagelkissen bis auf das Vierfache des Kontrollgehaltes akkumulieren (Imbusch and Mueller, 2000a).

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Phytoprostan-Konzentrationen durch oxidativen Stress, ausgelöst durch Chemikalien oder Verwundung, induziert werden können. Die Stimulation der Zellkulturen und Pflanzenteile war in allen Experimenten auf relativ drastische Weise erfolgt. Bislang war kein Versuch unter natürlichen Bedingungen durchgeführt worden.

Ein biologisches System, in dem es zur verstärkten Synthese von Phytoprostanen kommen könnte, sind Pflanzen-Pathogen-Interaktionen, da deren Verlauf durch dramatische Akkumulationen von ROS (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Lamb and Dixon, 1997; Bolwell, 1999) und reaktiven Stickstoffverbindungen, wie Stickstoffmonoxid (NO•) (Delledonne et al., 1998; Durner and Klessig, 1999) gekennzeichnet ist. ROS und NO• können Lipidperoxidation initiieren (Halliwell and Gutteridge, 1989; Murphy, 1999) und stellen somit potentielle Induktoren der Phytoprostan-Biosynthese dar.

Nach Pathogenbefall werden darüber hinaus noch weitere Signalstoffe, wie beispielsweise Salicylsäure gebildet, die durch Reaktion mit Katalasen Radikale bilden kann (Durner and Klessig, 1995). Diese Radikale können Lipidperoxidation initiieren (Anderson et al., 1998), und könnten somit theoretisch eine Phytoprostan-Synthese induzieren. Jedoch konnte in ersten Versuchen in Blättern von *A. thaliana* nach Behandlung mit Na-Salicylat kein Phytoprostan-Anstieg festgestellt werden (Loeffler, C.; mündliche Mitteilung).

I.3 Lipidperoxidation durch ROS und NO•

I.3.1 Chemische Eigenschaften von ROS

Im Laufe der Reduktion von Sauerstoff (O₂) zu Wasser (H₂O) werden Superoxidanionradikale (O₂^{•-}), dessen konjugierte Säure, das Hydroperoxyradikal (•O₂H), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), und Hydroxylradikale (•OH) gebildet (Abbildung I.10). Diese Verbindungen werden unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS, „reactive oxygen species“) zusammengefasst.

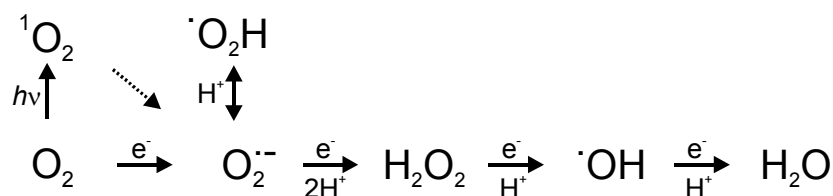


Abbildung I.10: Stufenweise Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (O₂ = molekularer Sauerstoff, ¹O₂ = Singulett-Sauerstoff, O₂^{•-} = Superoxidanionradikal, •O₂H = Hydroperoxyradikal, H₂O₂ = Wasserstoffperoxid, •OH = Hydroxylradikal).

Die Bildung des Superoxidanionradikals (O₂^{•-}) erfordert eine geringe Zufuhr an Energie, während die weitere Reduktion zu H₂O ohne weitere Energiezufuhr ablaufen kann. Das Superoxidanion ist ein kurzlebige Radikal, das biologische Membranen nicht durchdringen

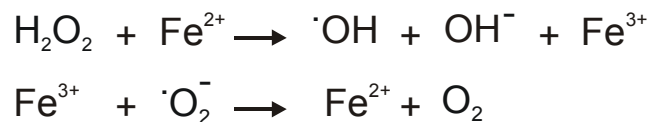
kann. Es liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure, dem Hydroperoxyradikal ($\cdot\text{O}_2\text{H}$) vor. $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ist hydrophober als $\cdot\text{O}_2^-$ und kann daher biologische Membranen überwinden. $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ist reaktiv genug, um Wasserstoffatome von ungesättigten Fettsäuren zu eliminieren und somit Lipidperoxidation zu initiieren (Halliwell and Gutteridge, 1989; Vranova et al., 2002).

$\cdot\text{O}_2^-$ und $\cdot\text{O}_2\text{H}$ disproportionieren in wässriger Lösung spontan oder unter Katalyse durch Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, wobei die enzymatisch katalysierte Reaktion bedeutend schneller abläuft, und somit hauptsächlich für die Entstehung von Wasserstoffperoxid verantwortlich ist.

Wasserstoffperoxid ist relativ stabil ($t_{1/2}$ *in vivo* = 1 ms), weniger reaktiv als $\cdot\text{O}_2^-$ und kann selbst keine Lipidperoxidation auslösen. H_2O_2 kann biologische Membranen durchdringen und somit vom Entstehungsort weg diffundieren. H_2O_2 disproportioniert entweder spontan oder unter Katalaseeinwirkung zu Wasser und Sauerstoff, oder wird von Peroxidasen (z.B. Ascorbat- oder Glutathionperoxidase) abgebaut. H_2O_2 kann aber auch mit $\cdot\text{O}_2^-$ reagieren, wobei in einer Haber-Weiß-Reaktion das hochreaktive Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) entsteht.



In Anwesenheit von Fe^{2+} oder Cu^+ als Katalysatoren läuft diese Reaktion deutlich schneller ab. Die oxidierten Metallionen werden durch Reduktion mit $\cdot\text{O}_2^-$ wieder regeneriert (Fenton-Reaktion):



$\cdot\text{OH}$ stellt ein sehr starkes Oxidationsmittel dar und kann radikalische Kettenreaktionen initiieren, was zu Lipidperoxidation, Enzyminaktivierung und Nukleinsäureabbau führen kann (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Reaktive Sauerstoffspezies werden in pflanzlichen Zellen ständig gebildet und entstehen während des normalen Zellstoffwechsels in fast allen Zellorganellen, z.B. in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen (Neill et al., 2002a; Vranova et al., 2002).

Nach Pathogenbefall steigt die Konzentration von ROS dramatisch an, was vermutlich auf die Aktivität eines homologen Enzyms der tierischen NADPH-Oxidase zurückzuführen ist (Hancock et al., 2001; Neill et al., 2002a). Daneben wird aber auch die Beteiligung von Xanthin-Oxidasen, Aminoxidasen, pH-abhängigen Zellwandperoxidasen und Oxalat-Oxidasen diskutiert (Wojtaszek, 1997).

Antioxidative Systeme hingegen reduzieren die Konzentration von ROS. Dabei werden ROS durch Reaktion mit Glutathion (GSH) oder durch Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie

Katalase und cytosolischer Ascorbat-Peroxidase (cAPX) abgebaut (Chen et al., 1993; Mittler et al., 1998). Eine Hemmung dieser Enzyme, z.B. durch Salicylsäure oder NO^\bullet führt zu erhöhten Konzentrationen an H_2O_2 und verstärkt somit den „oxidative burst“ (Durner and Klessig, 1995; Clark et al., 2000).

I.3.2 Chemische Eigenschaften von NO^\bullet in biologischer Umgebung

Im Gegensatz zu einigen ROS ist NO^\bullet nicht reaktiv genug, um selbst eine Lipidperoxidation auszulösen. Die biologischen Aktivitäten von NO^\bullet werden auf die Fähigkeit zurückgeführt, mit Sauerstoffderivaten und mit Thiol- bzw. Eisen-haltigen Enzymen zu interagieren (Wendehenne et al., 2001). Durch einige dieser Reaktionen wird die Konzentration des hochreaktiven $^\bullet\text{OH}$ in Pflanzen gesteigert und somit eine Lipidperoxidation initiiert.

Beispielsweise reagiert NO^\bullet mit $^\bullet\text{O}_2^-$ zu Peroxynitrit (ONOO^\bullet), einem Radikal mit kurzer Halbwertszeit ($t_{1/2} < 1\text{s}$), welches viel reaktiver als seine Ausgangsverbindungen ist. So kann es mit zellulären Bestandteilen interagieren und Lipide oxidieren (Koppenol et al., 1992; Beckman and Koppenol, 1996). Peroxynitrit liegt bei physiologischem pH im Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure vor, die in Abhängigkeit von ihrer Konformation entweder zu Nitrat oder zu $^\bullet\text{OH}$ abgebaut werden kann. Die Behandlung mit Peroxynitrit führt in tierischen LDL (low density lipoproteins), welche Vehikel für den Transport von Fetten im Blut darstellen, zur vermehrten Bildung von Isoprostanen (Moore et al., 1995).

NO^\bullet reagiert aber auch mit Enzymen, so wird durch Hemmung der Aconitase in *N. tabacum* Eisen aus Ferritin freigesetzt (Murgia et al., 2002) wobei das freigesetzte Eisen als Katalysator der Fenton-Reaktion dienen und dadurch die Bildung von freien Radikalen signifikant erhöhen kann (siehe I.3.1). Eine Hemmung der bereits erwähnten Katalase und Ascorbat-Peroxidase, zweier H_2O_2 -abbauender Enzyme, durch NO^\bullet führt ebenfalls zu erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen (Clark et al., 2000). Dadurch steht mehr Ausgangssubstanz für die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals $^\bullet\text{OH}$ zur Verfügung, was wiederum vermehrte Lipidperoxidation zur Folge haben kann (siehe I.3.1).

In Analogie zu der NO^\bullet -Bildung in Tieren wird NO^\bullet in Pflanzen vermutlich durch die Aktivität einer NO-Synthase hergestellt (Delledonne et al., 1998). Darüber hinaus wird ein weiteres Enzym, eine Nitrat-Reduktase für die NO^\bullet -Bildung verantwortlich gemacht (García-Mata and Lamattina, 2003).

I.4 ROS und NO^\bullet in der pflanzlichen Abwehr

Interessanterweise können ROS und NO^\bullet nicht nur direkt oder indirekt Lipidperoxidation induzieren, sie spielen auch eine zentrale Rolle bei der Auslösung verschiedener Abwehrreaktionen gegen Pathogene, wie beispielsweise der Hypersensitiven Reaktion und

verstärkter Expression von Abwehrgenen (Ryals et al., 1995; Neill et al., 2002c). Die Aktivitäten der Verbindungen sind dabei in einem komplizierten Regelnetzwerk miteinander verflochten (Chen et al., 1993; Leon et al., 1995), an dem noch andere Signalstoffe wie Salicylsäure, Jasmonate und Ethylen beteiligt sind (Chamnongpol et al., 1998; Penninckx et al., 1998; Klessig et al., 2000). Dabei steckt die Aufklärung der Signalwege erst in den Anfängen (Bolwell, 1999; Durner and Klessig, 1999; Dat et al., 2000; Neill et al., 2002c).

Es stellt sich die Frage, ob Phytoprostane lediglich als Abfallprodukte einer oxidativen Zell- bzw. Membran-Schädigung entstehen oder ob sie als Mediatoren in die Signaltransduktion von ROS und NO[•] involviert sein können. In letzterem Fall besäßen Phytoprostane zwangsläufig zumindest einen Teil der biologischen Aktivitäten dieser Abwehrsignalstoffe. Einige der durch ROS und NO[•] vermittelten Abwehrreaktionen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

I.4.1 Hypersensitive Reaktion

Die Hypersensitive Reaktion ist durch die Ausbildung von nekrotischen Läsionen, welche durch lokalen Programmierten Zelltod hervorgerufen wird, gekennzeichnet.

Es gilt als sicher, dass ROS an der Auslösung dieser Abwehrreaktion beteiligt sind (Neill et al., 2002a). Jedoch wird kontrovers diskutiert, welche der Sauerstoffspezies involviert ist.

Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von $\cdot\text{O}_2^-$ an der Auslösung der Hypersensitiven Reaktion. In einer Studie wurde die Mutante *lsd1* (lesions simulating disease resistance) von *A. thaliana* Ecotyp Wassilewskaija (WS) untersucht, die unter Langtagbedingungen spontan nekrotische Läsionen entwickelt und die Ausbreitung des Zelltodes nicht regulieren kann. LSD1 hemmt die Salicylsäure-abhängige Induktion der Superoxid-Dismutase (SOD) (Kliebenstein et al., 1999), so dass der Abbau von $\cdot\text{O}_2^-$ zu H₂O₂ verhindert wird. Daher war die Mutante *lsd1* ein geeignetes System, um mögliche Auswirkungen von $\cdot\text{O}_2^-$ auf den Zelltod gegen die von H₂O₂ abzugrenzen. In der Mutante *lsd1* ist eine apoplastische $\cdot\text{O}_2^-$ -Generation notwendig und ausreichend für die Bildung der nekrotischen Läsionen. H₂O₂ hingegen scheint keine Rolle zu spielen (Jabs et al., 1996).

Gegen die Funktion von $\cdot\text{O}_2^-$ als Initiator von Programmierterem Zelltod spricht eine Untersuchung von Delledonne et al., wonach das Verhältnis von H₂O₂ zu NO[•] als ausschlaggebend für die Auslösung des Programmierteren Zelltodes gefunden wurde (Delledonne et al., 2001). Die $\cdot\text{O}_2^-$ -Konzentration ist nach diesem Modell für die Regulation des NO[•]/H₂O₂-Gleichgewichtes verantwortlich und somit nur indirekt an der Ausbildung der nekrotischen Läsionen beteiligt (Delledonne et al., 2002). Entsprechend dieser Hypothese reagiert $\cdot\text{O}_2^-$ mit überschüssigem NO[•] zu Peroxynitrit, welches interessanterweise in Zellkulturen von *Glycine maxima* keinen Zelltod auslösen konnte (Delledonne et al., 2001).

Die Annahme, dass nicht $\cdot\text{O}_2^-$, sondern H₂O₂ in Kombination mit NO[•] die Hypersensitive Reaktion auslöst, wurde durch weitere Versuche untermauert. So löste der Zusatz hoher Konzentrationen (5 - 50mM) H₂O₂ zu Zellkulturen von *G. maxima* und *A. thaliana* Zelltod

aus (Levine et al., 1994; Desikan et al., 1998). In Kombination mit NO^\bullet hingegen konnten bereits geringe Mengen an H_2O_2 diese Abwehrreaktion in *A. thaliana* und *N. tabacum* hervorrufen (Delledonne et al., 1998; de Pinto et al., 2002). Eine Behandlung mit NO^\bullet alleine kann keine Hypersensitive Reaktion initiieren (Delledonne et al., 2001; de Pinto et al., 2002), potenziert aber die durch H_2O_2 ausgelöste Abwehrreaktion (Wendehenne et al., 2001).

I.4.2 Genaktivierung und Transkriptionsabhängige Abwehr

Reaktive Sauerstoffspezies vermitteln einen Teil ihrer biologischen Wirkung durch Modulation der Expression von Genen (Ryals et al., 1995; Neill et al., 2002c). So wurde in Microarray-Analysen nach Behandlung von *A. thaliana* mit H_2O_2 die Expression von mehr als hundert Genen aktiviert – darunter viele Gene, die für Signaleenzyme, stressabhängige Proteine und Transkriptionsfaktoren codieren. Mehr als 60 Gene wurden durch die Behandlung herunterreguliert (Desikan et al., 2001a).

Gene, die im Zusammenhang mit der pflanzlichen Abwehr häufig untersucht werden, sind *Gst*, *Pal* und *Chs*. Die Glutathion-S-Transferase (GST) konjugiert Glutathion an elektrophile Moleküle, wie z.B. α,β -ungesättigten Ketone. Auf diese Weise werden zelluläre Bestandteile wie Proteine und Membranen vor einem Angriff dieser reaktiven Moleküle bewahrt. Die Expression von *Gst* wird durch ROS induziert (Levine et al., 1994; Desikan et al., 1998; de Pinto et al., 2002). Für die Induktion von *Pal* und *Chs* hingegen scheint, wie bei der Auslösung der Hypersensitiven Reaktion, ein Zusammenspiel von H_2O_2 und NO^\bullet nötig zu sein (de Pinto et al., 2002). *Pal* codiert für die Phenylalanin-Ammonium-Lyase, welche für die Synthese von Flavonoiden, Cumarinen und Lignin verantwortlich ist. Die Chalkon-Synthase (CHS) ist an der Bildung von Flavonoiden und Anthocyanen beteiligt (Dixon et al., 2002). Da beide Enzyme unter anderem an der Synthese von Phytoalexinen beteiligt sind, gelten die entsprechenden Gene als „Abwehrgene“. Zwar konnte in Zellkulturen von *A. thaliana* die Expression von *Pal* durch Behandlung mit H_2O_2 gesteigert werden (Desikan et al., 1998), in *G. maxima*- und *N. tabacum* cv. BY2-Zellen hingegen war H_2O_2 alleine nicht ausreichend für eine Induktion der *Pal*-Expression (Griffith and Stuehr, 1995). Eine erhöhte *Pal*-Aktivität konnte in *N. tabacum* cv. BY2 nur bei gleichzeitigem Einfluss von NO^\bullet und ROS festgestellt werden, wobei wiederum NO^\bullet alleine keinen Effekt auslösen konnte (de Pinto et al., 2002). Andere Autoren dagegen beschreiben NO^\bullet als die Schlüsselkomponente für die Expression der Abwehrgene *Pal* und *Chs* (Delledonne et al., 1998).

I.4.3 Schluss von Stomata

Neben ihrer Rolle bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen scheinen ROS als second messenger in Hormonsignalwege involviert zu sein. So wurde beispielsweise eine Beteiligung von H_2O_2 an dem Signalweg von Abscisinsäure, welcher zur Schließung von Stomata führt, festgestellt (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2001). Untersuchungen an *Vicia faba* und *A. thaliana* zeigten,

dass Abscisinsäure die Bildung von H_2O_2 induziert. H_2O_2 wiederum vermittelt eine Reduktion der Öffnungsweite der Schließzellen. Ebenso ist H_2O_2 an der Signaltransduktion, welche den Stomataschluss nach Elicitor-Behandlung vermittelt, beteiligt (Lee et al., 1999).

Darüber hinaus konnte auch eine Beteiligung von NO^* am Abscisinsäure-vermittelten Stomataschluss gezeigt werden. Spezifisches Abfangen von NO^* durch c-PTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid] hemmte die Schließung der Stomata von *V. faba* durch Abscisinsäure, während durch anschließende Zugabe eines NO^* -Donors (Natrium-Nitroprussid) diese Funktion wieder hergestellt wurde (Garcia-Mata and Lamattina, 2002).

I.4.4 Signaltransduktion

Die Wirkung von ROS und NO^* ist vom Redox-Zustand der Zelle abhängig. Wird so viel ROS und NO^* gebildet, dass antioxidative Systeme der Zelle überlastet werden, können Redox-sensitive Proteine oxidiert und dadurch aktiviert oder inaktiviert werden (Vranova et al., 2002). Dabei können diese Proteine direkt oxidiert werden oder Redox-sensitive Verbindungen, wie GSH oder andere Thiol-haltige Moleküle zwischengeschaltet sein. Dabei wird für die Redox-sensitive Regulation von Proteinen sowohl durch ROS, als auch für NO^* als möglicher Mechanismus der Angriff an Thiol-Gruppen oder Fe-S-Komplexen diskutiert (Arrigo, 1999; Wendehenne et al., 2001). Die Oxidation von Thiolen (-SH) kann zur Bildung von oxidierten schwefelhaltigen Gruppen (-SOH, -SO₂H oder -SO₃H) oder von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken (-S-S-) führen. Als Angriffspunkte kommen hier cysteininhaltige Domänen von Enzymen in Frage (Arrigo, 1999), wodurch sich die Struktur der Enzyme und somit auch deren Aktivität verändern kann.

Ein weiterer Mechanismus, über den $^*O_2^-$ und NO^* die Aktivitäten verschiedener Enzyme verändern, verläuft über Interaktion mit Fe-S-Komplexen (Imsande, 1999; Murgia et al., 2002). Eine Oxidation der Fe-S-Komplexe durch $^*O_2^-$ inaktiviert die Komplexe und beeinflusst so die Enzymaktivität. Darüber hinaus steht freigesetztes Fe^{2+} für die Fenton-Reaktion zur Verfügung, wodurch verstärkt HO^* gebildet wird. Viele metabolische Enzyme wie beispielsweise Aconitase, Nitrit-Reduktase und Enzyme des Purin-Stoffwechsels besitzen solche Fe-S-Komplexe und könnten so über Redox-Reaktionen reguliert werden (Imsande, 1999).

Die durch ROS und NO^* oxidierten Proteine können entweder direkt in den Zellstoffwechsel eingreifen oder ihre Funktion beispielsweise über Transskriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen ausüben.

I.4.4.1 Aktivierung von MAP Kinasen

Man nimmt an, dass H_2O_2 über oben geschilderte Mechanismen mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) aktivieren kann (Vranova et al., 2002). MAPK sind in dreistufigen

Kaskaden angeordnet, wobei MAPK durch MAPK-Kinasen (MAPKK), und MAPKK wiederum durch MAPKK-Kinasen (MAPKKK) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Diese MAPK-Kaskaden übermitteln extrazelluläre Signale zu nukleären oder zytoplasmatischen Zielen. MAPK werden in Pflanzen durch Pathogenbefall, Kälte und Trockenstress, sowie Phytohormone aktiviert, was zu einer Veränderung der Genexpression führt (Hirt, 1997).

In Pflanzen konnte bislang keine dieser Signaltransduktionskaskaden vollständig aufgeklärt werden, jedoch konnten im Genom von *A. thaliana* etwa 20 MAPK identifiziert werden (Zhang and Klessig, 2001), darunter die MAPKKK ANP1 und die durch ANP1 aktivierten MAPK AtMPK3 und AtMPK6 (Desikan et al., 2001b). Letztere übermitteln das Signal von H₂O₂ und induziert die Expression von Abwehrgenen (z.B. *Gst6*) (Kovtun et al., 2000).

Auch in *N. tabacum* wurden verschiedene MAPK nachgewiesen, wie beispielsweise die Salicylsäure-induzierte Protein-Kinase (SIPK). Diese wird während der Hypersensitiven Reaktion nach TMV-Infektion induziert (Zhang and Klessig, 1998). Darüberhinaus geht ihre Aktivierung der Induktion von PAL voran (Zhang et al., 1998; Yang et al., 2001). SIPK wird sowohl von H₂O₂, als auch von NO[•] und Salicylsäure (Kumar and Klessig, 2000; Samuel et al., 2000) aktiviert.

I.5 Lipidperoxidation als Signal?

In den vergangenen Kapiteln wurde die Rolle von ROS und NO[•] in der pflanzlichen Abwehr und in der Funktion von Schließzellen beleuchtet. Die Signaltransduktionswege, die schließlich zu Hypersensitiver Reaktion, Genaktivierung, Aktivierung von MAPK oder Stomataschließung führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Angriffspunkt von ROS und NO[•] können Fettsäuren sein (I.3), welche *in planta* hauptsächlich in Membranen verestert vorliegen. Dort findet nach Abstraktion eines Wasserstoffradikals von ungesättigten Fettsäuren Lipidperoxidation statt. Fraglich ist, ob Produkte dieser Reaktion an der Signaltransduktion von ROS und NO[•] beteiligt sein können. Erste Hinweise darauf wurden in der Literatur beschrieben:

Verstärkte Lipidperoxidation wurde während der Hypersensitiven Reaktion, nach Elicitor-Stimulation und nach Pathogenbefall beobachtet (Rogers et al., 1988; May et al., 1996; Anderson et al., 1998; Gobel et al., 2001). Die Produkte einer Lipidperoxidation, Fettsäurehydroperoxide, werden oft mit Programmierem Zelltod in Verbindung gebracht (Farmer et al., 1998; Rusterucci et al., 1999; Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002), außerdem induzieren sie die Induktion von *Pr1* und *Pr2*, welche Markergene der lokalen und systemischen Abwehr darstellen (Anderson et al., 1998).

Somit gibt es Hinweise in der Literatur, dass Lipidperoxidation ein Signal der pflanzlichen Abwehr darstellen könnte.

I.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass oxidativer Stress, hervorgerufen durch abiotische Stimuli, die Bildung von PPE₁ und PPF₁ induziert (Parchmann, 1999; Imbusch and Mueller, 2000a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Induktion der Phytoprostan-Synthese auch unter natürlichen Bedingungen, wie etwa einer Pflanzen-Pathogen-Interaktion stattfinden kann. In Folge von Pathogenbefall kann Lipidperoxidation induziert werden (Rusterucci et al., 1999; Gobel et al., 2001), wodurch die Synthese von Phytoprostanen verstärkt werden könnte.

Des Weiteren sollten Versuche zur biologischen Aktivität von Phytoprostanen durchgeführt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Jasmonaten könnten Phytoprostane ein dieses Signalstoffen entsprechendes Aktivitätsspektrum besitzen. Besonders auffällig sind die Parallelen in den Strukturen von OPDA und PPA₁ bzw. PPB₁, daher sollten insbesondere diese Cyclopentenon-Phytoprostane bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht werden.

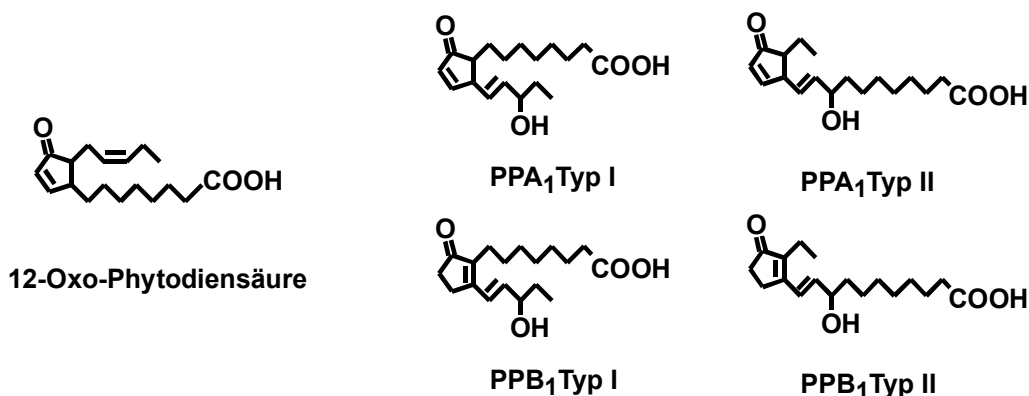


Abbildung I.11: Strukturen verschiedener Cyclopentenon-Oxylipine.

Dazu mussten Phytoprostane zunächst hergestellt und identifiziert werden. Darüber hinaus sollten einzelne Isomere isoliert und auf biologische Aktivität überprüft werden. Es war zu erwarten, dass sich bei der Auftrennung der Isomerengemische von PPE₁ und PPF₁ Schwierigkeiten aufgrund der Vielzahl an 32 verschiedenen Strukturen ergeben würden. Dahingegen bestehen PPA₁ und PPB₁ nur aus 16 bzw. 4 Isomeren, was die Herstellung einzelner Verbindungen deutlich erleichtern sollte. Dies war ein weiteres Argument für die Auswahl von PPA₁ und PPB₁ als Testsubstanzen.

Anschließend sollten Phytoprostane bezüglich einer Induktion der Phytoalexin-Synthese untersucht werden, da dies eine der biologischen Aktivitäten von Jasmonsäure ist. (Gundlach et al., 1992; Blechert et al., 1995; Haider et al., 2000). Diese Untersuchungen sollten mit verschiedenen Zellkulturen durchgeführt werden, die Phytoalexine aus unterschiedlichen Stoffklassen produzieren. Dabei waren sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch der zeitliche Verlauf einer möglichen Reaktion im Vergleich zu Jasmonsäure von Interesse.

Da Jasmonate nicht nur Abwehrsignalstoffe darstellen, sondern auch als Phytohormone auch an Prozessen wie Fruchtreifung, Knollenbildung und Fortpflanzung beteiligt sind, sollten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Phytoprostanen nicht auf das Gebiet der pflanzlichen Abwehr begrenzt sein. In der Literatur wurde beschrieben, dass sowohl Jasmonate als auch Prostaglandine die Öffnungsweite von Stomata modulieren können (Beltrano et al., 1997; Herde et al., 1997; Jin and Wu, 1999). Daher sollte die Reaktion von Schließzellen auf eine Behandlung mit Phytoprostanen beobachtet werden.

Zunächst aber sollte eine Methode entwickelt werden, um PPA₁ und PPB₁ in Pflanzen identifizieren und quantifizieren zu können. Auf diese Weise könnten dann PPA₁ und PPB₁ in mehreren Pflanzenspezies taxonomisch entfernter Familien analysiert und so deren Vorkommen *in planta* nachgewiesen werden.

II. Material

II.1 Pflanzliches Material

II.1.1 Zellkulturen

Die verwendeten pflanzlichen Zellsuspensionskulturen stammten aus den Sammlungen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München und der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 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 and Skoog, 1965) überimpft.

Für alle Untersuchungen in Multischalen und Erlenmeyerkolben 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 6-8 g Zellen in 80 ml Medium.

Eine Ausnahme stellte die Untersuchung von Scopoletin in Zellsuspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* ssp. *xanthii* dar. Hier wurden 6 ml einer 3 Tage alten Zellsuspensionskultur in 20 ml frisches Medium überführt.

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um die Zellkulturen auf mikrobielle Infektionen zu überprüfen, wurde in regelmäßigen Abständen 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 80°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 5-10% des Feuchtgewichtes.

II.1.2 Ganze Pflanzenorgane

Die verwendeten frischen Pflanzenorgane stammten von Wildsammlungen [*Betula pendula* (Blätter), *Tilia cordata* (Blätter)] aus dem Botanischen Garten der Stadt Würzburg [*Salix alba* (Blätter)], oder aus den Gewächshäusern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg [*Lycopersicon esculentum* var. *Moneymaker* (Blätter), *Arabidopsis thaliana* Ecotypen Columbia und Wassilewskaija (Blätter) und *Nicotiana tabacum* ssp. *rustica* (Blätter)]. Die Pflanzen unterlagen einem normalen Tag-Nacht-Zyklus (16 Stunden Tag, 8 Stunden Nacht).

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde auch hier ca. 1 g frisches Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 15% des Feuchtgewichtes.

II.2 Chemikalien

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

Prostaglandine wurden bei Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) erworben.

Racemisches Methyljasmonat wurde von Serva (Heidelberg) bezogen. Dieses diente als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Jasmonsäure durch Hydrolyse des Esters. 9,10-Dihydrojasmonsäure wurde durch katalytische Hydrierung von Jasmonsäure mit Paladium/Kohle gewonnen (Gundlach et al., 1992).

$^{18}\text{O}_2$ -Gas (99.1 % ^{18}O) wurde bei Isotech (Miamisburg, USA) erworben.

II.3 Verbrauchsmaterial

Zur Festphasenextraktion wurden Octadecyl (C18)-, Aminopropyl (NH₂)- und Silica (SiOH)-Phasen von Machery-Nagel (Düren) in 500 g-Glassäulen eingesetzt, während für die Säulenchromatographie 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).

II.4 Geräte

Gaschromatograph- Massenspektrometer:	GC-MS (Jeol, Tokyo, Japan) Agilent 6890 Series Gaschromatograph (Agilent) JMS-GCMate II Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan)
	GC-MS (Finnigan MAT, Bremen) Varian 3400 Gaschromatograph (Varian, Darmstadt) SSQ 700 Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)
HPLC: -analytisch	HPLC-Anlage (Waters, Milford, USA) W600 Pump W717 Auto Sampler 996 Diode Array Detector W474 Fluorescence Detector W600 Controller Millenium32 Software
	HPLC-Anlage Merk-Hitachi (Darmstadt) L-6200 Intelligent Pump AS-4000 Intelligent Auto Sampler L-4250 UV-VIS Detector D-2500 Chromato-Integrator bzw. Eurochrom Integration Package Software (Knauer, Berlin)
-präparativ	HPLC-Anlage Merk-Hitachi (Darmstadt) L-6250 Intelligent Pump L-4000A UV Detector D-2000 Chromato-Integrator
	HPLC-Anlage Knauer (Berlin) K 1001 Pump Midas Autosampler (Spark) K 2501 UV Detector Foxy Jr. Fraction collector Eurochrom Software

II. Material

	Lobar-Anlage Merk-Hitachi (Darmstadt) L-6200 Intelligent Pump L-655A UV Monitor D-2500 Chromato-Integrator
Photometer:	Perkin-Elmer 551S-Spektralphotometer (Perkin-Elmer, Überlingen)
	Analytik Jena Specord 200 (Analytik Jena, Jena) Precision Microplate Reader Emax (Molecular Devices, USA)
Mikroskopie:	Axioskop (Carl Zeiss, Jena)
Homogenisieren:	Ultra-Turrax T20 basic mit Dispergierwerkzeug S25N-10G (Janke & Kunkel, Staufen)
Rühren/Durchmischen:	Magnetrührer der IKA-Werke (Janke & Kunkel, Staufen) Vortex (Heidolph, Kehlheim)
Festphasenextraktion (SPE):	Vakuumbox 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) Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus-Christ, Osterode)
Probenkonzentrierung:	Rotavapor R 110 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Rotationsschüttler:	Rotationsschüttler G53 (New Brunswick Scientific, Nürtingen) Rotationsschüttler, Eigenbau der Universitätswerkstätten Bochum 4020-Schüttler für Multischalen (Köttermann, Hänigsen)
Autoklaven:	Technomara-Autoklaven (Fedegari, Albuzzano, Italien) Tischautoklav 2540 EL (Systec, Wetztenberg)

II. Material

Temperieren/Inkubieren: Thermostatisierbare 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 $\lambda = 254 \text{ nm}$ und 356 nm (Desaga, Heidelberg)

Ultraschallbad Sonorex TK52 (Bandelin)

pH-Meter 766 Calimatic (Knick, Berlin)

III. Methoden

III.1 Herstellung von Phytoprostanen

III.1.1 Herstellung von PPE₁: Autoxidation von α -Linolensäure

α -Linolensäure (5 g) wurde in 10 ml Methanol (50%, v/v) gelöst und bei Raumtemperatur unter ständiger Luftzufuhr gerührt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurde der Autoxidationsansatz mit 50 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt und nach Ansäuern mit 1 M Citronensäure (pH 3-4) gegen Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde abgenommen und unter Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50 ml Chloroform gelöst. Um eine mögliche weitere Autoxidation zu vermeiden, wurde 1 g Butylhydroxytoluol (BHT) zugegeben. Des Weiteren wurden durch Zugabe von 6 g Triphenylphosphin (TPP) eventuell im Autoxidationsansatz vorhandene Hydroperoxide und Endoperoxide zu Alkoholen reduziert.

Zur Aufreinigung des Autoxidationsproduktgemisches wurde eine präparative Säulenchromatographie durchgeführt. Dazu wurden 30 g Silicamaterial (Silicagel 60) in Methanol aufgeschlämmt und in eine Glassäule mit 1,7 cm Durchmesser überführt. Nach Absetzen des Gels wurde das Silicamaterial mit 1 cm Seesand überschichtet, um ein Aufwirbeln des Säulenmaterials bei Wechsel des Elutionsmittels zu vermeiden. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumina Methanol gespült und mit 3 Säulenvolumina Chloroform equilibriert. Anschließend wurde das in Chloroform gelöste Autoxidationsproduktgemisch aufgetragen. Um Reste von Linolensäure, eventuell vorhandene Monohydroperoxide und Triphenylphosphin zu entfernen, wurde die Säule mit 600 ml Diethylether/Essigsäure (99:1, v/v) und 60 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen. Durch Elution mit 500 ml Diethylether/Aceton/Essigsäure (70:30:1, v/v) erhielt man ein Gemisch von Phytoprostanen des E-Typs (PPE₁). Dieses Gemisch enthielt jedoch noch Verunreinigungen, vermutlich oxidierte Fettsäure-Derivate, so dass weitere Reinigungsschritte, z.B. präparative Dünnschichtchromatographie (III.4.2), durchgeführt wurden, bevor das PPE₁-Gemisch in biologischen Testsystemen eingesetzt wurde. Das PPE₁-Gemisch wurde in Methanol bei -20°C gelagert.

III.1.2 Herstellung von PPA₁: Säurekatalysierte Dehydratisierung von PPE₁

Säurekatalysierte Dehydratisierung überführt das PGE-Ringsystem in das PGA-Ringsystem (Andersen, 1969). Analog zu den Prostaglandinen kann aus PPE₁ durch Säurezugabe die entsprechende A-Ring-Verbindung hergestellt werden.

Zur Darstellung von PPA₁ wurde das PPE₁-Gemisch mit einem Säurereagenz (Wasser/Essigsäure/Phosphorsäure, 10:3:2, v/v) versetzt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Die entstandenen PPA₁ wurden zweimal mit 2 ml Diethylether extrahiert, die Etherphase

abgenommen und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurde eine Reinigung über Festphasenextraktion an Silica-Material durchgeführt (III.4.1). Dazu wurde das PPA₁-Gemisch in Chloroform gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit weiteren 9 ml Chloroform gewaschen und die PPA₁ mit Diethylether/Essigsäure (99:2 v/v) eluiert. Die PPA₁ wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet, in Ethylacetat aufgenommen und bei -80°C gelagert.

III.1.3 Herstellung von PPB₁: Basenkatalysierte Dehydratisierung von PPE₁

Durch basenkatalysierte Dehydratisierung können aus PPE₁ korrespondierende B-Ring-Verbindungen hergestellt werden (Parchmann and Mueller, 1998). Hierfür wurden in Methanol gelöste PPE₁ mit 1 M Kalilauge bis zur Einstellung eines pH-Wertes >11 versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Um die PPB₁ zu protonieren, wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von 2 ml Wasser mit Eisessig auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Die PPB₁ wurden zweimal mit 2 ml Diethylether extrahiert, die Etherphasen vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Das so erhaltene PPB₁-Gemisch wurde in Methanol gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

III.2 Versuche mit pflanzlichen Zellkulturen und Pflanzen

Versuche mit pflanzlichen Zellsuspensionkulturen wurden in Multischalen (Nunc, Wiesbaden) und Erlenmeyerkolben durchgeführt. Alle Experimente erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die auf ihre biologische Aktivität zu testenden wasserlöslichen Substanzen wurden sterilfiltriert, während in organischen Lösungsmitteln lösliche Substanzen als methanolische Lösung zugesetzt wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentration an Methanol 2% (v/v) nicht überstieg, um toxische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

III.2.1 Zeitabhängige Sekundärstoffakkumulation in Zellsuspensionskulturen in Erlenmeyerkolben

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den zeitlichen Verlauf der Sekundärstoff- bzw. Jasmonsäure-Produktion pflanzlicher Zellen nach Zugabe von Phytoprostanen zu beobachten. Für diese Untersuchung wurden zwischen 600 ml und 2 l Zellsuspensionskultur mit den zu testenden Phytoprostanen versetzt, zu festgesetzten Zeitpunkten Aliquote des Ansatzes entnommen und analysiert.

Die Zellkulturen wurden wie in II.1.1 beschrieben für die Versuchsreihen vorbereitet. Zu Beginn des Experiments wurden der Zellkultur Phytoprostanlösungen bis zu einer Endkonzentration von 50 oder 100 μM zugesetzt. In jeder Testreihe wurden zeitgleich Kontrollversuche angesetzt, denen die entsprechende Menge an Methanol zugegeben wurde. Bei den Untersuchungen zur Sekundärstoffakkumulation diente Jasmonsäure als Positivkontrolle, um die einzelnen Experimente auch bei unterschiedlicher Empfindlichkeit der Zellkulturen gegenüber Phytoprostanen vergleichen zu können. Bei Experimenten zur Induktion der Jasmonat-Synthese wurde ein Ansatz mit Hefeelictor (Schuhmacher, 1987) in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ als Referenz versetzt. Nach Zusatz der Testsubstanzen wurde die Zellkultur unter Standard-Bedingungen kultiviert. Zu den festgesetzten Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Zellen vorsichtig durch Vakuumfiltration über einen Büchnertrichter mit Nylonnetz vom Medium getrennt. Etwa 1 g der Zellen wurde für die Bestimmung des Trockengewichtes verwendet, von den verbliebenen Zellen wurde das Feuchtgewicht bestimmt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt und innerhalb von 2 Wochen aufgearbeitet.

III.2.2 Biologische Testsysteme in Multischalen

III.2.2.1 Biologische Testsysteme *Eschscholtzia californica* und *Crotalaria cobalticola*

Von einer 3 bis 4 Tage alten Zellsuspensionskultur, die wie in Abschnitt II.1.1 beschrieben vorbereitet worden war, wurde unter sterilen Bedingungen jeweils 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Loch-Multischale vorgelegt. Für die Versuche zur Sekundärstoffinduktion durch Phytoprostane wurden jeweils 20 µl einer Konzentrationsreihe einer Stammlösung zupipettiert, um Endkonzentrationen zwischen 10 und 250 µM in der Zellkultur zu erreichen. In jeder Testreihe wurden Kontrollen mitgeführt, die anstelle von Phytoprostanen nur die entsprechende Menge an Lösungsmittel enthielten. Jedem Napf wurden 250 µl Wasser als Verdunstungsausgleich zugesetzt und die Multischale mit Parafilm fest verschlossen. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Zellkultur wurden die Multischalen 36 h (*Crotalaria cobalticola*) bis 5 Tage (*Eschscholtzia californica*) auf einem Schüttler (200 rpm) bei 23°C und diffusem Licht (750 lux) inkubiert.

Für die Extraktion wurde der Inhalt jeder Vertiefung einer Multischale in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 1 ml salzsaurem Ethanol (Ethanol/Wasser/HCl konz., 80:20:0.18, v/v) aufgeschlossen. Dazu wurde der Ansatz 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die zellulären Bestandteile wurden abzentrifugiert (5 min, 15800 x g) und der Überstand photometrisch vermessen (*E. californica*) oder mittels HPLC (*E. californica* und *C. cobalticola*) analysiert.

III.2.2.1.1 Photometrische Auswertung des Alkaloidgehaltes von *Eschscholtzia californica*

Die Zellkultur von *E. californica* produziert als Folge einer Elicitierung Benzophenanthridin-Alkaloide, welche der Kultur eine rote bis rotbraune Färbung verleihen (Schuhmacher et al., 1987). Nach oben beschriebener Extraktion lässt sich der Gehalt an Benzophenanthridin-Alkaloiden durch photometrische Messung bestimmen:

250 µl des Extraktes wurden in eine Microtiterplatte überführt und die Extinktion bei 490nm mittels Microplate Reader bestimmt. Zur Berechnung des Benzophenanthridin-Gehaltes wurde eine von Gundlach ermittelte Formel (Gundlach, 1992) verwendet:

$$\text{Extinktion} \times 90 = \mu\text{g Benzophenanthridine/ml Zellkultur}$$

III.2.2.2 Biologisches Testsystem *Nicotiana tabacum*

Für Untersuchungen zur Scopoletin-Induktion in Zellsuspensionskulturen von *N. tabacum* wurden drei Tage vor Versuchsbeginn 6 ml Zellkultur in 20 ml LS- Medium inokuliert.

Die drei Tage alte Kultur wurde mit methylierten PPB₁ bis zu einer Endkonzentration von 10 µM versetzt und unter den standardisierten Kultivierungsbedingungen (II.1.1) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde bei allen Testreihen ein Ansatz mitgeführt, dem Methyljasmonat in einer Endkonzentration von 10µM zugesetzt worden war. Als Negativkontrolle wurde einem Ansatz das gleiche Volumen Methanol zugegeben, das für die Lösung der Testsubstanzen verwendet worden war. Der Methanolgehalt wurde dabei unter 1% gehalten, um einen toxischen Effekt durch das Lösungsmittel zu vermeiden.

Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden für jeden Messpunkt 7 ml der Zellkultur entnommen. Von einem weiteren Aliquot wurde das Feuchtgewicht der in 7 ml enthaltenen Zellen bestimmt, die zellulären Bestandteile wurden bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Die Zellsuspension wurde mit 10 mM 4-Methylumbelliferon als internem Standard versetzt und bei 2900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Verhältnis von 2:1 (v/v) mit Methanol/Wasser/Essigsäure (50/50/1, v/v) versetzt und per HPLC mit Fluoreszenzdetektor, und wie nachfolgend beschrieben, analysiert (Thoma et al., 2003b).

HPLC- Anlage: Waters-Anlage mit Fluoreszenzdetektor (Waters, Eschborn)

Säule: Eurospher RP18ec, 250 x 4 mm (Knauer, Berlin)

Laufmittel: LM A: Wasser/Acetonitril/Essigsäure (90:10:0.1, v/v)

LM B: Wasser/Acetonitril/Essigsäure (80:20:0.1, v/v)

LM C: Wasser/Acetonitril/Essigsäure (40:60:0.1 v/v)

Gradient	Zeit [min]	LM A	LM B	LM C
	0	100	0	0
	5	100	0	0
	8	0	100	0
	30	0	0	100

Fluss: 1,0 ml/min

Detektion: $\lambda_{\text{Anregung}} = 350 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{Emission}} = 430 \text{ nm}$

Für die Berechnung des Scopoletin-Gehaltes anhand des internen Standards 4-Methylumbelliferon wurde ein Responsefaktor $f = 2,362$ berücksichtigt. Der Faktor gibt das Verhältnis der Peakflächen von Scopoletin zu internem Standard nach Injektion einer äquimolaren Mischung an.

III.2.3 Infektion von *Lycopersicon esculentum* mit *Botrytis cinerea*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte des Weiteren untersucht werden, ob Pathogenbefall einen Einfluss auf die Phytoprostan-Konzentrationen in Pflanzen ausübt. Dazu wurden Pflanzen der Art *Lycopersicon esculentum* var. MoneyMaker mit einer Sporensuspension des phytopathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* behandelt.

Die Sporen von *B. cinerea* wurden durch Abschaben von Agarplatten (Potato-Dextrose-Medium, Sigma) gewonnen, welche mit sporulierenden Pilzhypen bewachsen waren. Die geernteten Sporen wurden in 5 ml eines zweiprozentigen Malzextraktes (Difco, Detroit, USA) aufgenommen und über drei Lagen einer handelsüblichen Mullbinde filtriert. Nach dem Auszählen in einer Zählkammer wurde die Sporensuspension auf 1 Mio. Sporen/ml eingestellt. Zur Infektion der Pflanzen wurden jeweils 5 µl dieser Suspension in Abhängigkeit von der Blattgröße an 4 bis 8 Stellen je Fiederblättchen aufgebracht. Um das Eindringen des Pilzes zu erleichtern, wurde das Blatt an den Infektionsstellen mit Hilfe einer Nadel verletzt. Als Kontrolle dienten Blätter derselben Pflanzen. Die Kontrollblätter befanden sich etwa in gleicher Höhe wie die infizierten Blätter. Die Kontrollen wurden in gleicher Weise behandelt wie die infizierten Blätter, jedoch wurde an Stelle der Sporensuspension lediglich zweiprozentiger Malzextrakt aufgetragen. Die behandelten Pflanzen wurden in eine feuchte und klimastabilisierte Kammer eingestellt. Nach 48 h wurden das infizierte Blattmaterial und die Kontrollen geerntet und schockgefroren. Vor der Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial in gefrorenem Zustand pulverisiert.

III.3 Extraktion und Aufreinigung von Fettsäurederivaten aus pflanzlichem Material

III.3.1 Extraktion und Aufreinigung von Jasmonsäure

Die Analyse von Jasmonsäure erfolgte nach der Methode von Mueller und Brodschelm (Mueller and Brodschelm, 1994).

2,5 bis 5 g Frischgewicht an Zellkultur bzw. Pflanze wurden mit

- 20 ml gesättigter Kochsalz-Lösung,
- 400 µl 5% (w/v) BHT in Methanol,
- 100 ng 9,10-Dihydrojasmonsäure als internem Standard,
- 200 µl 1 M Citronensäure und
- 25 ml Diethylether versetzt.

Die verwendeten Lösungen wurden auf 4°C gekühlt, um ein Auftauen des gefrorenen Pflanzenmaterials während der Extraktion zu unterbinden.

Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit einem Ultra Turrax durch dreiminütige Dispersion bei 2400 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 2900 x g 10 min (4°C) zentrifugiert. Die Etherphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Die Aufreinigung von Jasmonsäure erfolgte über Festphasenextraktion an Aminopropylmaterial (III.4.1). Der aufzureinigende Extrakt wurde in Ether aufgenommen und auf die NH₂-SPE-Säule gebracht. Die Säule wurde mit Chloroform/Isopropanol (8:2, v/v) gewaschen und Jasmonsäure mit Diethylether/Essigsäure (99:2, v/v) eluiert. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Vor der Analyse mittels GC-MS im NICI-Modus (III.4.4.4 und III.5.2) wurde Jasmonsäure zum PFB-Ester umgesetzt (III.3.3.3).

III.3.2 Extraktion und Aufreinigung von PPE₁

10 g Frischpflanzenmaterial wurden mit

- 20 ml gesättigter Kochsalzlösung,
- 400 µl 5% (w/v) BHT in Methanol,
- ca. 20 mg TPP,
- 100 ng [¹⁸O]-PPE₁ Typ I und
- 92 ng [¹⁸O]-PPE₁ Typ II als internem Standard
- 200 µl 1 M Citronensäure und
- 15 ml Diethylether versetzt.

Die Zellen wurden mit einem Ultra Turrax durch dreiminütiges Dispergieren bei 2400 rpm zerstört. Nach 10 min Zentrifugation der Probe mit 2900 x g bei 4°C wurde die Etherphase abgenommen und unter einem Stickstoffstrom trockengeblasen. Der Rückstand wurde in

Diethylether aufgenommen und auf eine zuvor mit Chloroform equilibrierte Kieselgel-SPE-Säule appliziert. PPA₁ und PPB₁ sowie die in Ether löslichen Kontaminanten wie Chlorophyll, Fettsäureester und Sekundärmetabolite wurden mit 7 ml Diethylether/Essigsäure (98:2, v/v) eluiert. PPE₁ verblieben unter diesen Bedingungen auf der Säule und wurden quantitativ von den PPA₁ und PPB₁ abgetrennt. PPE₁ wurden dann mit Diethylether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet, der Rückstand in 100 µl Methanol aufgenommen und mit 50 µl 1 M KOH versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 40°C im Wasserbad wurde der Isomerisierungsansatz mit 50 µl 1M Citronensäure angesäuert (pH 3-4), nach Zusatz von 2 ml Wasser gegen Diethylether ausgeschüttelt und die Etherphasen unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die nun in PPB₁ überführten PPE₁ wurden über eine Aminopropyl-Festphasenextraktion gereinigt. Dazu wurde der Rückstand in Ether aufgenommen und auf die NH₂-SPE-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Chloroform/Isopropanol (8:2, v/v) gewaschen und die PPB₁ mit Diethylether/Essigsäure (99:2, v/v) eluiert. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und nach Derivatisierung zum PFB-Ester und TMS-Ether mittels GC-MS-Analyse (III.4.4.2, III.5.2) quantifiziert.

III.3.3 Derivatisierung von Fettsäure-Derivaten

In der vorliegenden Arbeit wurden Fettsäure-Derivate gaschromatographisch getrennt und mittels Massenspektrometrie (MS) im Elektronenstoßionisationsmodus (engl.: Electron Impact, EI) bzw. im negativen chemischen Ionisationsmodus (engl.: Negative Ion Chemical Ionisation, NICI) bestimmt. Diese Analytik setzt voraus, dass die Fettsäure-Derivate flüchtig, stabil, sowie im jeweiligen Ionisationsmodus detektierbar sind. Diese Voraussetzungen wurden durch Umsetzung mit folgenden Derivatisierungsmethoden geschaffen.

III.3.3.1 Methylierung mit Diazomethan

III.3.3.1.1 Herstellung von Diazomethan

Zur Methylierung von Fettsäure-Derivaten 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 einen 100 ml-Rundkolben eingewogen und in 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 einen 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 und noch vorhandenes Diazomethan abreagiert werden.

III.3.3.1 Methylierung von Fettsäure-Derivaten

Die zu methylierenden Fettsäure-Derivate wurden in 30 µl Methanol angelöst und mit Diazomethan bis zu einer bleibenden Gelbfärbung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde dann weitere 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt.

III.3.3.2 Methoximierung von Fettsäure-Derivaten

PPA₁ isomerisieren im Injektor des GC-MS bei 300°C zu den stabileren PPB₁. Um dies zu unterbinden, wurden die Phytostane zuvor zu den entsprechenden Methoximen umgesetzt. Dazu wurden die Phytostane mit 50 µl Methoxyamin HCl-Reagenz (5 mg/100 µl Dimethylformamid) versetzt und 1 Stunde bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde bis zur Trockene eingeeengt, in 2 ml Wasser aufgenommen und mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

III.3.3.3 Herstellung von Pentafluorbenzylestern

Eine der empfindlichsten Nachweismethoden von Fettsäuren und deren 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 Prostaglandin-Chemie etabliert ist (Morrow et al., 1990). Die Phytostane, die als freie Säuren vorlagen, wurden in 200 µl Chloroform gelöst und mit 10 µl N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) und 10 µl PFB-Br versetzt. Der Reaktionsansatz wurde dann 45 min bei 40°C inkubiert und anschließend unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach Derivatisierung zum Trimethylsilylether (III.3.3.4) wurde überschüssiges Reagenz über SiOH-Festphasenextraktion abgetrennt.

III.3.3.4 Herstellung von Trimethylsilylethern

PPE₁, PPA₁ und PPB₁ besitzen Hydroxylgruppen, die derivatisiert werden müssen, um die Phytostane über Gaschromatographie trennen zu können. Die mit PFB veresterten Phytostane (III.3.3.3) wurden in 200 µl Chloroform gelöst, mit 50 µl N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) versetzt und bei 40°C 45 min derivatisiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bis zur Trockene eingeeengt.

III.4 Chromatographische Methoden

III.4.1 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion diente als schneller Reinigungsschritt während der Probenaufarbeitung. Als stationäre Phasen wurden NH₂- und SiOH-Material eingesetzt. Bei den verwendeten Säulen handelt es sich um 3 ml-Glassäulen der Fa. Macherey und Nagel (Düren), die mit jeweils 500 mg der stationären Phase befüllt wurden. Die Chromatographie erfolgte unter leichtem Vakuum an einer Vakuumbbox, wobei mehrere Proben parallel aufgereinigt werden konnten. Um die Festphasenextraktionssäulen mehrfach verwenden zu können, wurden Reinigungs- und Regenerationsschritte durchgeführt:

SiOH-SPE: 5 ml 5% HCl konz./Methanol (v/v)

5 ml Methanol

NH₂-SPE: 5 ml 5% HCl konz. /Methanol (v/v)

5 ml Methanol

5 ml 5% Triethylamin/Methanol (v/v)

5 ml Methanol

Im Anschluss an die Regeneration wurden die Säulen mit dem Lösungsmittel equilibriert, in dem die Probe aufgetragen wurde. Während sich die Probe auf der Säule befand, durfte diese nicht trockenlaufen, da dies zu Veränderungen im Elutionsprofil führen kann. Nach Reinigung und Elution der Probe wurde die Säule wie oben beschrieben regeneriert. Sollte die Säule nach dem Regenerieren gelagert werden, wurde sie nach der Methanolspülung mit jeweils 1,5 ml Ether und Hexan gespült und trocken gesaugt.

III.4.2 Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Trennungen zu analytischen und präparativen Zwecken wurden auf Polygram SIL G/UV254 Kieselgelfolien 20x20 cm, Schichtdicke 0.25mm (Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt. Dabei kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung:

- LM1 Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (86:14:1:0.8, v/v)
- LM2 Diethylether/Essigsäure (99:1, v/v)

Zur Detektion wurden folgende Methoden angewendet:

- UV-Löschung bei 254 nm
- Kupferacetat-Sprühreagenz (3% Kupferacetat in 80%iger wässriger Phosphorsäure) (Hurst et al., 1987). Dieses Reagenz bildet mit Prostanoiden charakteristisch gefärbte Komplexe, z.B. mit PPA₁ und PPE₁ gelbgrüne Komplexe, mit PPB₁ gelbe Komplexe.

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über parallel aufgetragene Referenzsubstanzen.

III.4.3 Analytische und präparative HPLC

Für die Analyse von Phytoprostanen fand ein Reversed Phase-System Anwendung. Da sich die Auftrennung der Vielzahl an Stereoisomeren von PPA₁ und PPE₁ als schwierig erwies, wurden diese Verbindungen für die Routineanalytik zu PPB₁ isomerisiert (III.1.3). B-Ringverbindungen besitzen nur ein Enantiomerenpaar je Regioisomer, das Chromatogramm weist dementsprechend nur einen Peak je Regioisomer auf.

Als interner Standard wurden jeweils 5 µg des entsprechenden Prostaglandins (PGA₁ und PGE₁) verwendet, die vor der Isomerisierung zu dem Reaktionsansatz gegeben wurden.

HPLC- Anlage: Merck-Hitachi analytisch
Trennsäule: RP18e-LiChrospher 100 (250 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Knauer)
Laufmittel: Methanol/Wasser/Acetonitril/Essigsäure (35:35:30:0.1, v/v)
Gradient: Isokratisch
Flussrate: 1 ml/min
Detektion: $\lambda = 278 \text{ nm}$
Retentionszeit: PPB₁ Typ I: 20 min
PPB₁ Typ II: 22 min

Präparative HPLC

HPLC-Anlage: Präparative HPLC-Anlage Knauer
Säule: Lichrosorb (250 x 25 mm Partikelgröße 10µm, Knauer)
Laufmittel: LM A: Methanol/Wasser/Acetonitril/Essigsäure (35:35:30:0.1, v/v)
LM B: Wasser/Essigsäure (99:0.1, v/v)
Gradient: Isokratisch: 56 Teile LM A, 44 Teile LM B
Fluss: 17 ml/min
Detektion: $\lambda=278 \text{ nm}$
Retentionszeiten: PPB₁ Typ I : 85 min
PPB₁ Typ II : 95 min

Präparative Auftrennung an einer Lobar- Säule

Anlage: Lobar-Anlage Merck Hitachi
Säule: Lobar RP18
Laufmittel: Isokratisch
Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (57:23:20:0.1, v/v)
Fluss: 1,6 ml/min
Detektion: $\lambda=278 \text{ nm}$
Retentionszeit PPB₁ Typ I und Typ II: ca. 12 h

III.4.4 Gaschromatographie

Die gaschromatographische Analyse wurde an zwei verschiedenen GC-MS-Systemen durchgeführt.

System 1

Gaschromatograph: Varian 3400
Säule: Optima 5 (25 m x 0.25 mm, Machery-Nagel, Düren)
Vorsäule: methyldesaktivierte Säule (5 m x 0.25 mm, Machery-Nagel, Düren)
Trägergas: Helium
Fließgeschwindigkeit: 23 cm/s
Injektor: Insert-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
Split: Öffnung nach 1 min
Detektor: SSQ 700 Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)

System 2

Gaschromatograph: Agilent 6890
Säule: ZB 5 (25 m x 0.25 mm, Phenomenex)
Vorsäule: methyldesaktivierte Säule (5 m x 0.25 mm, Machery-Nagel, Düren)
Trägergas: Helium
Fließgeschwindigkeit: 1 m/min
Injektor: Insert-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
Split: split less
Detektor: JMS-GCMate II (Jeol, Tokyo, Japan)

Die angewendeten Systeme wiesen Unterschiede hinsichtlich Retention der Analyten sowie hinsichtlich der Detektions- und Quantifizierungsgrenzen im NICI-Modus auf. In Präzision und Richtigkeit waren beide Geräte äquivalent. Für Messungen im Spurenbereich wurde aufgrund der höheren Empfindlichkeit im NICI-Modus bevorzugt System 2 eingesetzt.

Folgende Temperatur-Zeitprogramme wurden zur Analyse von Fettsäurederivaten gewählt:

III.4.4.1 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

III.4.4.2 Trennung der PFB-Ester, TMS-Ether der Phytoprostane und der korrespondierenden Methoxime

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

III.4.4.3 Trennung der Methylester der Jasmonsäure

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	100
0.5	-	100
4	20	180
16	10	300
21	-	300

III.4.4.4 Trennung der PFB-Ester der Jasmonsäure

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	100
0.5	-	100
3.5	30	190
11	5	225
12	31	280
16	5	300
26	-	300

III.5 Spektroskopische Methoden

III.5.1 Circulardichroismus

Die in der Arbeit enthaltenen Circulardichroismus-Spektren wurden an einem Jasco J-715 Spectropolarimeter im Arbeitskreis von Herrn Prof. Bringmann (Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Würzburg) durchgeführt.

III.5.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem SSQ 700-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) und an einem GCMate II Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan) vorgenommen. An beiden Geräten war die Detektion im EI-Modus sowie im NICI-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:

	SSQ 700	JMS-GCMate II
Ionenquellentemperatur	150°C	200°C
Elektronenenergie	70 eV	70 eV

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

	SSQ 700	JMS-GCMate II
Ionenquellentemperatur	150°C	200°C
Elektronenenergie	200 eV	200 eV
Reaktandgas	Isobutan	Methan
	Quellendruck 2.0-2.5 x 10 ⁻⁵ Torr	Quellendruck 1 x 10 ⁻⁴ bar

IV. Ergebnisse

PPE₁ und PPF₁ entstehen aus Linolensäure durch radikal-katalysierte Oxidation und konnten bereits *in planta* nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe, dass in pflanzlichen Zellkulturen, die oxidativem Stress (Peroxiden, Schwermetallen) ausgesetzt wurden, der Gehalt an PPE₁ und PPF₁ deutlich zunimmt (Parchmann and Mueller, 1998; Imbusch and Mueller, 2000a, b). Es war jedoch noch ungeklärt, ob die Synthese von Phytoprostanen auch unter weniger drastischen Bedingungen, wie etwa Pflanzen-Pathogen-Interaktionen, induziert werden kann und ob Phytoprostane biologische Aktivitäten besitzen. PPA₁ und PPB₁ erweckten aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Jasmonaten unser besonderes Interesse, da diese potente Signalstoffe sind, die an der Fruchtreifung, Fortpflanzung, Rankenspiralisierung und der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind (Creelman and Mullet, 1997).

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Analysemethoden zu entwickeln, mit deren Hilfe PPA₁ und PPB₁ *in planta* nachgewiesen und quantifiziert werden können. Außerdem sollten PPA₁ und PPB₁ in biologische Testsysteme eingesetzt werden. Für die Bearbeitung beider Aufgaben war es zunächst erforderlich, Phytoprostane herzustellen, um diese als Referenzsubstanzen in der Methodenentwicklung oder in biologischen Testsystemen verwenden zu können. Dazu wurden PPE₁ durch Autoxidation von α -Linolensäure hergestellt. Die E-Ring-Verbindungen konnten dann durch Säure- bzw. Basenkatalyse zu PPA₁ und PPB₁ isomerisiert werden (Abbildung IV.1). Durch diese Reaktionen reduzierte sich die Anzahl der isomeren Strukturen von 16 (PPE₁) auf 8 (PPA₁) bzw. 4 (PPB₁), was die Analytik und die Herstellung der zu testenden Substanzen erheblich vereinfachen sollte.

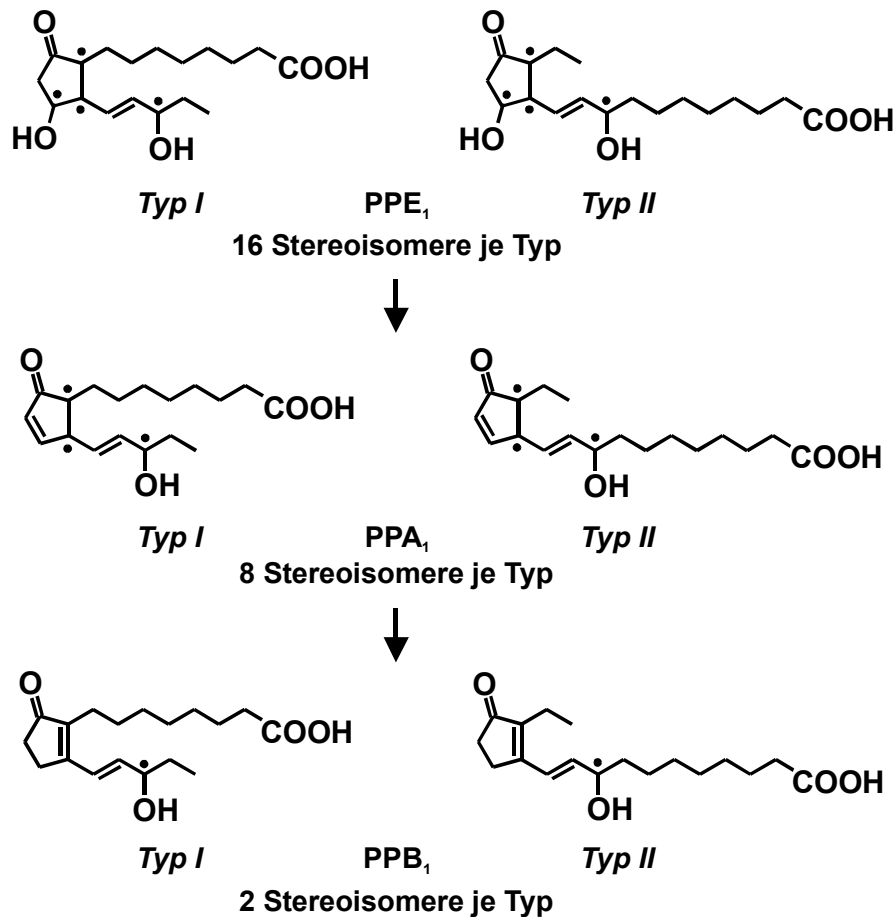


Abbildung IV.1: Syntheseweg von PPE₁ über PPA₁ zu PPB₁ *in vitro*. Die markierten C-Atome stellen Chiralitätszentren dar. Die Anzahl der Stereoisomere der jeweiligen Phytoprostanklasse nimmt mit der Anzahl der chiralen C-Atome von PPE₁ zu PPB₁ hin ab.

IV.1 Herstellung und Isolierung von PPB₁ und PPA₁

PPB₁ waren von Parchmann bereits mittels hochauflösender Massenspektrometrie und NMR charakterisiert worden (1999), eine Charakterisierung von PPA₁ mittels Massenspektrometrie sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden. Zunächst aber wurden PPA₁ und PPB₁ hergestellt. Anschließend wurden Methoden entwickelt, um die Isomerengemische von PPB₁ und PPA₁ aufzutrennen und die so isolierten Regioisomere bzw. Enantiomere zu identifizieren.

IV.1.1 Herstellung und Isolierung von PPB₁-Regioisomeren

PPB₁ wurden wie unter III.1.3 beschrieben hergestellt. Dabei wurden zwei Regioisomere von PPB₁ erhalten, die mittels präparativer HPLC unter folgenden Bedingungen aufgetrennt wurden:

HPLC-Anlage: Präparative HPLC-Anlage, Fa. Knauer
Säule: Lichrosorb (250 x 25 mm, Partikelgröße 10µm, Knauer)
Laufmittel: LM A: Methanol/Wasser/Acetonitril/Essigsäure (35:35:30:0.1 v/v)
LM B: Wasser/Essigsäure (99:0.1 v/v)
Gradient: isokratisch: 56 Teile LM A, 44 Teile LM B
Fluss: 17 ml/min
Detektion: $\lambda=278$ nm
Retentionszeiten: PPB₁ Typ I : 85 min
PPB₁ Typ II : 95 min
Injektionsmenge: 2 mg PPB₁

Abbildung IV.2 zeigt ein charakteristisches RP-HPLC-Chromatogramm eines PPB₁-Gemisches.

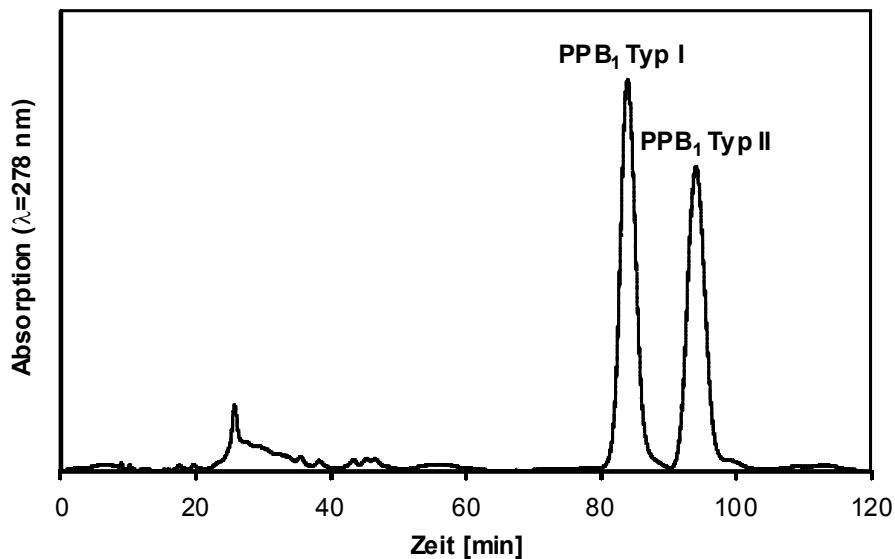


Abbildung IV.2: RP-HPLC-Chromatogramm von PPB₁, die durch basenkatalysierte Dehydratation aus PPE₁ hergestellt wurden. Trennbedingungen siehe Text.

IV. Ergebnisse

Die Fraktionen, in denen PPB₁ eluierten, wurden gesammelt und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen Methanol aufgenommen. Anschließend wurden die Regioisomere mittels GC-MS (III.4.4.1) im EI-Modus (III.5.2) identifiziert, wofür die Regioisomere von PPB₁ methyliert (III.3.3.1) und zum Trimethylsilylether umgesetzt wurden (III.3.3.4). Abbildung IV.3 zeigt die EI-Massenspektren der Derivate von PPB₁ Typ I und Typ II, anhand derer die durch RP-HPLC-Chromatographie isolierten Regioisomere eindeutig identifiziert werden konnten.

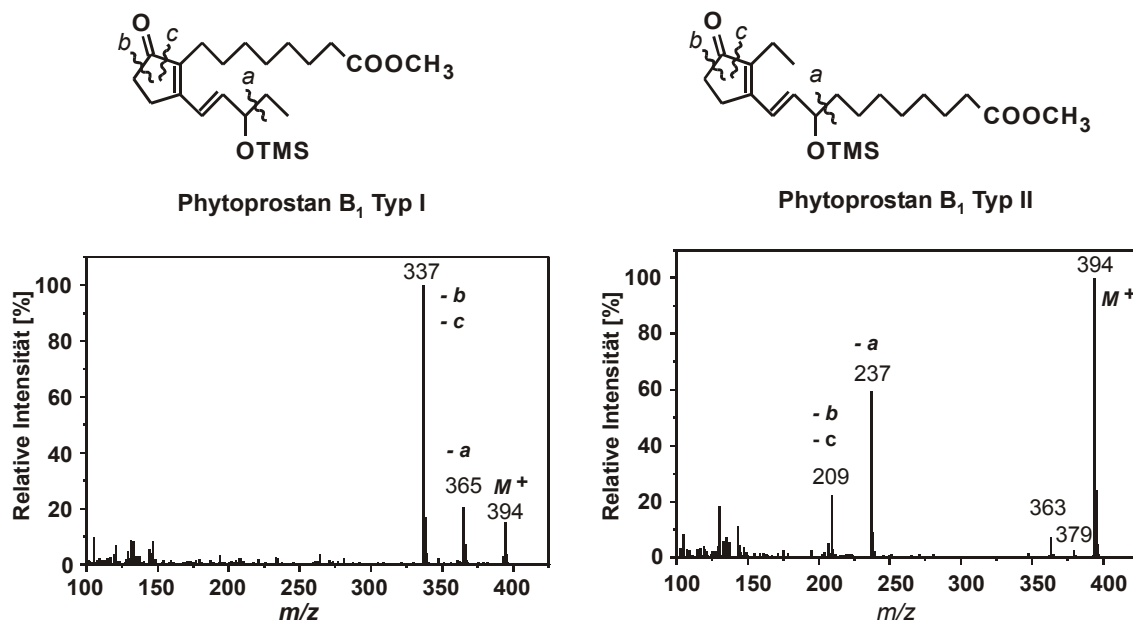


Abbildung IV.3: Zerfallsschemata und EI-Massenspektren von PPB₁ Typ I und Typ II.

Anschließend wurden die Verbindungen per HPLC auf Isomeren-Reinheit überprüft und quantifiziert (III.4.3).

Die so isolierten, reinen Regioisomere standen nun als Referenzsubstanz für die Methodenentwicklung, für den Einsatz in biologischen Testsystemen (IV.4) oder für Untersuchungen zur Genexpression (Thoma et al., 2003b) zur Verfügung.

Die reinen Regioisomere bestehen bei B-Ringverbindungen aus jeweils einem Enantiomerenpaar. Um die Enantiomere ebenfalls in Testsystemen einsetzen zu können, sollten diese Verbindungen auch mittels chromatographischer Methoden getrennt werden.

IV.1.2 Auftrennung der PPB₁-Regioisomere in Enantiomere

Zur Separation der Enantiomerenpaare der beiden Regioisomere wurden PPB₁ mittels HPLC über eine chirale Säule unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen chromatographiert.

HPLC-Anlage:	Analytische HPLC-Anlage, Fa. Merck
Säule:	Chiralpak AD 250 x 2 mm (Daicel Chemical Industries)
Laufmittel:	Hexan/Methanol/Ethanol (8:1:1, v/v)
Fluss:	1 ml/min
Detektion:	$\lambda=278$ nm
Injektionsmenge:	0,2 mg PPB ₁

Bei der Anwendung dieses Systems war es wichtig, dass die Phytoprostane nicht deprotoniert vorlagen, da sonst die Chromatographie durch starke Wechselwirkungen des Anions mit dem Säulenmaterial gestört werden würde. Aus diesem Grund wurde der pH des Laufmittels mit Trifluoressigsäure auf pH 2 eingestellt. Es zeigte sich jedoch, dass trotz dieser Maßnahme die Enantiomere nicht getrennt werden konnten. Durch die Umsetzung von PPB₁ zum Methylester (MePPB₁, III.3.3.1) konnte dieses Problem umgangen werden. Durch Chromatographie der methylierten PPB₁ konnten die Peaks, welche vermutlich die vier Enantiomere repräsentieren, deutlich voneinander getrennt werden (Abbildung IV.4). Die vier Peaks wurden gesammelt und weiter untersucht.

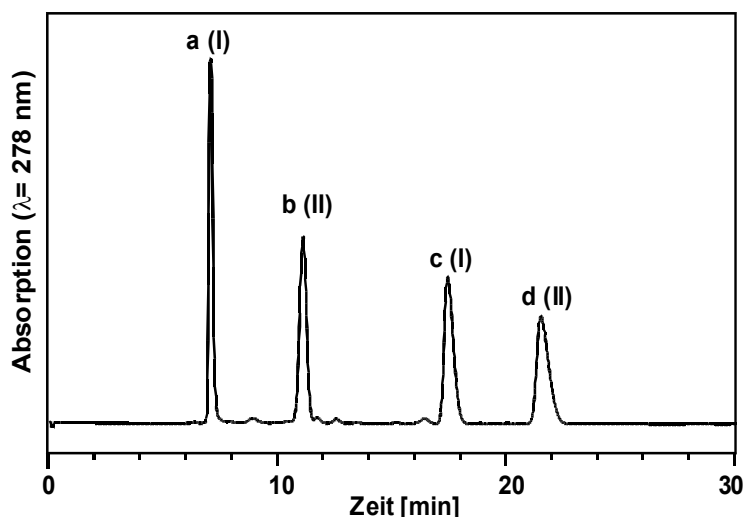


Abbildung IV.4: Chromatogramm von PPB₁ nach Auftrennung über eine chirale Säule.

Die Aufklärung der Regioisomerie der eluierten MePPB₁ erfolgte nach Umsetzung zum TMS-Ether (III.3.3.4) mittels GC-MS im EI-Modus (III.4.4.1, III.5.2). Auf diese Weise konnten die als „a“ und „c“ bezeichneten Verbindungen (Abbildung IV.4, t_R 8 bzw. 18 min)

als Regioisomer Typ I identifiziert werden. Bei den Komponenten „b“ und „d“ (Abbildung IV.2, t_R 11 bzw. 21 min) handelte es sich um Regioisomere vom Typ II.

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration der Enantiomere (Abbildung IV.5) erfolgte eine Analyse mittels Circular dichroismus-Spektrometrie.

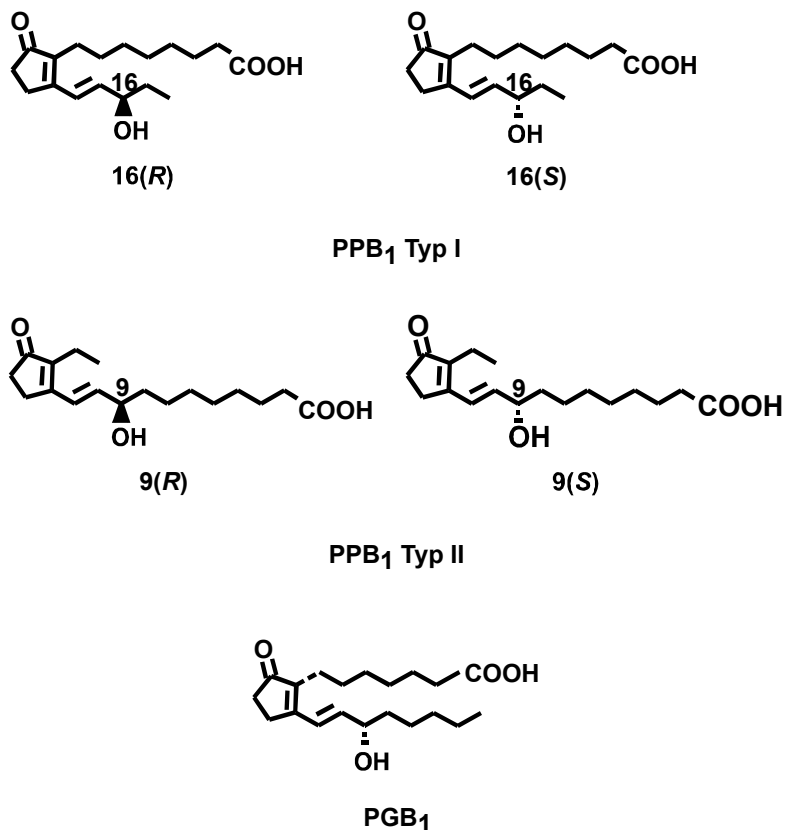


Abbildung IV.5: Strukturen der Enantiomerenpaare von PPB₁ des Typs I und II, sowie der Referenzsubstanz PGB₁.

Die Spektren wurden an einem Jasco J-715 Spectropolarimeter am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Würzburg aufgenommen. Bei dieser Methode macht man es sich zunutze, dass Enantiomere links und rechts circular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren ($\epsilon_L \neq \epsilon_R$). Die Differenz aus den Absorptionskoeffizienten von links und recht circular polarisiertem Licht ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$) nennt man Circular dichroismus (CD). Als Referenz wurde methyliertes PGB₁ (MePGB₁) herangezogen, welches aufgrund seiner enzymatischen Synthese (*S*)-konfiguriert ist. PGB₁ und PPB₁ besitzen identische Chromophore, zudem sind ihre chiralen Zentren – abgesehen von der Konfiguration- gleich. Daher treten (*S*)-konfigurierte PPB₁ mit circular polarisiertem Licht in gleicher Weise in Wechselwirkung wie PGB₁. Die (*S*)-konfigurierten PPB₁-Isomere weisen deshalb ebenso wie (*S*)-PGB₁ einen positiven Cotton-Effekt auf. Die (*R*)-konfigurierten Isomere ergeben spiegelbildliche Spektren (negativer Cotton-Effekt) (Abbildung IV.6). Es handelte sich also bei den mit „a“ und „b“ bezeichneten MePPB₁ um die (*R*)-konfigurierten Isomere, bei den mit „c“ und „d“ bezeichneten MePPB₁ um die (*S*)-konfigurierten Enantiomere.

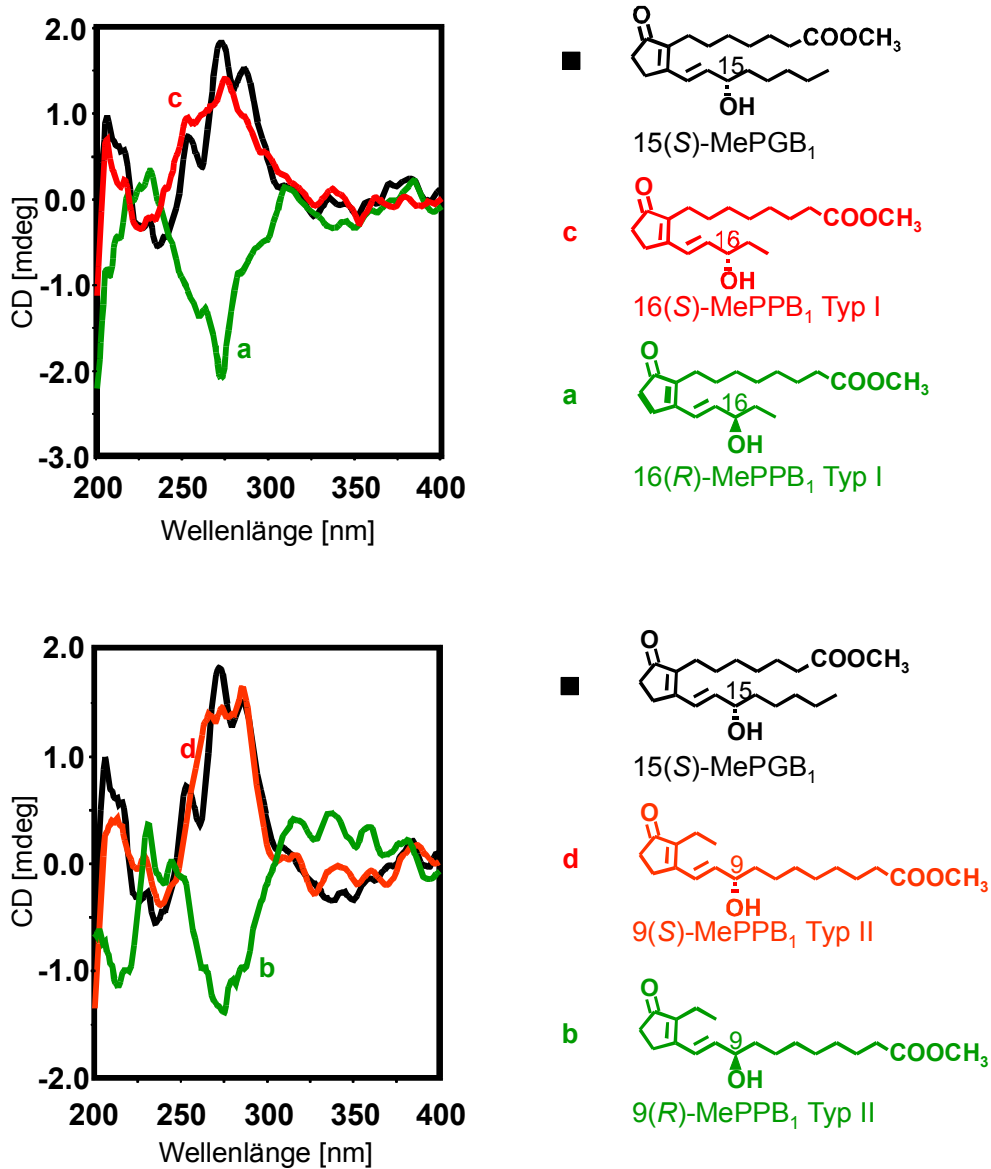


Abbildung IV.6: Circulardichroismus-Spektren von methylierten Enantiomeren von PPB₁. Als Referenz diente methyliertes PGB₁.

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methoden war das PPB₁-Isomerengemisch in Regioisomere und darüber hinaus in Stereoisomere aufgetrennt worden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, in biologischen Testsystemen mögliche spezifische Aktivitäten der einzelnen Isomere zu ermitteln.

IV.1.3 Herstellung und Isolierung der PPA₁-Regioisomere

Analog zur sauren Dehydratisierung von Prostaglandinen können aus PPE₁ durch Säurezugabe die entsprechenden A-Ring-Verbindungen hergestellt werden (III.1.2).

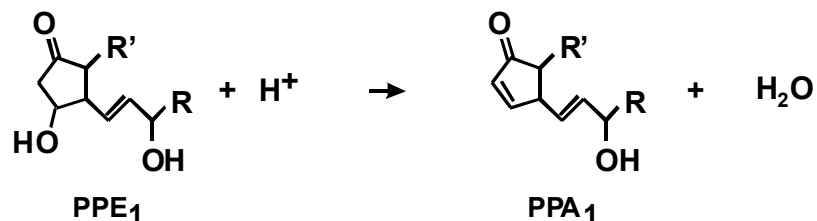


Abbildung IV.7: Dehydratisierung von PPE₁ zu PPA₁ (Typ I: R = C₂H₅, R' = C₇H₁₄COOH; Typ II: R = C₇H₁₄COOH, R' = C₂H₅)

PPA₁ wurden über Festphasenextraktion aufgereinigt, anschließend wurden die Regioisomere über RP-HPLC unter folgenden Bedingungen isoliert:

HPLC-Anlage:	Analytische HPLC-Anlage, Fa. Merck
Säule:	LiChrospher (250 x 8 mm, Partikelgröße 10µm, Knauer)
Laufmittel:	Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (59:26:15:0.1, v/v)
Fluss:	3,5 ml/min
Detektion:	λ=217 nm

Abbildung IV.8 zeigt ein charakteristisches RP-HPLC-Chromatogramm von PPA₁ nach Isolation mittels SPE (III.4.1). Die Fraktionen, die reine Regioisomere enthielten, wurden gesammelt, unter Vakuum eingengt und in Ethylacetat aufgenommen. Nachfolgende Analyse (IV.1.3.1) ergab, dass drei der im Chromatogramm gezeigten Peaks PPA₁ repräsentierten. Vermutlich trennen sich die später eluierten PPA₁ Typ II bereits ansatzweise in die Stereoisomere auf. Die Peaks waren jedoch nicht basislinien-getrennt, so dass diese Auftrennung nicht für eine selektive Isolierung der Stereoisomere genutzt werden konnte. Die Lagerung der gesammelten reinen Regioisomere von PPA₁ erfolgte bei -80°C.

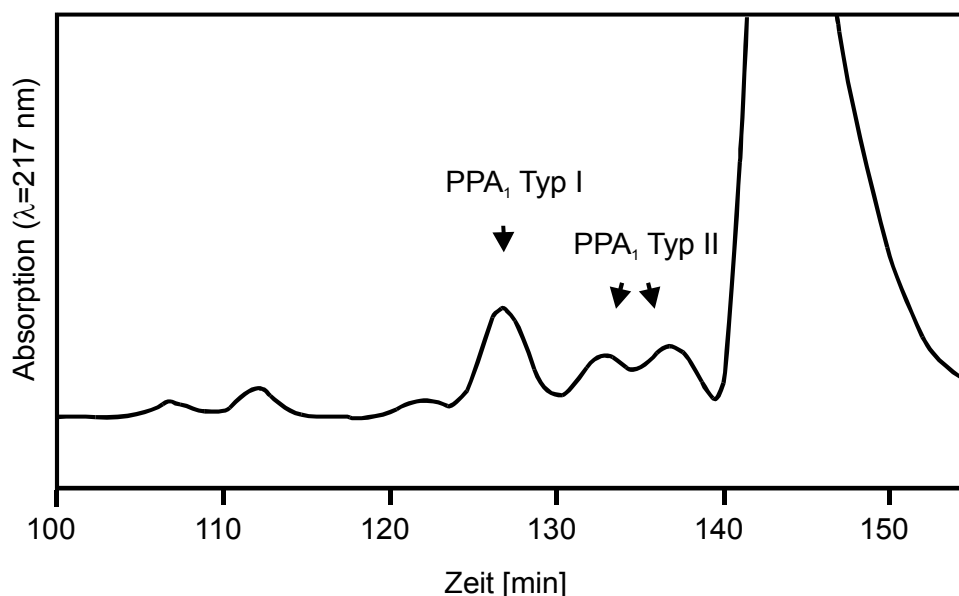


Abbildung IV.8: Präparative HPLC von PPA₁, Trennbedingungen siehe Text

Reine Regioisomere des PPA₁ Typs I und II, die durch RP-HPLC isoliert worden waren (IV.1.3), wurden mit chromatographischen und spektroskopischen Methoden untersucht.

IV.1.3.1 Identifizierung von PPA₁-Regioisomeren mittels HPLC

Eine direkte Charakterisierung von PPA₁ mittels HPLC erwies sich als ungünstig, da zum einen die Empfindlichkeit durch den niedrigen Absorptionskoeffizienten zu gering war, zum anderen die große Anzahl an Isomeren die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erschwerte. PPA₁ lassen sich jedoch durch Zugabe von Lauge in die entsprechende B-Ring-Verbindung überführen. Dabei verringert sich die Anzahl der Stereoisomere auf ein Enantiomerenpaar je Regioisomer. Diese lassen sich durch RP-HPLC unter den in III.4.3 genannten Bedingungen einfacher bestimmen.

Für die Untersuchung wurden 5 µg der isolierten Regioisomere in 100 µl Methanol gelöst und mit 50 µl 1M Kalilauge versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 40°C im Wasserbad wurde der Isomerisierungsansatz mit 2 ml Wasser und 50 µl 1M Citronensäure versetzt und gegen Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 100 µl Methanol/Wasser (1:1, v/v) gelöst, mit 5 µg PGB₁ als Retentionszeitstandard versetzt und wie unter III.4.3 beschrieben per HPLC analysiert. Das erhaltene Chromatogramm zeigt - wie zu erwarten- zwei Peaks, die zeitgleich mit PPB₁ Typ I und Typ II eluierten. Um eine Verunreinigung der isolierten Regioisomere von PPA₁ durch PPB₁ auszuschließen, wurden 5 µl der Regioisomere in 100 µl Methanol/Wasser (1:1, v/v) gelöst und mit 5 µg PGB₁ als Retentionszeitstandard versetzt und keiner Basenbehandlung unterzogen. In der nachfolgenden HPLC-Analyse konnten keine PPB₁ nachgewiesen werden.

IV.1.3.2 GC-MS-Analyse von PPA₁

Sowohl für die Identifizierung als auch für die Quantifizierung von PPA₁ in Konzentrationen im unteren Nanogramm-Bereich wurden massenspektroskopische Methoden eingesetzt.

Zur Identifizierung von PPA₁ wurde der EI-Modus gewählt, da hier charakteristische Fragmente entstehen, die Rückschlüsse auf die Struktur des Analyten zulassen.

PPA₁ Typ I und Typ II wurden nach Methylierung (III.3.3.1) und Silylierung (III.3.3.4) gaschromatographisch aufgetrennt und im EI-Modus analysiert (III.4.4.1, III.5.2). Die Untersuchungen zeigten, dass PPA₁ im Injektor des GC zu 99% zu den stabileren PPB₁ isomerisierten. Die Analyse des verbleibenden Prozents reichte jedoch aus, um aussagekräftige Massenspektren zu erhalten.

Abbildung IV.9 zeigt die EI-Massenspektren von PPA₁ Typ I und Typ II nach Derivatisierung zum Methyl-TMS-Derivat.

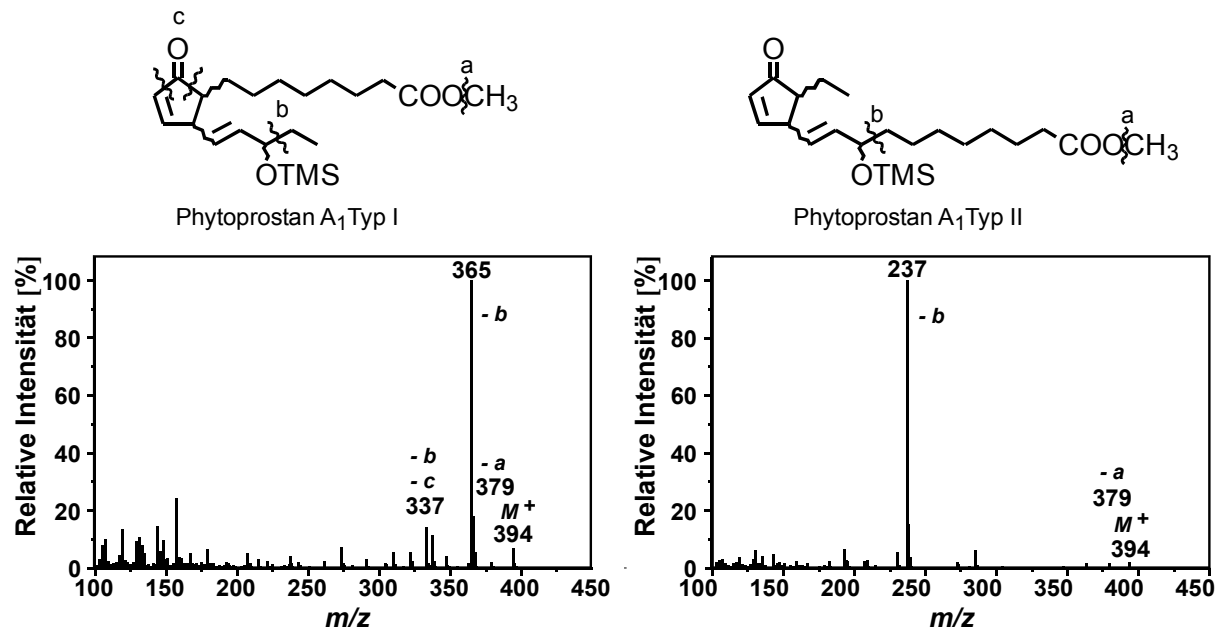


Abbildung IV.9: EI-Massenspektren des PPA₁ Typs I und II

IV. Ergebnisse

Wie oben beschrieben, sind PPA₁ im Injektor des GC instabil und isomerisieren zu PPB₁. An der Umlagerung ist die Ketogruppe des α , β -ungesättigten Ketons beteiligt. Methoximiert man diese funktionelle Gruppe, so wird die Umlagerung der Doppelbindung im Cyclopenten-Ringsystem unterbunden.

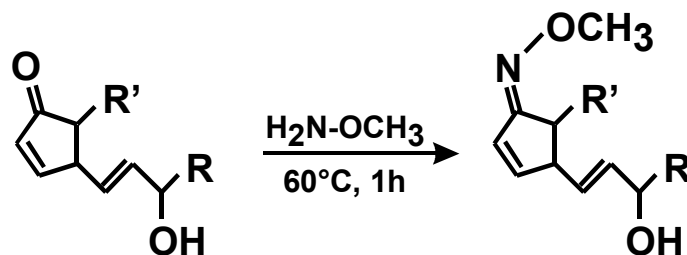


Abbildung IV.10: Methoximierung von PPA₁ (Typ I: R = C₂H₅, R' = C₇H₁₄COOH; Typ II: R = C₇H₁₄COOH, R' = C₂H₅) mit Methoxyamin HCl-Reagenz

Für die Methoximierung wurde 1 μ g PPA₁ mit 50 μ l Methoxyamin HCl-Reagenz (5 mg/100 μ l Dimethylformamid) versetzt und 1 Stunde bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde zur Trockene eingedunstet, in 2 ml Wasser aufgenommen und mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Abbildung IV.11 zeigt die EI-Massenspektren von methoximierten (III.3.3.2.), methylierten (III.3.3.1) und zum TMS-Ether umgesetzten (III.3.3.4) PPA₁ Typ I und II.

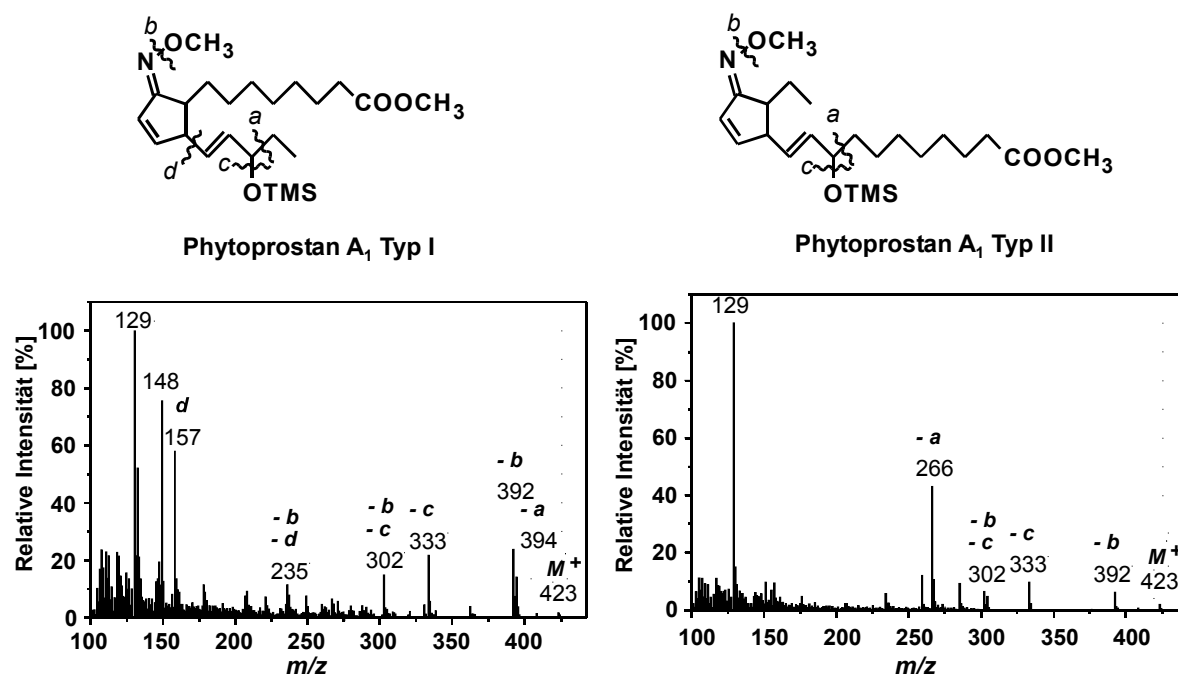


Abbildung IV.11: EI-Massenspektren und Zerfallsschemata von methoximierten PPA₁ Typ I und Typ II.

IV. Ergebnisse

Als Vergleichssubstanz wurden auch methoximierte PPB_1 hergestellt (III.3.3.2). Anschließende GC-MS-Analysen im NICI-Modus zeigten, dass die PPA_1 - und PPB_1 -Derivate gaschromatographisch getrennt werden können (Abbildung IV.12). In einem anschließenden Experiment konnte nach Derivatisierung und Analyse der PPA_1 keine Isomerisierung zu PPB_1 beobachtet werden.

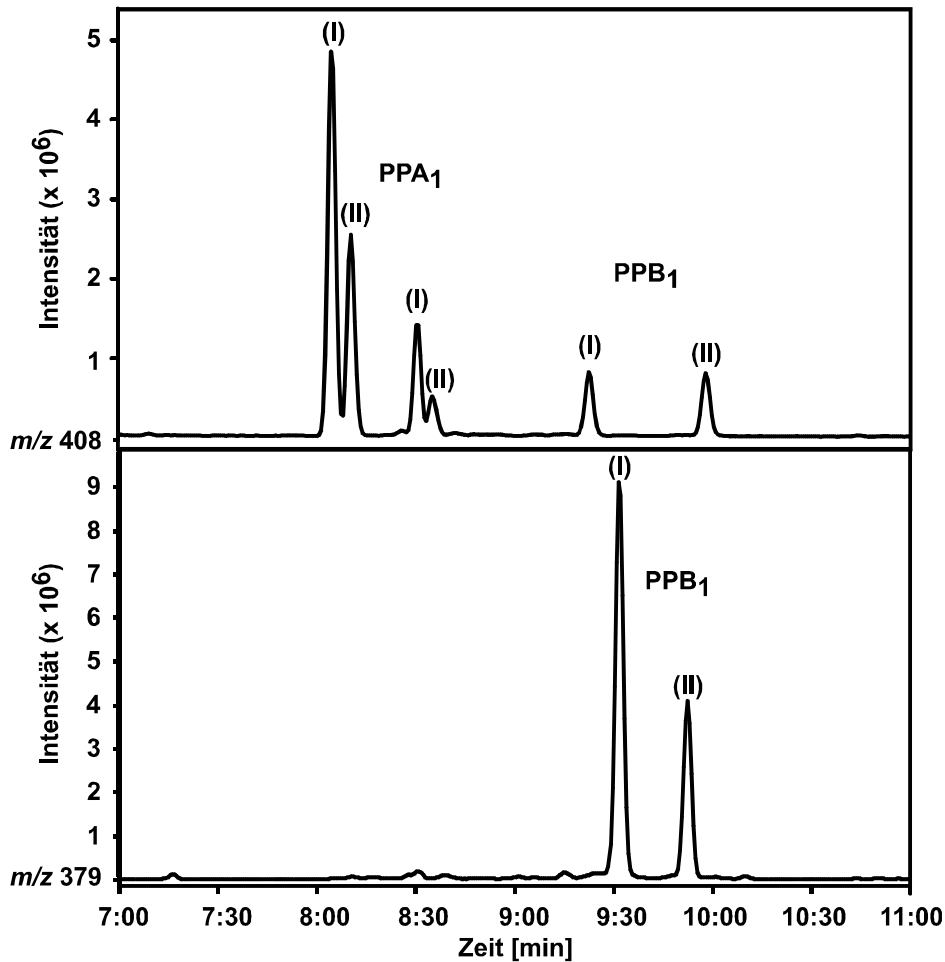


Abbildung IV.12: GC-MS-Chromatogramme (NICI) von PPA_1 - und PPB_1 -Derivaten nach Methoximierung. Bei m/z 408 werden die methoximierten, bei m/z 379 die nicht methoximierten Phytoprostan-Derivate erfasst. Die Bezeichnung über den Peaks gibt den jeweiligen Regioisomeren-Typ an (I oder II).

Durch Vergleich mit den bei 379 m/z erfassten, nicht methoximierten und zu PPB_1 isomerisierten Phytoprostanen ließ sich eine Methoximierungsrate von 60% errechnen. Um die Methoximierungsrate von PPA_1 und PPB_1 zu erhöhen, wurde versucht, Phytoprostane entsprechend Literaturangaben in wässriger Lösung zu derivatisieren (Morrow et al., 1994). Dies führte jedoch zu einer Ausbeute von nur 10%. Ein Versuch in Pyridin als Lösungsmittel ergab für PPB_1 deutlich bessere Ausbeuten. Jedoch konnte hier eine Isomerisierung der PPA_1 zu PPB_1 nicht vollständig verhindert werden.

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob PPA_1 und PPB_1 in gleichem Ausmaß methoximiert werden, da dies eine wichtige Voraussetzung für eine Anwendung dieser

Derivatisierungsmethode für quantitative Bestimmungen ist. Daher wurden 200 ng PPA₁ mit 200 ng PGB₁ als Standard versetzt und dieses Gemisch in zwei Fraktionen aufgeteilt.

Eine Fraktion wurde mit KOH (analog zu III.1.3) behandelt, wodurch PPA₁ zu PPB₁ isomerisierten. Beide Fraktionen wurden dann methoximiert (III.3.3.2), zum PFB-Ester (III.3.3.3) und TMS-Ether (III.3.3.4) umgesetzt und mittels GC-MS im NICI-Modus (III.4.4.2 und III.5.2) analysiert. Das Verhältnis von PPA₁ bzw. PPB₁ zu PGB₁ war im Rahmen der Messgenauigkeit in beiden Fraktionen gleich. Somit können mit der Methoximierungs-Methode PPA₁ und PPB₁ richtig und spezifisch bestimmt werden.

Können PPA₁ und PPB₁ auch ohne Säure- oder Basenkatalyse in Pflanzen entstehen? *In vitro* hatten wir Phytoprostane A₁ und B₁ durch Säure- bzw. Basenkatalyse aus PPE₁ erhalten. PPE₁ dehydratisieren jedoch auch ohne Katalysator zu PPA₁, die ihrerseits auch ohne Katalysator zu PPB₁ isomerisieren können. Dies ist ein immer wiederkehrendes, bekanntes Problem der Prostaglandin-Analytik. Es stellte sich daher zunächst die Frage, ob PPA₁ und PPB₁ auch in Pflanzen gebildet werden, oder Artefakte sind, die bei der Probenvorbereitung aus endogenen PPE₁ entstehen.

IV.2 Isolierung und Quantifizierung von Phytoprostanen *in planta*

IV.2.1 Zeitabhängigkeit der Phytoprostanbildung in getrocknetem Pflanzenmaterial

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Linolensäureautoxidation nicht nur *in vitro*, sondern auch *in planta* stattfindet. Dabei sollte der zeitliche Verlauf einer PPE₁-Akkumulation verfolgt werden, das Vorkommen von PPA₁ und PPB₁ sollte dann in einem späteren Experiment untersucht werden.

Frische Blätter von *Mentha piperita*, einer häufig angewandten Arzneipflanze, wurden lyophilisiert und anschließend gemörsert, um das Ausgangsmaterial für jede Probenahme zu vereinheitlichen. Das so erhaltene Pulver wurde über 198 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Aliquot des Pflanzenmaterials entnommen und der Gehalt an PPE₁ in einer Dreifachbestimmung analysiert (III.3.2). Da die Integration der Peakflächen von PPE₁ Typ I aufgrund einer co-eluierenden Verunreinigung nicht möglich war, wurden nur die Peakflächen von PPE₁ Typ II ausgewertet.

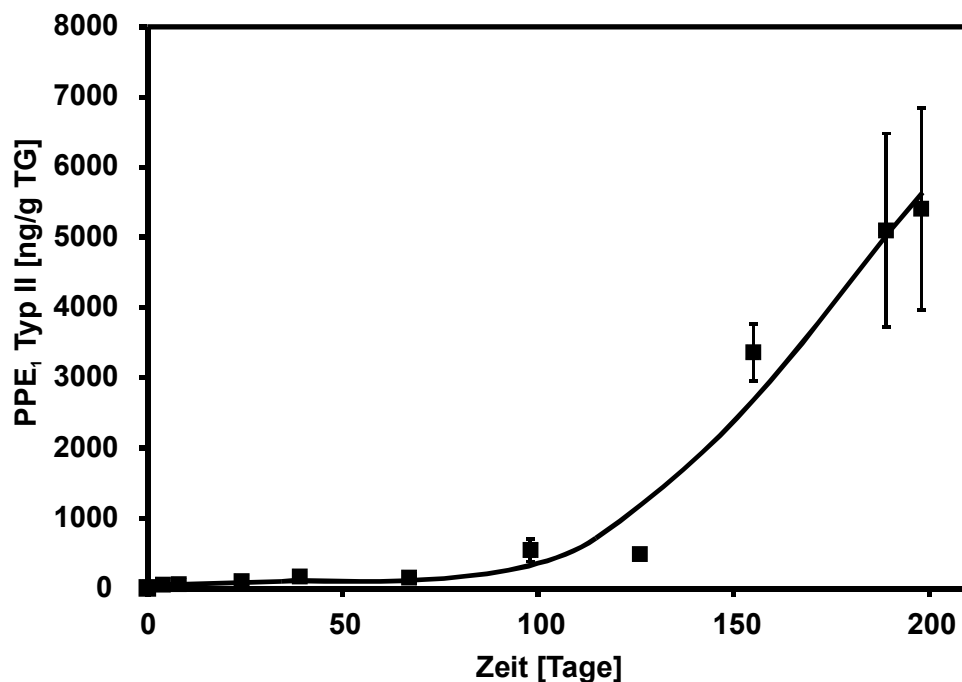


Abbildung IV.13: Zeitlicher Verlauf der PPE₁ Typ II-Konzentration nach Gefriertrocknung und Lagerung von *Mentha piperita*.

In getrockneten Blättern kommt es bei Lagerung zu einem Anstieg der PPE₁ Typ II-Konzentration (Abbildung IV.13). In den ersten 70 Tagen der Lagerung blieb der PPE₁ Typ II-Gehalt in den Blättern fast konstant. Vermutlich verhinderten in dieser Zeit pflanzliche Antioxidantien wie z.B. Glutathion, Vitamin E oder Carotinoide eine Lipidperoxidation, so dass erst nach deren Verbrauch Linolensäure von Radikalen angegriffen werden konnte und

PPE₁ Typ II gebildet wurden. Nach 98 Tagen Lagerung stieg der Gehalt an PPE₁ Typ II exponentiell an.

Aus dem Anstieg der PPE₁-Konzentration kann man Rückschlüsse auf die Autoxidation der Linolensäure in den getrockneten Blättern ziehen, welche in totem Pflanzematerial deutlich langsamer verläuft als *in vitro*. *In vitro* beginnt die Linolensäure-Autoxidation in MeOH/Wasser (1:1, v/v) bereits innerhalb von Stunden (Parchmann, 1999).

Getrocknete Pflanzen sind also vor Autoxidation durch Luftsauerstoff zumindest eine Zeit lang geschützt. In lebenden Pflanzen werden jedoch durch den Stoffwechsel aktiv freie Radikale gebildet, die dem pflanzlichen Oxidationsschutz entgehen und die Bildung von Phytoprostanen katalysieren. PPE₁ wurden daher in jeder bislang untersuchten lebenden Pflanze gefunden (Parchmann and Mueller, 1998). PPA₁ und PPB₁ sollten daher, wenn sie überhaupt gebildet werden, auch in frischen Pflanzen messbar sein.

IV.2.2 Methode zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an PPA₁/PPB₁ lebenden Pflanzen

Um PPA₁ und PPB₁ in pflanzlichem Material nachweisen zu können, wurden zunächst Methoden zur Isolation und Reinigung, sowie zur Quantifizierung dieser Phytoprostane aus pflanzlicher Matrix entwickelt. Dabei erfolgte die Extraktion freier Fettsäuren und Lipide aus frischem Pflanzenmaterial, welche unmittelbar vor der Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und in gefrorenem Zustand in einer Kugelmühle pulverisiert worden waren. Zu 10 g Frischgewicht gab man

- 20 ml gesättigte Kochsalzlösung,
- 400 µl 5% (w/v) BHT in Methanol (Radikalfänger),
- ca. 20 mg TPP (Reduktionsmittel für Hydroperoxide),
- 25 ng [¹⁸O]-PPB₁ Typ I als internen Standard und
- 23 ng [¹⁸O]-PPB₁ Typ II als internen Standard,
- 200 µl 1 M Citronensäure und
- 15 ml Diethylether.

Die Zellen wurden anschließend mit einem Ultra Turrax durch dreiminütiges Dispergieren bei 2400 rpm zerstört und die Lipide gleichzeitig in die Etherphase extrahiert.. Nach 10 min Zentrifugation der Probe bei 2900 x g und 4°C wurde die Etherphase abgenommen und unter einem Stickstoffstrom trockengeblasen. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und einer Festphasenextraktion über Aminopropyl-Material unterzogen (III.4.1).

Dazu wurde der Etherextrakt unter leichtem Vakuum auf eine zuvor mit Diethylether equilibrierte Aminopropyl-SPE-Säule appliziert. Die Säule wurde mit 5 ml Chloroform/Isopropanol (2:1, v/v) gewaschen, wodurch die meisten in Ether löslichen Kontaminanten wie Chlorophyll, Fettsäureester und Sekundärmetaboliten abgetrennt wurden. PPA₁ und PPB₁ wurden anschließend mit 7 ml Diethylether/Essigsäure 98:2 (v/v) eluiert. Die Elution beruht zum einen auf der Verdrängung organischer Säuren von den Aminopropylgruppen des Säulenmaterials durch die im Eluenten enthaltene Essigsäure.

Darüber hinaus hat die Polarität des Eluenten Einfluss auf die Wechselwirkungen von Phytoprostanen mit dem Säulenmaterial. PPE₁ verblieben unter den beschriebenen Bedingungen auf der Säule und wurden quantitativ von PPA₁ und PPB₁ abgetrennt. Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Der Extrakt von Aufarbeitungen frischer Pflanzenorgane enthielt wesentlich mehr Sekundärstoffe als Extrakte von Zellkulturen. Daher wurde der Etherextrakt von Pflanzenorganen auf 4 NH₂-Säulen verteilt. Dadurch wurde eine Überladung der Säulen vermieden und somit einer unzureichenden Abtrennung von Verunreinigungen vorgebeugt.

Nach der Aufreinigung über Aminopropyl-SPE war eine zweite Festphasenextraktion notwendig, die an SiOH-Material als stationärer Phase durchgeführt wurde. Hierfür wurde das getrocknete Eluat der NH₂-SPE in Chloroform aufgenommen, auf eine mit Chloroform equilibrierte SiOH-SPE-Säule gegeben und mit weiteren 5 ml Chloroform gewaschen. Die Elution der PPA₁/B₁ erfolgte mit Diethylether/Essigsäure 98:2 (v/v). Anschließend wurde das Eluat unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Für die Analyse mittels GC-MS wurden die so isolierten Phytoprostane zu flüchtigen PFB-Estern und TMS-Ethern derivatisiert (III.3.3.3 und III.3.3.4). Durch die Veresterung mit PFB-Bromid zerfallen die Derivate im MS zu Anionen, welche im NICI-Modus gemessen werden können. Die meisten Verunreinigungen hingegen zerfallen im MS zu Kationen und werden so im NICI-Modus nicht erfasst, was die Selektivität der Methode erheblich erhöht.

Der Rückstand der Derivatisierungsreaktion wurde zur Reinigung von Nebenprodukten der PFB-Veresterung in 3 ml Hexan aufgenommen und unter schwachem Vakuum auf eine SiOH-SPE-Säule aufgebracht. Die PFB-TMS-Derivate der Phytoprostane wurden sofort mit 7 ml Hexan/Ether 2:1 (v/v) eluiert und das Eluat unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 10 µl Hexan gelöst. Anschließend wurden 5 µl dieser Lösung über GC-MS im NICI-Modus analysiert (III.4.4.2 und III.5.2).

PPA₁ sind bei hohen Temperaturen instabil und isomerisieren im Injektor des GC-MS zu PPB₁. Daher wurden PPA₁ und PPB₁ bei der nachfolgenden Analyse gemeinsam als PPB₁ erfasst. Abbildung IV.14 zeigt ein charakteristisches GC-MS-Chromatogramm von *Lycopersicon esculentum* var. Moneymaker nach Aufarbeitung und anschließender Analyse. Bei 381 *m/z* (B) wurde der interne Standard ¹⁸O-PPB₁ detektiert. Zeitgleich eluierten bei 379 *m/z* (A) derivatisierte PPB₁. Sie repräsentieren den Gehalt an PPA₁ und PPB₁ in der Pflanze.

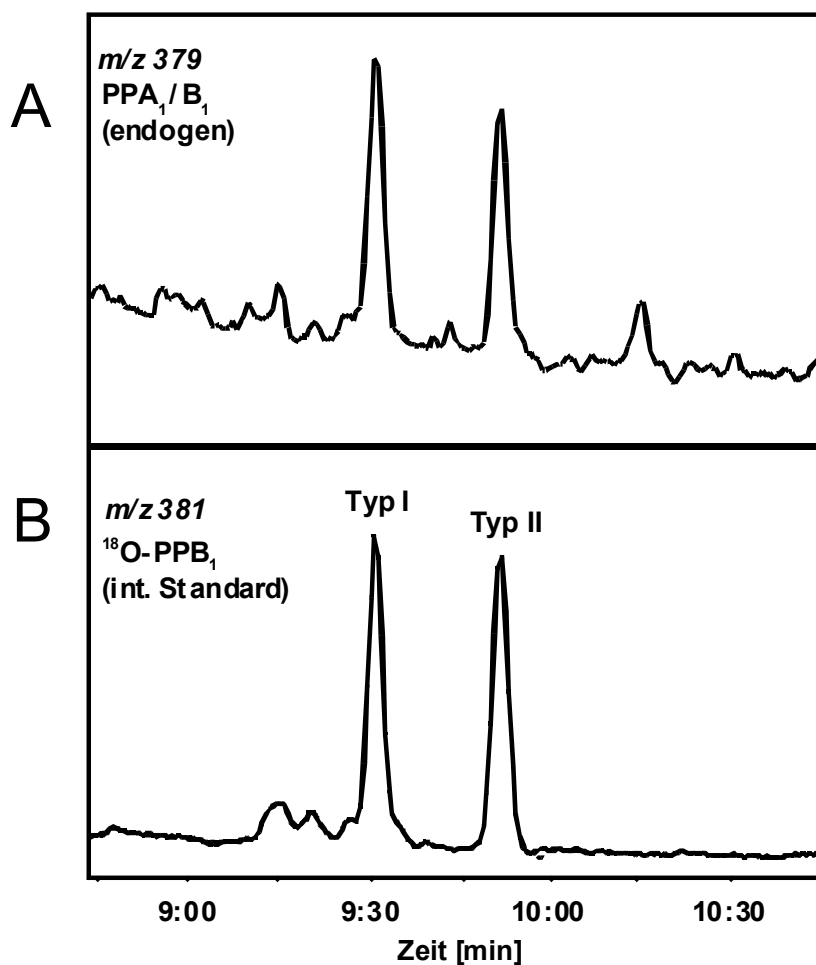


Abbildung IV.14: GC-MS-Chromatogramme (NICI) eines Extrakts von *L. esculentum*: (B) zeigt die Einzelionendetektion von ¹⁸O-markierten PPB₁ [interner Standard, (M-PFB)⁻ = *m/z* 381] und (A) die Einzelionendetektion von PPB₁ [(M-PFB)⁻ = *m/z* 379], die den endogenen Gehalt an PPA₁ und PPB₁ repräsentieren.

Um die quantitative Erfassung von PPA₁ mit oben beschriebener Methode zu bestätigen, musste überprüft werden, ob PPA₁ durch die Aufarbeitung gegenüber PPB₁ diskriminiert werden und ob PPA₁ im Injektor vollständig zu PPB₁ isomerisieren. Hierfür wurden je 200 ng PPA₁ Typ I und Typ II mit 200 ng ¹⁸O-PPB₁ als internem Standard versetzt und diese Mischungen in zwei Fraktionen geteilt. Die erste Fraktion wurde nach oben beschriebener Methode aufgearbeitet und analysiert. Dabei sollten PPA₁ während der Aufarbeitung stabil bleiben, im Injektor jedoch vollständig zu PPB₁ isomerisieren.

Die zweite Fraktion wurde mit 50 µl 1M KOH versetzt und 15 Minuten bei 40°C im Wasserbad inkubiert, so dass in diesem Ansatz PPA₁ vor der Aufreinigung in PPB₁ überführt wurden. Die entstandenen PPB₁ wurden mit 25 ml Kochsalzlösung versetzt und nach der beschriebenen Methode weiter aufgearbeitet. Sollte eine der beiden Phytoprostanklassen, A oder B, im Laufe der Aufarbeitung diskriminiert werden, würde in den beiden Fraktionen das Verhältnis von PPB₁ zum internen Standard ¹⁸O-PPB₁ differieren.

Die Analyse mittels GC-MS ergab für beide Fraktionen identische Chromatogramme. Das Verhältnis der Peakflächen von PPB₁ Typ I und ¹⁸O-PPB₁ Typ I war bei beiden Analysen identisch, ebenso wie das Verhältnis der Peakflächen der Regioisomere II.

Es konnte also gezeigt werden, dass PPA₁ im Laufe der Aufarbeitung und Analyse zu PPB₁ isomerisieren und quantitativ als PPB₁ erfasst werden.

In einem weiteren Validierungsschritt sollte die Erfassung von PPE₁ überprüft werden, da PPE₁ unter bestimmten Bedingungen ebenfalls zu PPB₁ isomerisieren. Der Gehalt an PPE₁ *in planta* liegt um etwa 1 Zehnerpotenz über dem Gehalt an PPB₁ (IV.2.5). Bereits die Detektion eines geringen Anteils an PPE₁ würde die PPA₁/B₁-Analyse erheblich verfälschen. Daher sollte hier die komplette Abtrennung von PPE₁ von PPA₁/B₁ mit oben beschriebener Methode bestätigt werden. Hierfür wurden in einem dreifachen Ansatz 1000 ng PPE₁ mit 200 ng PGB₁ als internem Standard versetzt und die Mischung in zwei Fraktionen geteilt. Die erste Fraktion wurde nach oben beschriebener Methode aufgearbeitet und per GC-MS im NICI-Modus analysiert. Die zweite Fraktion wurde vor der Aufarbeitung mit KOH versetzt, dann aufgearbeitet und analysiert (analog zur ersten Fraktion). Es konnten in der ersten Fraktion keine PPB₁ nachgewiesen werden, wohingegen in der zweiten Fraktion PPE₁ als PPB₁ wiedergefunden wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass PPE₁ unter den genannten Bedingungen nicht erfasst werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die PPE₁ bereits durch die Festphasenextraktion an Aminopropyl-Material quantitativ abgetrennt werden.

IV.2.3 Gemeinsame Bestimmung von PPA₁/PPB₁ in Frischpflanzen und Zellkulturen

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, eine Übersicht über das Vorkommen von PPA₁/B₁ in taxonomisch entfernten Pflanzenspezies zu gewinnen. Die Identifizierung und Quantifizierung von PPA₁ und PPB₁ in lebenden Pflanzenzellen erfolgte durch Analyse von frischen Pflanzenorganen (Blätter) und einer pflanzlichen Zellsuspensionskultur. Die Zellkultur entstammte der lehrstuhleigenen Sammlung und wurde durch Filtration über einen Büchnertrichter mit Nylonnetz unter leichtem Vakuum geerntet (II.1.1). Die Blätter stammten aus Wildsammlungen in Würzburg oder von Gewächshauskulturen der Julius-Maximilians-Universität (II.1.2) Etwa 10 g der Zellkultur bzw. der Pflanzenteile wurden unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dadurch sollte eine mögliche Phytoprostan-Bildung während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden. Die Pflanzenorgane wurden in gefrorenem Zustand in einer gekühlten Mühle pulverisiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial nach der in IV.2.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels GC-MS analysiert (III.4.4.2 und III.5.2). Tabelle IV.1 zeigt die Resultate der Untersuchung von Blättern und einer Zellkultur.

IV. Ergebnisse

	PPA ₁ /PPB ₁ [ng/g Trockengewicht]	
	Typ I	Typ II
<i>Arabidopsis thaliana</i>	62.9 ± 11.5	68.4 ± 11.8
<i>Betula pendula</i>	8.9 ± 4.4	5.8 ± 1.0
<i>Nicotiana tabacum</i>	24.8 ± 9.6	28.4 ± 12.8
<i>Lycopersicon esculentum</i>	11.2 ± 5.7	5.7 ± 2.3
<i>Tilia cordata</i>	10.4 ± 1.9	8.3 ± 2.4
<i>Salix alba</i>	5.9 ± 2.7	4.7 ± 2.3
<i>Rauvolfia serpentina</i> (Zellkultur)	9.6 ± 1.8	10.9 ± 2.1

Tabelle IV.1: PPA₁/PPB₁-Konzentration in Blättern verschiedener Pflanzenspezies und in einer Zellkultur. Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte ± SD, (n= 3 bis 6).

PPA₁/B₁ Regioisomer I und Regioisomer II lagen in den untersuchten Pflanzenmaterialien in etwa gleichen Mengen vor. Dabei lag der Gehalt an PPA₁/PPB₁ in den Blättern zwischen 5,9 und 62,9 ng/g TG für Typ I und zwischen 4,7 bis 68 ng/g TG für Typ II. In getrocknetem Pflanzenmaterial waren Konzentrationen an PPA₁/PPB₁ zwischen 391 und 1166 ng/g TG für Typ I und 531 und 1874 ng/g TG für Typ II gemessen worden (Parchmann and Mueller, 1998; Parchmann, 1999) Demzufolge ist der Gehalt an PPA₁/B₁ in getrockneten und gelagerten Pflanzenteilen um ca. 2 Zehnerpotenzen höher als in frischen Pflanzen. In dem untersuchten getrockneten Pflanzenmaterial waren endogene Antioxidantien möglicherweise aufgebraucht, so dass die Oxidation ungehindert fortschreiten konnte. Darüberhinaus könnten Phytoprostane in intakten Pflanzen metabolisiert werden. In getrockneten Pflanzenteilen ist ein enzymatischer Abbau von Phytoprostanen unwahrscheinlich. In Kapitel IV.2.6 wird auf den Abbau von PPB₁ in pflanzlichen Zellkulturen näher eingegangen.

IV.2.4 Methode zum separaten Nachweis von PPA₁ und PPB₁

Mit dem oben beschriebenen Verfahren (IV.2.2) zur Quantifizierung von PPA₁ und PPB₁ aus Pflanzenmaterial wurden PPA₁ und PPB₁ gemeinsam als PPB₁ erfasst und gegen ¹⁸O-PPB₁ als internem Standard quantifiziert. Um PPA₁ und PPB₁ getrennt zu erfassen, sollte durch Methoximierung der Ketogruppe im Cyclopentenon-Ringsystem die Isomerisierung von PPA₁ zu PPB₁ unterbunden werden (IV.1.3.2). Ein erster Vorversuch mit ¹⁸O-PPB₁ zeigte jedoch, dass der Einsatz des bisher verwendeten ¹⁸O-Standards nicht möglich war. Die Isotopenmarkierung ging während der Methoximierung mit einer Austauschrate von 6-24% verloren. Allerdings konnte nach Methoximierung das Verhältnis PPA₁ zu PPB₁ bestimmt werden. In Kombination mit dem Ergebnis aus der Bestimmung des Gesamtgehaltes an PPA₁ und PPB₁ könnte dann der Gehalt an PPA₁ und PPB₁ errechnet werden.

Für die Bestimmung des Verhältnisses von PPA₁ zu PPB₁ in Pflanzen wurde die unter IV.2.2 beschriebene Aufreinigungsmethode wie nachfolgend beschrieben variiert. Diese

Modifizierung war notwendig, da bei der Methoximierung nur eine Ausbeute von etwa 60% erreicht wurde (IV.1.3.2), wodurch die Empfindlichkeit der Methode deutlich sank. Um PPA₁ trotzdem analysieren zu können, war es notwendig, die Menge an eingesetztem Pflanzenmaterial zu vervierfachen. Diese erhöhte Menge an Ausgangsmaterial zog eine stärkere Verunreinigung des Extraktes mit Begleitstoffen nach sich. Daher wurde die Festphasenextraktion an Silica-Material durch präparative Dünnschichtchromatographie ersetzt. Hierfür wurde der über Aminopropyl-SPE vorgereinigte Extrakt (IV.2.2) auf eine DC-Platte aufgetragen und in Diethylether/Essigsäure 98:2 (v/v) entwickelt. Als Rf-Standard dienten 5 µg PPB₁, die auf einer separaten DC Platte chromatographiert wurden, um eine Kontamination des Pflanzenextraktes mit dem Rf-Standard zu vermeiden. Die Detektion des Rf-Standards erfolgte im UV-Licht (254 nm), die Menge der in dem Extrakt enthaltenen PPA₁ und PPB₁ lag unterhalb der Nachweisgrenze. Anhand des Rf-Standards wurde ermittelt, in welcher Rf-Region die Phytoprostane chromatographiert worden waren und die entsprechende Region ausgekratzt. Anschließend wurde das Silica-Material in Methanol aufgeschlämmt, über Glasfaserfilter (Whatman) filtriert und das Filtrat unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Es folgte die Derivatisierung der Phytoprostane zum Methoxim (III.3.3.2), PFB-Ester (III.3.3.3) und TMS-Ether (III.3.3.4). Die Analyse mittels GC-MS wurde unter den Bedingungen durchgeführt, die bereits für die Analyse der PFB-Ester und TMS-Ether der Phytoprostane etabliert worden waren (III.4.4.2 und III.5.2). Abbildung IV.15 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm von PPA₁- und PPB₁-Derivaten nach oben beschriebener Aufarbeitung und Analyse. Bei 379 *m/z* wurde der Teil an PPA₁ und PPB₁ erfasst, der nicht methoximiert vorlag. Da die PPA₁ unter den GC-Bedingungen zu PPB₁ isomerisieren, wurden hier nur PPB₁ Typ I und Typ II detektiert.

Bei 408 *m/z* wurden methoximierte PPA₁- und PPB₁-Derivate nach chromatographischer Auftrennung erfasst. Die Zuordnung der Regioisomere erfolgte durch Analyse von reinen Regioisomeren als externe Retentionszeitstandards.

Eine Bildung von PPA₁ und PPB₁ aus PPE₁ während der Aufarbeitung war durch Validierung der Methode zur Bestimmung des Gesamtgehaltes von PPA₁/PPB₁ ausgeschlossen worden (IV.2.2). Um zu überprüfen, ob PPA₁ durch alkalische Bedingungen auf der NH₂-SPE-Säule zu PPB₁ isomerisieren, wurde folgender Versuch durchgeführt: 1 µg PPA₁ und 100 ng PGA₁ als Standard wurden gemischt und entsprechend der Aufreinigungsmethode einer NH₂-Festphasenextraktion unterzogen. Die eluierten Verbindungen wurden methoximiert und zum PFB-Ester und TMS-Ether umgesetzt. In der nachfolgenden GC-MS-Analyse konnten keine PPB₁ nachgewiesen werden.

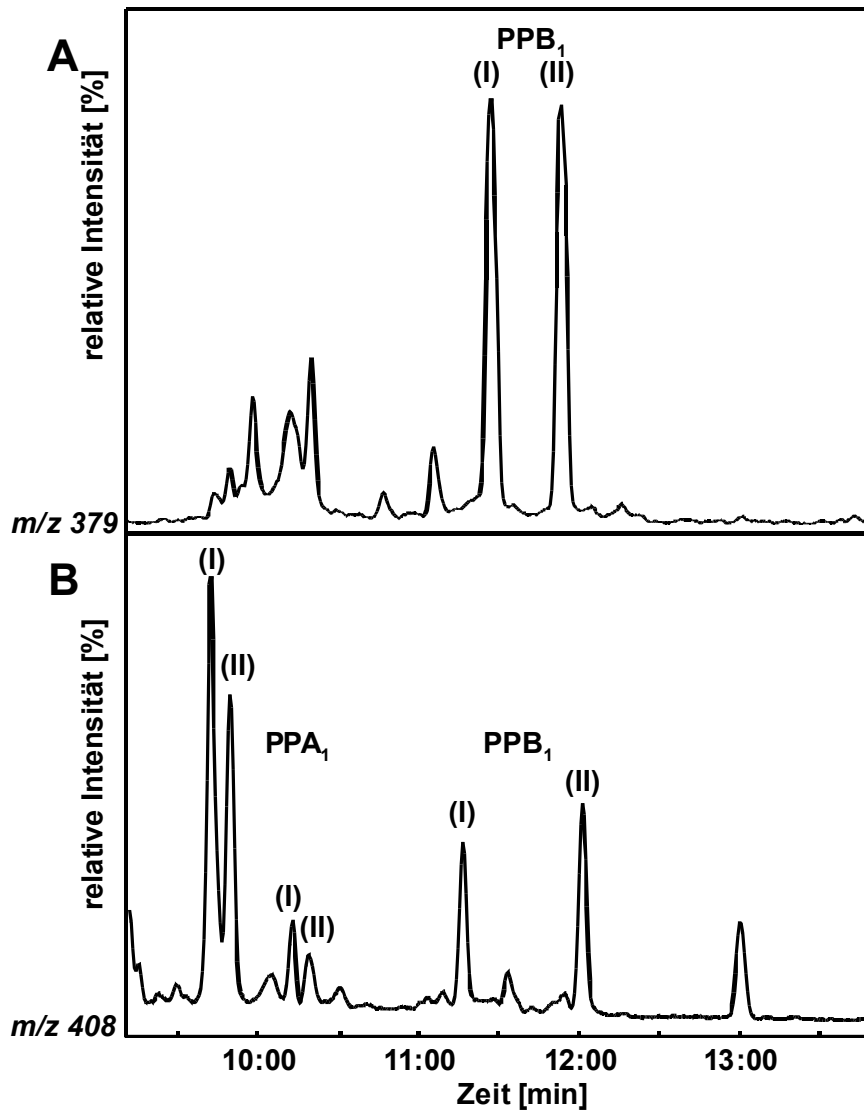


Abbildung IV.15: GC-MS-Chromatogramme (NICI) eines Pflanzenextraktes von *L. esculentum*. (A): Einzelionendetektion bei 379 m/z des nicht methoximierten Anteils, (B): Einzelionendetektion bei 408 m/z der methoximierten PPA₁- und PPB₁-Derivate.

Mit Hilfe dieser Methode konnte erstmals das Vorkommen sowohl von PPA₁, als auch von PPB₁ in Frischpflanzen gezeigt werden. Zwar konnten PPA₁ durch dieses Verfahren nicht unabhängig von PPB₁ quantifiziert werden, jedoch konnte das Verhältnis von PPA₁ zu PPB₁ bestimmt werden.

IV.2.5 Selektiver Nachweis von PPA₁ und PPB₁

Der selektive Nachweis von PPA₁ und PPB₁ wurde exemplarisch in *N. tabacum* und *L. esculentum* durchgeführt. Zuvor war Pflanzenmaterial unter anderem dieser beiden Spezies bezüglich des gesamten Gehaltes an PPA₁/PPB₁ untersucht und quantifiziert worden. Dabei wurde in *L. esculentum* eine Konzentration von $11,2 \pm 5,7$ ng/g TG für PPA₁/B₁ Typ I und $5,7 \pm 2,3$ ng/g TG für Typ II gefunden, in *N. tabacum* ein Gehalt von $24,8 \pm 9,6$ ng/g TG für Typ I und $28,4 \pm 21,8$ ng/g TG für Typ II ermittelt (IV.2.3). In einem nächsten Schritt sollte das Verhältnis von PPA₁ zu PPB₁ bestimmt werden, um dann den jeweiligen Gehalt an PPA₁ und PPB₁ errechnen zu können.

Dazu wurden 40 g frisches Blattmaterial geerntet und sofort schockgefroren. Danach wurden die Blattstücke in einer gekühlten Kugelmühle in gefrorenem Zustand pulverisiert. Die Extraktion und Analyse erfolgte wie unter IV.2.4 beschrieben. Das Verhältnis von PPA₁ zu PPB₁ betrug in *L. esculentum* 73,64 : 26,36% (SD 0,043, n=3), in *N. tabacum* 69,59 : 30,41% (SD 0,027, n=3).

Die Resultate aus beiden Analyseschritten wurden für die Berechnung des Gehaltes an PPA₁ und PPB₁ herangezogen und die Ergebnisse in Tabelle IV.2 zusammengestellt. Zusätzlich wurde der Gehalt an PPE₁ und Jasmonsäure in demselben Pflanzenmaterial ermittelt (III.3.2, III.4.4.2 und III.3.1, III.4.4.4). Ein Vergleich mit Jasmonsäure ist deshalb interessant, da diese einen potenten Signalstoff der pflanzlichen Abwehr darstellt und strukturell mit den Phytoprostanen verwandt ist (siehe I.2.1)

		<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>Nicotiana tabacum</i>	
		Typ I	Typ II	Typ I	Typ II
PPE ₁	[ng/g TG]	$35,5 \pm 4,5$	$35,1 \pm 13,0$	nicht bestimmt	
PPA ₁	[ng/g TG]	$8,3 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1$	$17,2 \pm 0,3$	$19,7 \pm 0,4$
PPB ₁	[ng/g TG]	$3,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,4$
Jasmonsäure	[ng/g TG]	$22,3 \pm 14,0$		nicht bestimmt	

Tabelle IV.2: Gehalt an Phytoprostanen E₁, A₁ und B₁ und Jasmonsäure in *L. esculentum* und *N. tabacum*.

Für PPE₁ und deren Metaboliten PPA₁ und PPB₁ wurden in *L. esculentum* etwa 70 ng/g TG PPE₁, ca. 12 ng/g TG PPA₁ und 4,5 ng/g TG PPB₁ gefunden. Die Konzentration von Jasmonsäure (22 ng/g TG) lag in der untersuchten Tomatenpflanze in der gleichen Größenordnung, wie die der Phytoprostane.

IV.2.6 Abbau von PPB₁ in Zellkultur von *Eschscholtzia californica*

Ein Vergleich der Konzentrationen von PPA₁/PPB₁ in frischem Pflanzenmaterial (IV.2.3) mit dem Gehalt in Tee-Drogen (Parchmann, 1999) zeigte, dass PPA₁/PPB₁ in totem Material deutlich stärker akkumulieren als in Frischpflanzen. Das bedeutet, dass die Phytoprostan-Akkumulation in frischen Pflanzen begrenzt wird. Dies könnte durch die Bereitstellung von Radikalfängern, aber auch durch Metabolismus von PPA₁/PPB₁ erfolgen. Um einen möglichen Abbau von PPB₁ in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde folgender Versuch in 24-Loch-Multischalen (III.2.2.1) durchgeführt:

Von einer drei Tage alten Zellkultur von *E. californica* (Papaveraceae) wurden 8 g in 80 ml LS-Medium eingewogen und 3 Tage unter Schütteln bei standardisierten Bedingungen (21°C, 80 rpm) angezogen. Je 1 ml der Zellkultur wurde in die Näpfe der Multischale überführt und mit PPB₁ Typ I bzw. Typ II in einer Endkonzentration von 100 µM (entspricht 30,8 µg/ml) versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurde der Inhalt eines Napfes entnommen und die Zellen bei 2900 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen für weitere Untersuchungen aufbewahrt (siehe unten). Um den Gehalt an PPB₁ im Medium zu ermitteln, wurde der Überstand mit Citronensäure angesäuert (pH 3-4) und zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol/Wasser (1:1, v/v) aufgenommen und der Gehalt an PPB₁ mittels RP-HPLC (III.4.3) analysiert. Der Verlauf der Konzentrationsabnahme von PPB₁ im Medium innerhalb von 9 Stunden ist in Abbildung IV.16 A dargestellt.

Es war deutlich zu erkennen, dass die Konzentrationen von PPB₁ Typ I und Typ II im Zellkulturmedium innerhalb von 2 Stunden exponentiell abnehmen und nach 4 Stunden einen Wert von etwa 0,5 µg/ml Zellkultur für Typ I und 0,2 µg/ml Zellkultur für Typ II erreicht hatten.

Als Kontrolle wurden PPB₁ in einer Endkonzentration von 100 µM zu reinem LS-Medium gegeben und ebenfalls über 9 Stunden inkubiert. Danach wurden die Phytoprostane wie oben beschrieben aus dem Medium extrahiert und analysiert. Die Wiederfindung von PPB₁ lag bei 97%. Die Abnahme der PPB₁-Konzentration im Medium des Versuchansatzes ist also an die Anwesenheit von Zellen gebunden. Die folgende Untersuchung der zellulären Fraktion sollte einen Hinweis darauf geben, ob PPB₁ lediglich in die Zellen aufgenommen oder abgebaut worden waren.

Die nach Zentrifugation in obiger Versuchsreihe abgetrennten Zellen wurden zweimal mit frischem Medium gewaschen um Reste von Phytoprostan-haltigem Medium zu entfernen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zusatz von 1 ml salzsaurem Ethanol (80%, 0,18% HCl konz.) wurden die Zellen 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad aufgeschlossen und die löslichen Bestandteile extrahiert. Die zellulären Partikel wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol (50%, v/v) aufgenommen. Anschließend wurden PPB₁ quantifiziert (III.4.3). Um die

Konzentration von PPB₁ in der zellulären Fraktion mit der im Medium vergleichen zu können, wurden die errechneten Mengen an PPB₁ auf das Volumen der Zellkultur bezogen. Der Verlauf der Konzentrationsabnahme von zellassozierten PPB₁ ist in Abbildung IV.16B dargestellt.

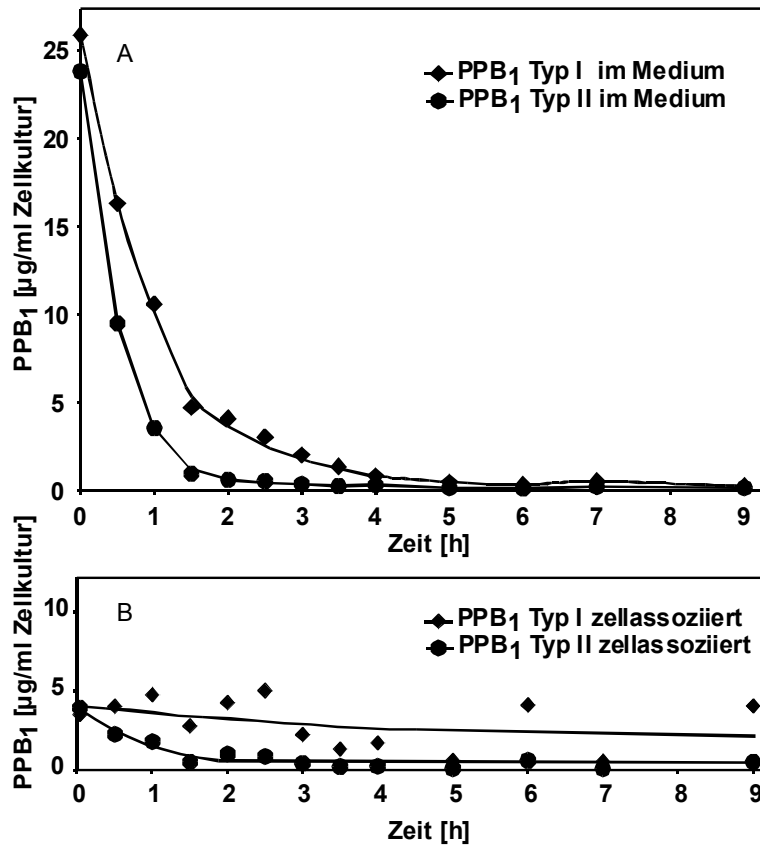


Abbildung IV.16: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von PPB₁ im Medium (A) und in der zellulären Fraktion (B) nach Zugabe zu einer Zellkultur von *E. californica*. Die Werte geben dabei die Konzentrationen an PPB₁ im Medium bzw. in Zellen wieder, die in 1 ml Zellkultur enthalten waren.

Die Konzentration von PPB₁ Typ II sank dabei innerhalb von 1,5 Stunden von 3,9 µg/ml Zellkultur auf 0,5 µg/ml Zellkultur. Im weiteren Verlauf des Versuches schwankte die Konzentration von PPB₁ Typ II um $\pm 0,4$ µg/ml Zellkultur. Die Konzentration von PPB₁ Typ I bewegte sich im gesamten Verlauf um einen Wert von $3,0 \pm 1,6$ µg/ml Zellkultur (Mittelwert \pm SD). Im Vergleich zu den zugesetzten Mengen an PPB₁ (100 µM je Typ, entspricht 30,8 µg/ml) sind diese Konzentrationen jedoch nicht signifikant. Sie stammen vermutlich von Resten des Mediums in der zellulären Fraktion, das nicht quantitativ entfernt worden war.

Das Ergebnis zeigt, dass die Konzentration von PPB₁ im Medium in Anwesenheit von Zellen innerhalb von 4 Stunden abnimmt, die Phytoprostane jedoch nicht in den Zellen akkumulierten. Das deutet darauf hin, dass PPB₁ metabolisiert werden. Denkbar wäre eine Verstoffwechslung von PPB₁ im Medium durch Enzyme, die zuvor von den Zellen abgegeben wurden oder eine Aufnahme der PPB₁ in die Zellen mit sofortiger Metabolisierung.

IV.3 Induktion der Phytoprostan-Biosynthese

In unserem Labor konnte bereits gezeigt werden, dass oxidativer Stress durch Zugabe von 1 mM *t*-BuOOH zu Zellsuspensionskulturen von *N. tabacum* die Bildung von PPE₁ induziert (Parchmann, 1999). Dabei wurde der Gehalt an PPE₁ Typ II auf den 12-fachen Wert, die PPE₁ Typ I-Konzentration auf den 3,5-fachen Wert des Ausgangswertes gesteigert. Peroxide induzieren demnach die Synthese von PPE₁. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch oxidativen Stress auch die Konzentrationen von PPA₁/B₁ ansteigen.

IV.3.1 Einfluss von *t*-BuOOH auf die Synthese von PPA₁/B₁

Um den Einfluss von Peroxiden auf die Bildung von PPA₁/B₁ zu untersuchen, wurden drei Tage alte Zellkulturen von *N. tabacum*, die unter den in III.2.1 beschriebenen Bedingungen vorbereitet worden waren, mit *t*-BuOOH in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquote entnommen, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde auf zwei Fraktionen aufgeteilt. Etwa 7-10 g der Zellen wurden bezüglich des Gehaltes an PPA₁/B₁ untersucht, wobei die Extraktion und Analyse der PPA₁/B₁ wie unter IV.2.2 beschrieben erfolgte. Etwa 1 g des Zellmaterials wurde auf den Gehalt an Jasmonsäure hin untersucht, wie unter III.3.1, III.3.3.3, III.4.4.4 und III.5.2 beschrieben. In Abbildung IV.17 sind die Zeitverläufe der PPA₁/B₁- und Jasmonsäure-Synthese nach Behandlung mit *t*-BuOOH dargestellt.

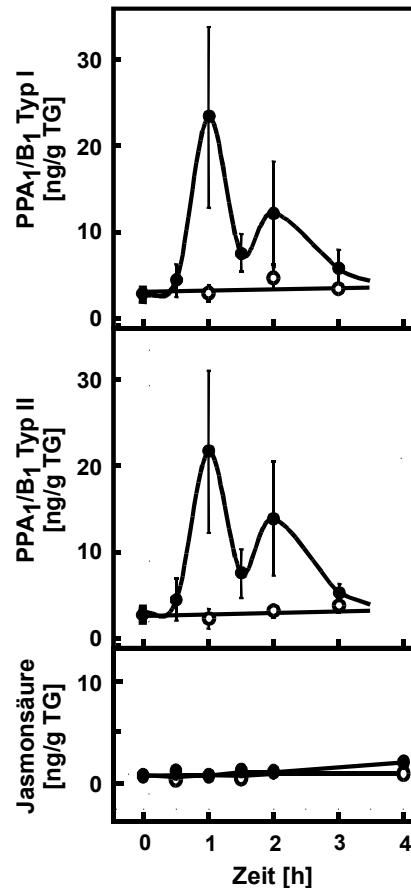


Abbildung IV.17: Zeitverläufe der PPA₁/B₁- und Jasmonsäure-Synthese nach Behandlung mit 1mM *t*-BuOOH. ● stellt die Messpunkte nach *t*-BuOOH-Behandlung dar, ○ die Kontrollen.

Durch die Behandlung mit *t*-BuOOH steigen die Konzentrationen der PPA₁/B₁ Typen I und II auf das Vierfache des Kontrollwertes an. Der Verlauf dieser Reaktion war biphasisch, so kommt es nach einer Stunde zu einem Maximum der Phytoprostan-Akkumulation, dem nach einer weiteren Stunde ein zweites, kleineres Maximum folgt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellkulturen auf verschiedene Formen von Stress mit einer biphasischen ROS-Generation reagieren. Dabei liegt in Zellkulturen das erste Maximum der ROS-Konzentration bei etwa 30 - 60 Minuten, das zweite in Abhängigkeit von der Pflanzenart nach 1,5 - 6 Stunden (Lamb and Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997). ROS stimulieren vermutlich über die Aktivität von Mitochondrien eine intrazelluläre ROS-Generation, so dass sich oxidativer Stress selbst verstärkt (Neill et al., 2002a). Möglicherweise ist eine solche positive Rückkoppelung nach ROS-Zusatz der Grund für den biphasischen Zeitverlauf der Phytoprostan-Bildung in *N. tabacum*.

Darüber hinaus lässt sich aus dem Verlauf dieser Reaktion ableiten, dass PPA₁/B₁ sehr rasch metabolisiert werden, da in diesem Versuch die Konzentration an PPA₁/B₁ innerhalb einer halben Stunde auf zwei Drittel des ersten Maximums abfällt. Diese Beobachtung untermauert die Vermutung, dass Phytoprostane unter Enzymbeteiligung metabolisiert werden.

Im Gegensatz zur Phytoprostan-Konzentration wird der Gehalt an Jasmonsäure durch die *t*-BuOOH-Behandlung nicht signifikant erhöht. Dies ist ein erster Hinweis, dass die Bildung

von Phytoprostanen und Jasmonaten über verschiedene Signalwege induziert werden. Eine weitergehende Untersuchung zur Beeinflussung des Jasmonsäure-Gehaltes durch PPA₁ und PPB₁ wird unter IV.4.2 beschrieben.

Dieses Experiment zeigt also, dass die Konzentration von PPA₁/B₁ in *N. tabacum* durch Behandlung mit 1 mM *t*-BuOOH induziert wird. In weiteren Experimenten soll nun untersucht werden, ob dieses beobachtete Phänomen auch unter weniger drastischen Bedingungen *in planta* beobachtet werden kann.

IV.3.2 Untersuchung zum Vorkommen von PPA₁/PPB₁ in der *lsd1* Mutante von *Arabidopsis thaliana*

In Pflanzen kommt es in Folge von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen zu einem dramatischen Anstieg der ROS-Konzentration, was zur Auslösung einer Hypersensitiven Reaktion führt (Neill et al., 2002a). Diese ist durch die Ausbildung von nekrotischen Läsionen charakterisiert und wird vermutlich durch die Cu-Zn-Superoxiddismutase (SOD) reguliert (Delledonne et al., 2001). Die Aktivität dieses Enzyms kann unter anderem durch das Abwehrsignal Salicylsäure unter Beteiligung des Gens *Lsd1* induziert werden (Dietrich et al., 1997). Die Mutante *lsd1* des *A. thaliana* Ecotyps Wassilewskaija (WS) kann die Hypersensitive Reaktion nicht regulieren, es kommt zur spontanen Ausbildung von nekrotischen Läsionen, welche sich unkontrolliert ausbreiten. In diesen Läsionen akkumulieren Superoxidanionen, nicht aber H₂O₂ (Jabs et al., 1996).

Wir wollten wissen, ob es in den Blättern von *lsd1* durch die erhöhte Konzentration von Superoxidanionradikalen zu einer verstärkten Bildung von PPA₁/PPB₁ kommt. Daher wurden 8 g Pflanzenmaterial von *lsd1*-Mutanten, welche nekrotische Läsionen ausgebildet hatten analog zu IV.2.2 aufgearbeitet und mittels GC-MS untersucht

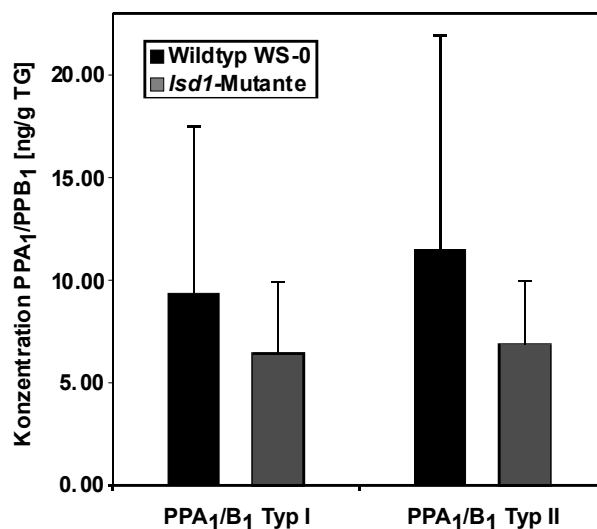


Abbildung IV.18: Konzentration an PPA₁/B₁ in *Arabidopsis thaliana*, *lsd1*-Mutante und Wildtyp WS-0.

Der Gehalt an PPA₁/B₁ in *lsd1* (Typ I: 6,4 ng/g TG, Typ II: 6,9 ng/g TG) wurde mit dem Gehalt an PPA₁/B₁ in Pflanzen vom Wildtyp WS-0 (Typ I: 9,4 ng/g TG, Typ II: 11,5 ng/g TG) verglichen (Abbildung IV.18). Die Konzentration von PPA₁/PPB₁ war in der Mutante nicht erhöht. Eine erhöhte Akkumulation an Superoxidanionen, wie sie in den Läsionen der *lsd1*-Mutante auftritt, ist anscheinend nicht ausreichend für eine Induktion der PPA₁/PPB₁-Biosynthese.

IV.3.3 Einfluss von *Botrytis cinerea* auf die Phytoprostan-Synthese in *L. esculentum*

Wie bereits erwähnt (IV.3.2), ist eine der ersten Reaktionen auf Pathogenbefall die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Um zu untersuchen, ob Pathogenbefall einen Einfluss auf die Phytoprostan-Konzentration in Pflanzen hat, wurden Blätter von *L. esculentum* var. Moneymaker mit Pilzsporen von *Botrytis cinerea* infiziert.

Botrytis cinerea ist ein perthotropher (*engl.* necrotrophic) Pilz, der neben anderen Gattungen auch *L. esculentum* befällt, wobei er den Zelltod nutzt, um sich von dem daraus resultierenden toten Pflanzenmaterial zu ernähren. Durch die Infektion kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Konzentrationen von Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und Lipidperoxidationsprodukten, wie beispielsweise Aldehyden, sowie freien Fe³⁺-Radikalen (Govrin and Levine, 2000).

Für die Untersuchung wurde eine Sporensuspension von *B. cinerea* in Blätter von 8 Wochen alten *L. esculentum*-Pflanzen aufgetropft (III.2.3). Zur Kontrolle wurden an denselben Pflanzen Blätter mit sterilem Malzextrakt (2% in Wasser, Fa Difco, USA) behandelt. Die Kontrollblätter wurden so ausgewählt, dass sie möglichst in gleicher Höhe wie die infizierten Blätter wuchsen. Da ROS aufgrund ihrer chemischen Instabilität keine große Reichweite haben und programmierter Zelltod eine lokale Abwehrreaktion ist, war ein systemischer Anstieg der Phytoprostane nicht zu erwarten und wurde auch in unseren Analysen nicht gefunden.

Nach 48 Stunden wiesen die infizierten Blätter Läsionen auf, welche ein Indiz für eine stattgefundenene Hypersensitive Reaktion darstellen (Abbildung IV.19).

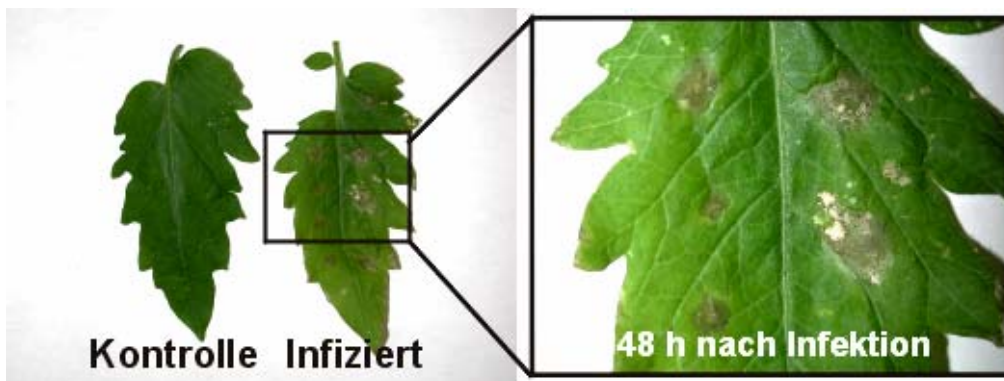


Abbildung IV.19: Blätter von *L. esculentum*, 48 Stunden nach Infektion mit *B. cinerea*

IV. Ergebnisse

Die Blätter wurden geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Kugelmühle pulverisiert. Die Analyse des Pflanzenmaterials erfolgte wie in den Kapiteln IV.2.3 und IV.2.5 beschrieben. Darüberhinaus wurde im gleichen Blattmaterial wie in den vorangegangenen Experimenten auch der Gehalt an Jasmonsäure untersucht. Jasmonsäure ist ein Oxylin, das durch enzymatische Oxidation aus Linolensäure gebildet wird. Seine Biosynthese wird infolge von oxidativem Stress induziert (Parchmann, 1999), so dass die Stärke der Jasmonsäure-Induktion für Vergleichszwecke herangezogen werden kann. Die Ergebnisse der Analyse dieses Pflanzenmaterials sind in Tabelle IV.3 zusammengefasst.

		Kontrolle		Infektion	
		Typ I	Typ II	Typ I	Typ II
PPE ₁	[ng/g TG]	35,5 ± 4,5	35,1 ± 13,0	89,9 ± 17,2	123,4 ± 14,6
PPA ₁	[ng/g TG]	3,3 ± 0,0	2,1 ± 0,1	12,6 ± 0,2	7,4 ± 0,2
PPB ₁	[ng/g TG]	1,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	3,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Jasmonsäure [ng/g TG]		22,3 ± 14,0		92,7 ± 20,3	

Tabelle IV.3: Konzentration von Phytoprostanen und Jasmonsäure in Blättern von *L. esculentum*, 48 Stunden nach Infektion mit *B. cinerea*. Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte ± SD einer Dreifachbestimmung.

Im Verlauf der beschriebenen Interaktion akkumulierten PPE₁ und PPA₁/PPB₁. Der Gehalt an PPE₁ stieg dabei auf das 3,0-fache seines Ausgangswertes, PPA₁ auf das 3,7-fache und PPB₁ auf das 2,9-fache an. Dies erscheint keine besonders starke Steigerung zu sein, jedoch sollte hier berücksichtigt werden, dass für die Untersuchung das gesamte Blatt herangezogen wurde. Eine massive Lipidperoxidation ist jedoch nur im Umfeld der Läsionen zu erwarten. Wie hoch der Phytoprostangehalt in den nekrotischen Bereichen tatsächlich war, konnte mit der hier vorgenommenen Analyse nicht geklärt werden. Eine Untersuchung der Jasmonsäure-Akkumulation zeigte, dass die Konzentration von Jasmonsäure durch den Pathogenbefall auf das vierfache ihres Basalwertes angehoben wird. Die Phytoprostan-Synthese wird demnach fast ebenso stark induziert wie die Bildung von Jasmonsäure.

IV.4 Biologische Aktivität

In Kapitel 3 wurden Untersuchungen beschrieben, die Hinweise auf eine Stimulation von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ durch ROS gaben. Nun stellte sich die Frage, welche möglichen Auswirkungen erhöhte Konzentrationen von ROS bzw. Phytoprostanen auf pflanzliche Zellen haben.

IV.4.1 Untersuchungen zur Phytoalexin-Induktion

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte ein Testsystem etabliert werden, in dem eine mögliche biologische Aktivität von ROS und Phytoprostanen untersucht werden kann. Hierfür erschien eine Untersuchung der Phytoalexin-Biosynthese geeignet. Aus der Literatur war bekannt, dass ROS die Phytoalexin-Bildung in Zellkulturen von *Petroselinum crispum* und *Glycine maxima* induzieren (Apostol et al., 1989; Jabs et al., 1997). Erhöhte Konzentrationen an ROS stimulieren darüber hinaus die Bildung von PPE₁, A₁ und B₁ (IV.3.3). Phytoprostane wiederum sind mit den Jasmonaten strukturell verwandt, welche ebenfalls eine Phytoalexin-Synthese induzieren können (Gundlach et al., 1992). Daher lag die Vermutung nahe, dass Phytoprostane, ebenso wie Jasmonate die Phytoalexin-Synthese induzieren.

Als Testsystem wurde eine Zellkultur von *Eschscholzia californica* ausgewählt, die bereits im Vorfeld an unserem Lehrstuhl zur Untersuchung der Induktion der Phytoalexin-Biosynthese durch Jasmonate benutzt worden war (Schuhmacher et al., 1987; Gundlach et al., 1992; Haider et al., 2000).

In einem ersten Experiment sollte geklärt werden, ob ROS auch in *E. californica* die Phytoalexin-Synthese induzieren können. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte dann die biologische Aktivität der Phytoprostane untersucht werden.

IV.4.1.1 Untersuchungen zur Phytoalexin-Induktion in *E. californica*-Zellkultur

In *E. californica* werden rot gefärbte Phytoalexine, die Benzophenanthridin-Alkaloide, gebildet, deren Biosynthese bei Elicitierung mit Zellwandfragmenten von *Saccharomyces cerevisiae* induziert wird (Tanahashi and Zenk, 1990). Nach Kontakt der pflanzlichen Zellen mit dem Elicitor kommt es zu einem Anstieg der Jasmonsäure-Konzentration, dieser führt über eine verstärkte Expression des Gens für das Berberin-Brücken-Enzym zu einer *de novo*-Synthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden, mit Chelirubin und Sanguinarin als Hauptverbindungen (Dittrich and Kutchan, 1991; Gundlach et al., 1992). Diese Alkaloide wirken antimikrobiell, ihre Akkumulation ist daher Teil der pflanzlichen Abwehrstrategie (siehe Abbildung IV.20).

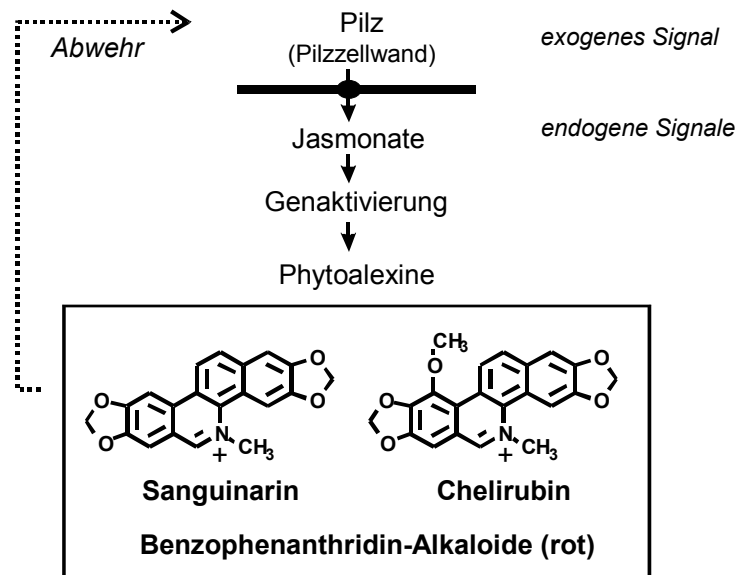


Abbildung IV.20: Signalkaskade, die in der Zellkultur *E. californica* zur Synthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden führt.

Die Akkumulation der rot gefärbten Benzophenanthridin-Alkaloide kann visuell verfolgt werden, zudem ist eine Quantifizierung der Alkaloide durch photometrische Vermessung des Extraktes möglich (III.2.2.1.1) (Schuhmacher et al., 1987; Gundlach et al., 1992).

Nun sollte dieses Testsystem angewendet werden, um eine mögliche Stimulation der Benzophenanthridin-Biosynthese durch ROS und Phytprostane zu beobachten.

IV.4.1.1.1 *Tert*-Butylhydroperoxid induziert die Benzophenanthridin-Synthese

Anhand des nachfolgend beschriebenen Experiments sollte untersucht werden, ob in *E. californica* die Phytoalexin-Biosynthese durch oxidativen Stress verstärkt werden kann. Dazu wurde der Zellkultur *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH), einem katalase-resistenten Analogon von Wasserstoffperoxid zugesetzt, das in Anwesenheit von Eisen- oder Kupferionen reaktive Radikale bildet. Die Verwendung des natürlich vorkommenden Wasserstoffperoxids war nicht möglich, da dieses sich sofort nach der Zugabe unter Schaumbildung zersetzte. Vermutlich kommen in Zellkulturen im Vergleich zu intakten Pflanzen hohe Konzentrationen von Katalasen vor, also von Enzymen, die eine Dissoziation von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysieren.

Eine nach Methode II.1.1 vorbereitete und in Multischalen ausplattierte Zellkultur von *E. californica* wurde mit steigenden Konzentrationen (0,3 bis 0,8 mM Endkonzentration) von

IV. Ergebnisse

t-BuOOH versetzt, um oxidativen Stress zu generieren. Dazu wurde *t*-BuOOH mit dest. Wasser verdünnt und sterilfiltriert. In die Näpfe der Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen an dest. Wasser gegeben. Der Versuch wurde wie unter III.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Abbildung IV.21A zeigt einen repräsentativen Versuchsansatz nach einer Inkubationszeit von 92 Stunden.

Abbildung IV.21B zeigt das Ergebnis des Versuches nach Extraktion der Zellen und anschließender photometrischer Analyse der Benzophenanthridin-Alkaloide.

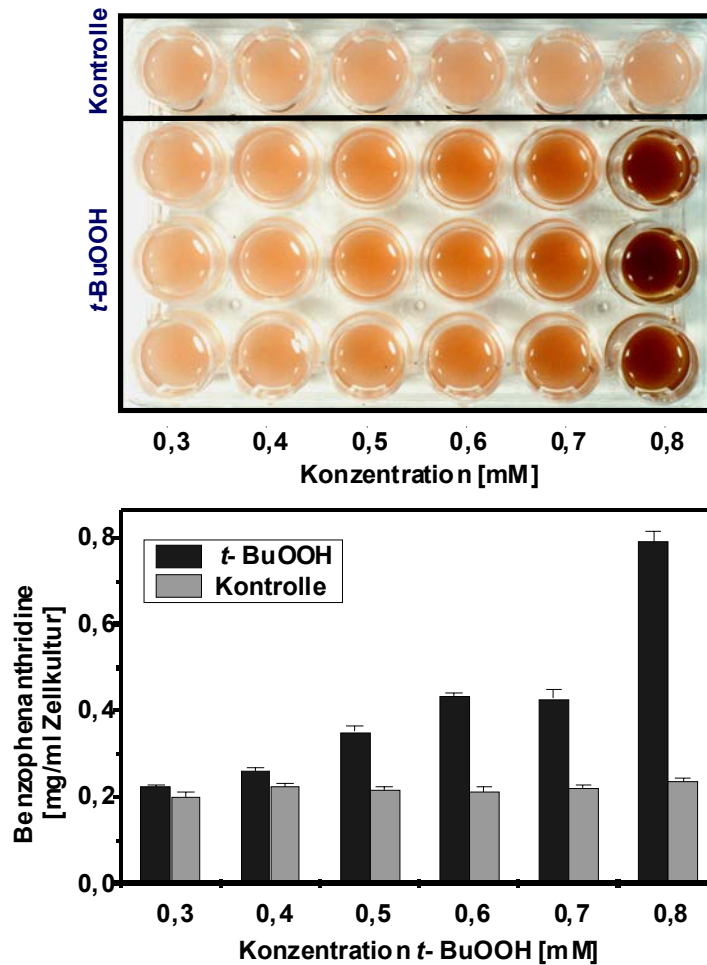


Abbildung IV.21: (A) Repräsentativer *E. californica*-Multischalenansatz nach Behandlung mit *t*-BuOOH. Den Kontrollnäpfen wurde destilliertes Wasser zugesetzt. (B) Ergebnis nach Extraktion und photometrischer Analyse der Benzophenanthridin-Alkaloide.

Im Versuchsansatz (Abbildung IV.21A) war nach einer Inkubationszeit von 92 Stunden eine rote Färbung der mit *t*-BuOOH versetzten Zellen zu erkennen, welche auf eine Benzophenanthridin-Akkumulation hinweist. Nach Behandlung der Zellkultur mit 0,8 mM *t*-BuOOH steigt der Gehalt an Benzophenanthridin-Alkaloiden auf den 3,6-fachen Wert der Kontrolle an. Es konnte also gezeigt werden, dass durch Zusatz von *t*-BuOOH in *E. californica* die Phytoalexin-Synthese induziert wird.

IV.4.1.1.2 Salicylsäure induziert die Benzophenanthridin-Biosynthese

Salicylsäure ist als Signalstoff an lokalen und systemischen Abwehrreaktionen von Pflanzen beteiligt. Sie hemmt dabei unter anderem Katalase (Chen et al., 1993; Durner and Klessig, 1995), wodurch es zu einer Akkumulation von H_2O_2 und zur Bildung von Salicylsäure-Radikalen kommt. Die Salicylsäure-Radikale wiederum induzieren Lipidperoxidationsprozesse (Anderson et al., 1998), deren Produkte die Expression von Genen der pflanzlichen Abwehr induzieren können (Farmer et al., 1998).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte Salicylsäure im *E. californica*-Testsystem auf biologische Aktivität bezüglich der Phytoalexin-Synthese überprüft werden. Der Versuch wurde analog Vorschrift III.2.2.1 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung IV.22 dargestellt.

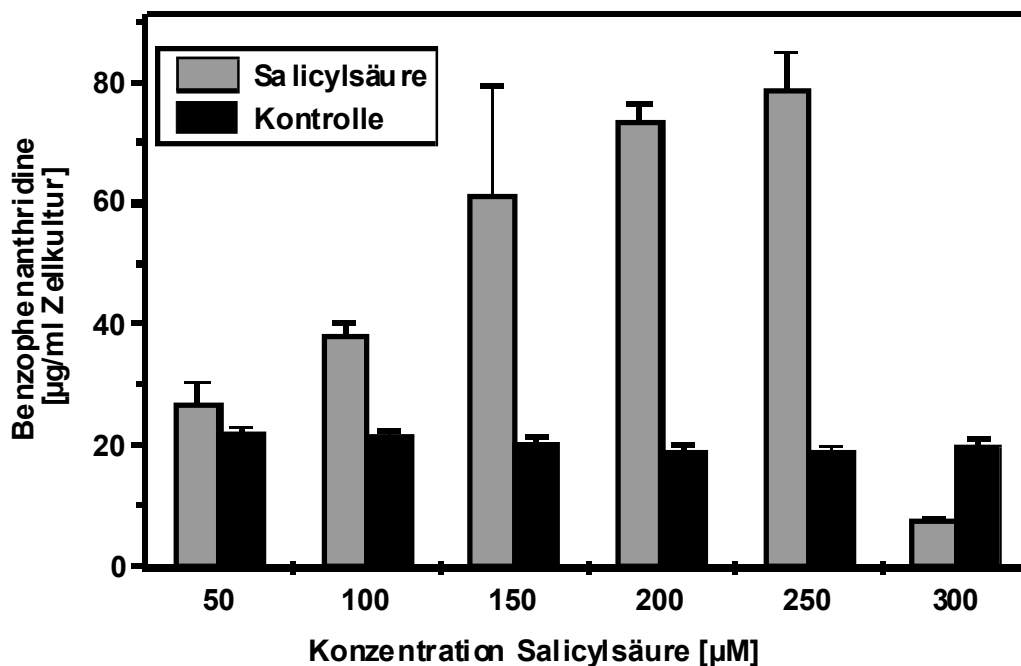


Abbildung IV.22: Induktion der Phytoalexin-Biosynthese in *E. californica* nach Behandlung mit Salicylsäure.

Dabei zeigt sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Benzophenanthridin-Synthese nach Zugabe von Salicylsäure. Der Gehalt an Alkaloiden erhöhte sich bei einer Konzentration von 250 μ M Salicylsäure auf den 3,6-fachen Wert im Vergleich zur Kontrolle. Nach Zugabe von Salicylsäure in einer Endkonzentration von 300 μ M starben die Zellen im Laufe der Inkubationszeit. Ob dieses Ergebnis auf Lipidperoxidations-Prozesse durch die Salicylsäure, zurückzuführen ist, ist noch unklar, da hierzu keine Experimente durchgeführt wurden. Möglich wäre auch eine Reaktion der Zellkultur auf pH-Änderungen, da die Testsubstanz als freie Säure zugegeben wurde.

IV.4.1.1.3 PPE₁ induzieren die Benzophenanthridin-Synthese

Im *E. californica*-Testsystem konnte gezeigt werden, dass *t*-BuOOH und Salicylsäure – zwei Verbindungen, die Lipidperoxidation verursachen können – zu einer Steigerung der Benzophenanthridin-Synthese führen. In Hinblick auf die Hypothese, dass Phytoprostane Mediatoren des oxidativen Stresses sein könnten, sollte nun mit Hilfe dieses Testsystems geklärt werden, ob auch Phytoprostane eine biologische Aktivität besitzen.

Dazu wurden Zellen von *E. californica* in Multischalen ausplattiert (III.2.2.1) und mit je 20 μ l einer Konzentrationsreihe von Phytoprostanlösungen versetzt. Bei jeder Versuchsreihe wurde je ein Ansatz mit Jasmonsäure und Methanol als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgeführt. Zunächst wurden PPE₁ in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 125 μ M getestet. Dabei wurde eine Mischung aller Stereoisomeren von PPE₁ eingesetzt, welche nach der Isolierung (III.1.1) über präparative DC weiter aufgereinigt worden war (III.4.2).

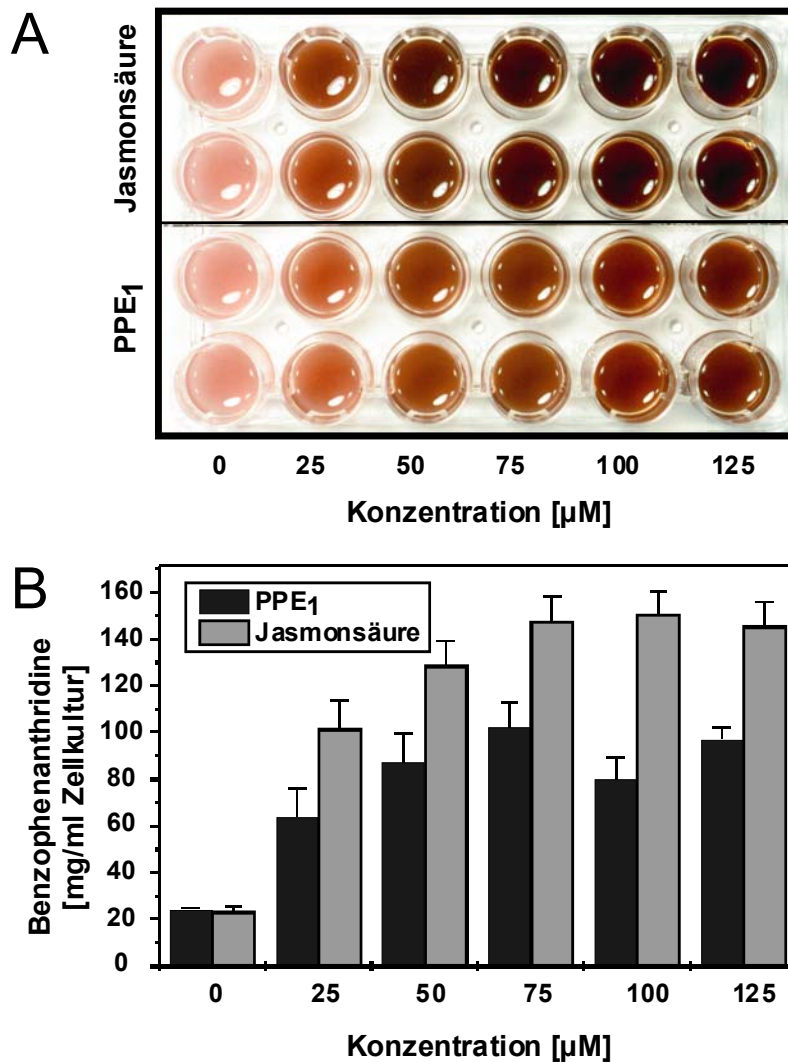


Abbildung IV.23: (A) Repräsentativer *E. californica*-Multischalenansatz nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von PPE₁, Jasmonsäure bzw. Methanol (Kontrolle). (B) Ergebnis nach Extraktion und photometrischer Auswertung.

Abbildung IV.23A zeigt den Versuchsansatz nach 5-tägiger Inkubation. Die Farbvertiefung durch eine Akkumulation von Benzophenanthridin-Alkaloiden korreliert mit den steigenden Konzentrationen an Jasmonsäure und PPE₁ in der Zellkultur. Diese Beobachtung wurde durch photometrische Auswertung bei 490 nm bestätigt (Abbildung IV.23B). Durch Zusatz von Jasmonsäure bzw. PPE₁ in einer Endkonzentration von 75 µM war bereits die maximale Elicitierung erreicht, wobei der Gehalt an Benzophenanthridin-Alkaloiden durch Zusatz von Jasmonsäure auf den 6,4-fachen Wert gestiegen war, durch Zusatz von PPE₁ auf den 4,4-fachen Wert.

IV.4.1.1.4 PPA₁ induzieren die Benzophenanthridin-Synthese

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von PPA₁ auf die Benzophenanthridin-Synthese untersucht. PPA₁ wurden dabei als reine Regioisomere eingesetzt (IV.1.3).

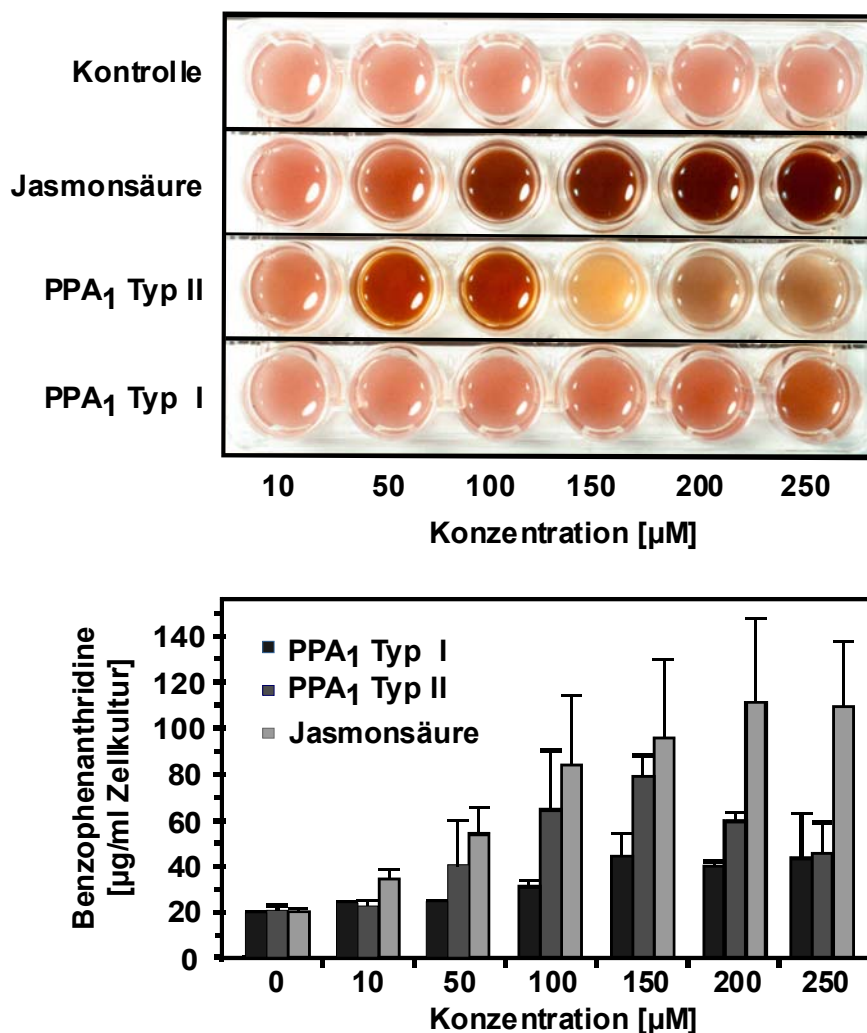


Abbildung IV.24: (A) Repräsentativer *E. californica*-Multischalenansatz nach Behandlung mit PPA₁ Typ I und Typ II, Jasmonsäure und Methanol (Kontrolle). (B) Ergebnis der photometrischen Auswertung bei 490 nm.

Wie PPE₁ und Jasmonsäure (IV.4.1.1.3) induzierten auch PPA₁ die Benzophenanthridin-Synthese. Dabei verursachte die Behandlung mit 150 μM Jasmonsäure eine 4,6-fache Induktion und die Zugabe von PPA₁ Typ II in einer Endkonzentration von 150 μM eine 3,8-fache Induktion der Alkaloid-Synthese, wohingegen 150 μM PPA₁ Typ I lediglich eine 2,1-fache Induktion hervorriefen (Abbildung IV.24). PPA₁ Typ II besaßen in diesem Testsystem also eine fast genauso stark ausgeprägte biologische Aktivität wie Jasmonsäure bezüglich der Induktion der Benzophenanthridin-Synthese. Typ I hingegen war nur schwach aktiv. Demnach übt die Struktur der Seitenketten von PPA₁ einen Einfluss auf die Induktion der Benzophenanthridin-Synthese aus.

Eine Zugabe von PPA₁ Typ II in einer Endkonzentration von 200 µM führte zu einem Absterben der Zellen. Ursache dafür könnten direkte toxische Effekte, aber auch die Induktion von programmiertem Zelltod sein. Dass PPA₁ in menschlichen Zellen Programmierter Zelltod auslösen können, konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. V. Dirsch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ob PPA₁ auch in Pflanzen Programmierter Zelltod auslösen können ist ungeklärt. Experimente dazu wurden nicht durchgeführt.

IV.4.1.1.5 PPB₁ induzieren die Benzophenanthridin-Synthese

Genauso wie die Behandlung mit PPE₁ und PPA₁ führte die Zugabe von PPB₁ zu der Zellkultur von *E. californica* zu einer verstärkten Benzophenanthridin-Akkumulation. Bereits bei visueller Auswertung des Versuchansatzes (Abbildung IV.25A) konnte man erkennen, dass die Behandlung mit 150µM Jasmonsäure und PPB₁ Typ II eine starke Alkaloidakkumulation induzierte. Die photometrische Auswertung bei 490 nm (III.2.2.1.1) ergab, dass durch Zugabe von Jasmonsäure und PPB₁ Typ II in einer Endkonzentration von 150 mM eine fünffache Steigerung der Benzophenanthridin-Akkumulation hervorgerufen wurde. Die Behandlung mit 150 µM PPB₁ Typ I induzierte die Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden lediglich um das 1,4 fache. Wie bereits für PPA₁ beobachtet, zeigte sich auch hier ein Unterschied in der Aktivität der beiden Regioisomere. Regioisomer Typ I hatte nur geringen Einfluss auf die Alkaloid-Biosynthese, wohingegen die Behandlung mit Typ II zu einer deutlichen Benzophenanthridin-Akkumulation führte.

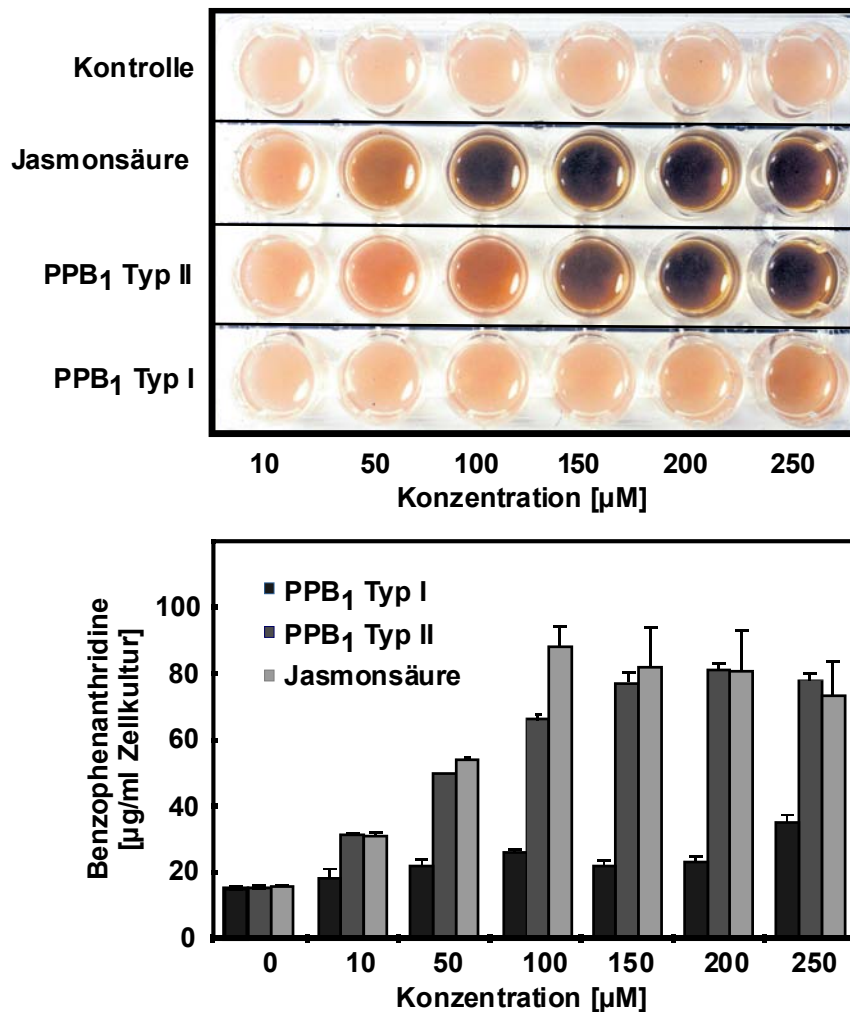


Abbildung IV.25: Repräsentativer *Eschscholzia californica*-Multischalenansatz nach Behandlung mit PPA₁ Typ I und Typ II. Als Kontrollen wurde Jasmonsäure bzw. Methanol zugesetzt. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen.

4.1.1.5.a Untersuchung des Benzophenanthridin-Musters nach PPB₁-Elicitierung

In der gezeigten Untersuchung (IV.4.1.1.5) war die Induktion der Benzophenanthridin-Alkaloide nach Zusatz von PPB₁ Typ II und Jasmonsäure gleich stark ausgeprägt. Es konnte jedoch aufgrund der photometrischen Auswertung keine Aussage über die Zusammensetzung der Alkaloide nach Jasmonsäure- bzw. PPB₁-Behandlung getroffen werden. Im Folgenden sollte eine Auftrennung der einzelnen Alkaloide mittels HPLC erfolgen und das Alkaloid-Muster nach Induktion durch Jasmonsäure und PPB₁ verglichen werden.

In einem ersten Schritt wurden eine Extraktions- und eine HPLC-Methode entwickelt. Dazu wurde 1 ml Zellkultur von *E. californica* bei 2900 x g abzentrifugiert und anschließend die Zellen mit salzsaurem Ethanol extrahiert (III.2.2.1). 250 µl dieses Extraktes wurden zur Trockene eingengt, in 2 ml Wasser aufgenommen und mit Diethylether ausgeschüttelt. In der wässrigen Phase befanden sich die oxidierten Verbindungen der Alkaloide, in der Etherphase die Dihydroverbindungen. Die Etherphase wurde zur Trockene eingengt, in Methanol aufgenommen und über RP-HPLC aufgetrennt (siehe unten).

Die oxidierten Verbindungen konnten nicht über RP-HPLC aufgetrennt werden, da es aufgrund starker Wechselwirkungen der polaren Verbindungen mit der RP18-Säule zu starkem Tailing der Peaks kam. Daher wurde die wässrige Phase mit Natriumborhydrid versetzt und so die Alkaloide zu den entsprechenden Dihydroverbindungen reduziert (siehe Abbildung IV.26).

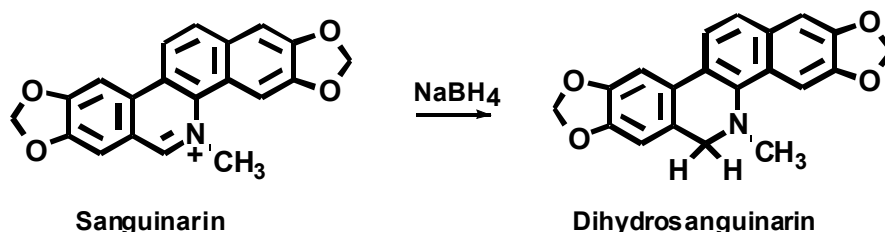


Abbildung IV.26: Reduktion von Sanguinarin mit Natriumborhydrid bei Raumtemperatur zur korrespondierenden Dihydroverbindung.

Während dieser Reaktion kam es unter Gasbildung zur Entfärbung der Lösung. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur stengelassen, damit eventuell entstandene Borsalze hydrolysiert wurden. Die nun reduzierten Alkaloide wurden mit Diethylether ausgeschüttelt, der Ether unter einem Stickstoffstrom entfernt und der Extrakt in Methanol wieder aufgenommen. Anschließend wurden die reduzierten Alkaloide mittels HPLC über eine LiChrospher RP18ec Säule (250 x 4 mm) unter folgenden Bedingungen aufgetrennt:

IV. Ergebnisse

Laufmittel A: Wasser/Acetonitril/Phosphorsäure 85% (v/v) (95:5:0.1, v/v)

Laufmittel B: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure 85% (v/v) (90:10:0.1, v/v)

Gradient:	Zeit	LM A	LM B
	0	100	0
	10	75	25
	20	75	25
	35	50	50
	40	30	70
	46	30	70
	56	25	75

Fluss: 1,5 ml/min

Detektion: $\lambda=280$ nm

In der unbehandelten Zellkultur konnten weder oxidierte Benzophenanthridin-Alkaloide noch Dihydroverbindungen nachgewiesen werden, da der Gehalt an Alkaloiden unter der Nachweisgrenze lag (siehe Abbildung IV.28).

Um die Alkaloidzusammensetzung nach Behandlung mit Jasmonsäure zu untersuchen, wurde 1 ml Zellkultur von *E. californica* mit Jasmonsäure bis zu einer Endkonzentration von 50 μ M versetzt und 136 Stunden unter ständigem Schütteln (80 rpm) inkubiert. Die Extraktion und Analyse von Benzophenanthridin-Alkaloiden erfolgte wie oben beschrieben. Während reduzierte Dihydroverbindungen nicht gefunden wurden, konnten oxidierte Verbindungen nach Reduktion mit NaBH₄ im HPLC-Chromatogramm nachgewiesen und mit Hilfe von Referenzsubstanzen identifiziert werden. Als Hauptverbindungen lagen Chelirubin und Sanguinarin vor, außerdem Macarpin als Nebenkomponente (siehe Abbildung IV.28).

Zur eindeutigen Identifizierung wurden die beiden prominenten Verbindungen nach der Auftrennung über HPLC gesammelt und EI-MS-Spektren angefertigt (siehe Abbildung IV.27). Dazu wurden die Analyten unter Umgehung des Gaschromatographen direkt in das Massenspektrometer gebracht. Zur Identifizierung wurden wiederum Referenzsubstanzen herangezogen. Auf diese Weise wurden in der mit Jasmonsäure behandelten Zellkultur von *E. californica* die Alkaloide Chelirubin und Sanguinarin eindeutig nachgewiesen.

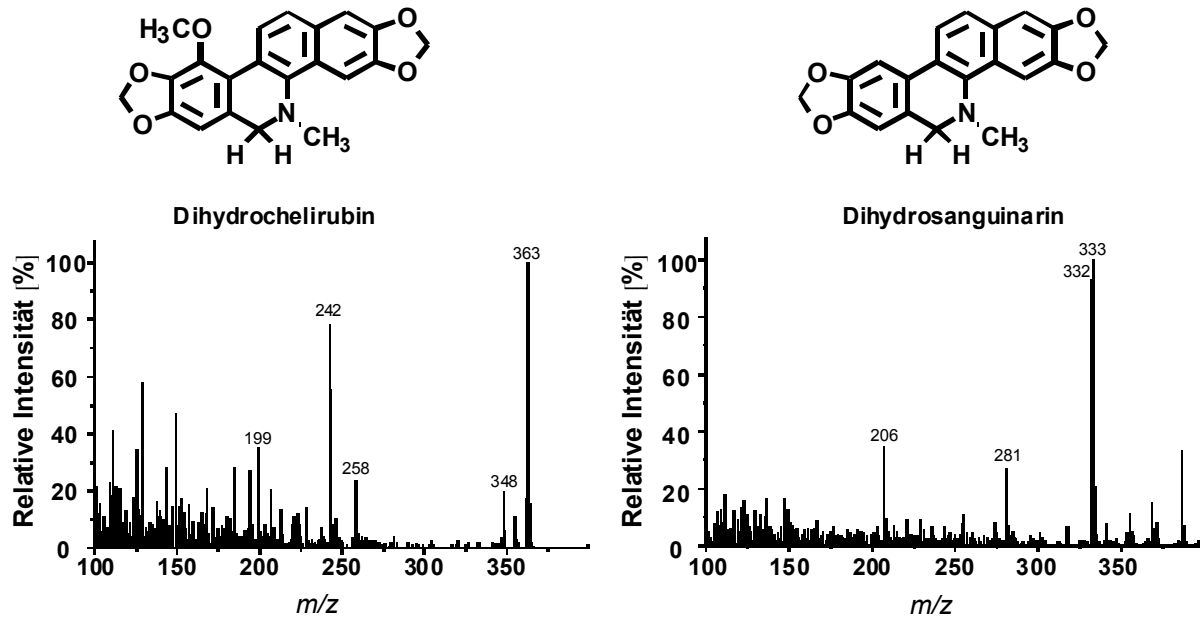


Abbildung IV.27: EI-Massenspektren der reduzierten Benzophenanthridin-Alkaloide Dihydrochelirubin und Dihydrosanguinarin.

Im nächsten Schritt wurde eine Zellkultur von *E. californica* mit je 50 μ M PPB₁ Typ I und Typ II behandelt. Als Positivkontrolle wurde Jasmonsäure eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 136 Stunden wurden die Benzophenanthridin-Alkaloide nach oben beschriebenen Methoden extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert. Unten abgebildetes HPLC-Chromatogramm (Abbildung IV.28) zeigt das Benzophenanthridin-Muster von Zellkulturen von *E. californica* nach Zugabe von MeOH (a, Negativkontrolle), PPB₁ Typ I (b), PPB₁ Typ II (c) und Jasmonsäure (d).

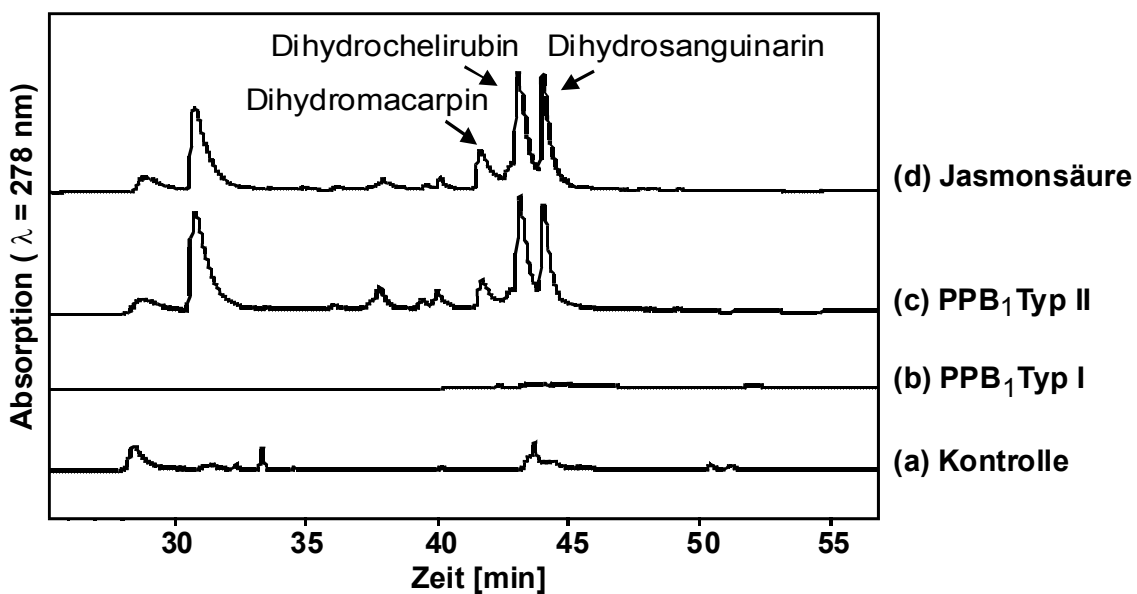


Abbildung IV.28: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes von *E. californica*, 136 Stunden nach Behandlung mit MeOH (a, Kontrolle), 50 μ M PPB₁ Typ I (b), 50 μ M PPB₁ Typ II (c) und 50 μ M Jasmonsäure (d). Die Peaks repräsentieren die Benzophenanthridin-Alkaloide Macarpin, Chelirubin und Sanguinarin nach Reduktion mit Natriumborhydrid.

IV. Ergebnisse

Nach Zusatz von PPB₁ Typ I zur Zellkultur konnten keine Benzophenanthridin-Alkaloide detektiert werden. Nach Behandlung der Zellkultur mit PPB₁ Typ II konnten vornehmlich Chelirubin, Sanguinarin und auch Macarpin als Dihydroverbindungen nachgewiesen werden. Zwischen den Benzophenanthridin-Mustern der Versuchsansätze mit Jasmonsäure und PPB₁ Typ II konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung untermauerte zudem die Feststellung, dass in diesem Testsystem PPB₁ Typ II das aktive, Typ I das inaktive Regioisomer ist.

IV.4.1.1.6 Zeitverlauf der Benzophenanthridin-Synthese

In einem weiteren Versuch sollte der Zeitverlauf der Benzophenanthridin-Synthese beobachtet werden. Dazu wurden 25 g einer Zellkultur von *E. californica* in 250 ml frisches Medium eingewogen und nach 3 Tagen in Multischalen ausplattiert. Anschließend wurden die Zellkulturen mit 20 μ l einer methanolischen Lösung von PPE₁, PPB₁, PPF₁ oder Jasmonsäure versetzt. Aufgrund des hohen Bedarfs an Testsubstanzen und der aufwendigen Herstellungsprozedur für regioisomerenreine Phytoprostanlösungen wurden in diesem Experiment Isomerengemische eingesetzt. Die Endkonzentration aller Lösungen im Versuchansatz betrug 100 μ M. Als Negativkontrolle dienten Zellkulturen, denen 20 μ l MeOH zugesetzt worden waren. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 3 Näpfe einer Untersuchungsreihe extrahiert und photometrisch bei 490 nm ausgewertet (III.2.2.1.1).

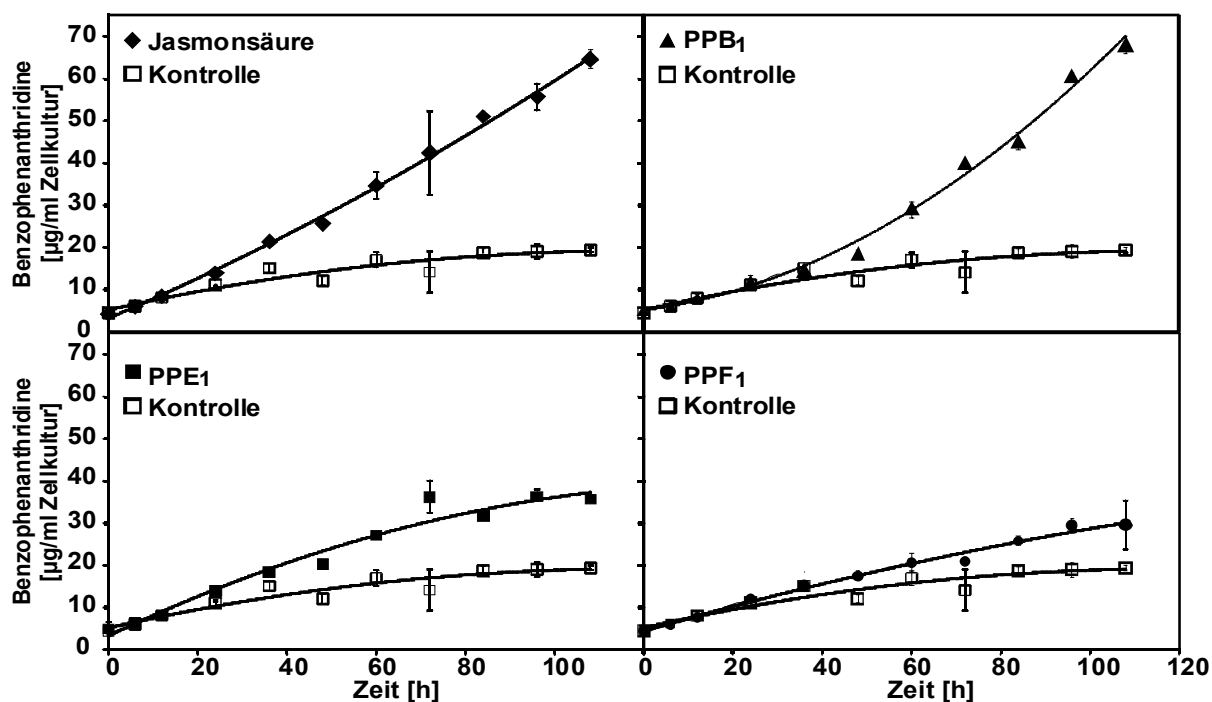


Abbildung IV.29: Zeitlicher Verlauf der Bildung von Benzophenanthridin-Alkaloiden in Zellkultur von *E. californica* nach Behandlung mit 100 μ M Jasmonsäure, PPB₁, PPE₁ und PPF₁.

Der Signalweg von Jasmonsäure zur Induktion der Phytoalexinsynthese verläuft über eine Verstärkung der Genexpression (Gundlach et al., 1992). Dies erklärt, warum die Benzophenanthridin-Konzentration innerhalb von Stunden stetig ansteigt und nicht direkt nach der Jasmonsäure-Zugabe dramatisch zunimmt, wie es bei einer Freisetzung aus Stoffspeichern, z.B. den Vakuolen der Fall wäre. 108 Stunden nach der Jasmonsäure-Zugabe war die Benzophenanthridin-Konzentration in *E. californica* auf den 15-fachen Wert des Anfangsgehaltes angestiegen. Die Konzentration in der Negativkontrolle war im gleichen Zeitraum um das Vierfache erhöht, wobei dieser Anstieg weniger auf einen Effekt durch die

Methanolzugabe zurückzuführen ist, als vielmehr auf eine Zunahme der Zellmasse in den Multischalennäpfen.

Wie nach der Jasmonsäure-Behandlung war nach Zusatz von PPB₁ ein linearer Zeitverlauf der Benzophenanthridin-Akkumulation zu beobachten. Hier war ein Gemisch eingesetzt worden, das gleiche Anteile der beiden Regioisomere enthielt. Da Typ I in diesem System nahezu inaktiv war (IV.4.1.1.5), wurde die Konzentration der Testlösung so eingestellt, dass in der Zellkultur 100 µM Typ II als aktive Substanz vorlagen. Die Behandlung der Zellkultur mit einem PPB₁-Gemisch mit Typ II als aktiver Substanz führte zu einem 13-fachen Anstieg der Phytoalexin-Akkumulation innerhalb von 108 Stunden. Auch hier verlief die Konzentrationszunahme der Alkaloide linear. Aufgrund der parallel verlaufenden Kurven der beiden Zeitverläufe lag die Vermutung nahe, dass die Wirkung der PPB₁ wie die der Jasmonate auf einer Stimulierung der Genexpression beruht.

Die Zugaben von PPE₁ und PPF₁ hatten eine deutlich schwächere Benzophenanthridin-Synthese zur Folge als der Zusatz von Jasmonsäure und PPB₁. Die Konzentrationen an Benzophenanthridin-Alkaloiden lagen nach 108 Stunden bei dem 7- (nach PPE₁-Behandlung) bzw. dem 6,5 fachen Wert (nach PPF₁-Behandlung) der Anfangskonzentration. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss man jedoch berücksichtigen, dass hier Stereoisomeren-Gemische eingesetzt worden waren, die auf 100 µM Gesamt-PPE₁ bzw. Gesamt-PPF₁ eingestellt worden waren. Anders als bei den PPB₁ lagen für PPE₁ und PPF₁ keine Informationen darüber vor, welche der Isomere aktiv und welche nicht aktiv waren. So wäre es möglich, dass nur einzelne Isomere aktiv waren und somit die Konzentration aktiver Verbindungen im Versuchsansatz deutlich niedriger war als im Jasmonsäure- bzw. PPB₁-Ansatz.

Die dargestellten Untersuchungen zeigten, dass PPE₁, PPA₁ und PPB₁ die Biosynthese der Benzophenanthridin-Alkaloide in *E. californica*-Zellsuspensionkulturen induzieren können. Dabei konnte im Fall von PPA₁ und PPB₁ beobachtet werden, dass die Aktivität der Regioisomere Typ II in etwa der Aktivität von Jasmonsäure entspricht. Regioisomere des Typs I waren hingegen nur schwach aktiv. Die Alkaloid-Akkumulation nach Behandlung der Zellkultur mit Phytoprostanen verlief parallel zum Anstieg des Alkaloid-Gehaltes nach Jasmonsäure-Behandlung. Dies deutet darauf hin, dass Jasmonsäure und Phytoprostane ihre Wirkung über einen vergleichbaren Mechanismus vermitteln.

IV.4.1.2 Untersuchungen zur Isobavachalkon-Synthese in *Crotalaria cobalticola*-Zellkultur

Neben *E. californica* sollten weitere Pflanzen untersucht werden, um zu untersuchen, ob Phytoprostane auch die Biosynthese anderer Stoffklassen als der Benzophenanthridin-Alkaloide induzieren können. Aus diesem Grund wurde mit *Crotalaria cobalticola* (Fabaceae) die Zellkultur einer taxonomisch von *E. californica* entfernten Pflanze ausgewählt, die nach Stimulation mit Jasmonsäure das Flavonoid Isobavachalkon (Abbildung IV.30) bildet (Gundlach, 1992). In die Biosynthese von Chalkonen, wie beispielsweise des Isobavachalkons sind die Abwehrgene *Pal* (codiert für Phenylalanin-Ammonium-Lyase) und *Chs* (codiert für Chalkon-Synthase) involviert (Dixon et al., 2002). Isobavachalkon besitzt antimikrobielle Eigenschaften und stellt somit einen Teil der Abwehrreaktion gegen Mikroorganismen in *C. cobalticola* dar. Da Chalkone antioxidativ wirken, kann man spekulieren, ob Isobavachalkon als Radikalfänger in Pflanzen oxidativem Stress entgegenwirkt.

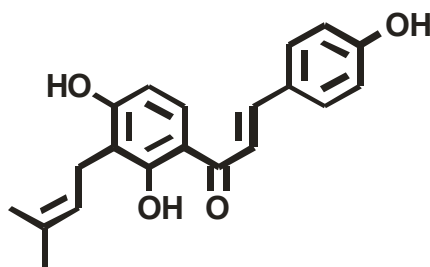


Abbildung IV.30: Struktur von Isobavachalkon.

IV.4.1.2.1 HPLC-Methode zur Bestimmung von Isobavachalkon

Da das Absorptionsmaximum von Isobavachalkon bei 366 nm liegt, kann man dessen Induktion nicht mit bloßem Auge verfolgen wie es bei den Benzophenanthridin-Alkaloiden möglich war. Daher wurde eine Auswertungsmethode entwickelt, die Isobavachalkon nach Auftrennung des Extraktes mittels HPLC photometrisch erfasst. Zur Methodenentwicklung wurde eine Zellkultur mit Jasmonsäure zur Phytoalexinsynthese stimuliert. Die Behandlung und Extraktion der Zellen erfolgte analog zum *E. californica*-Testsystem – mit dem Unterschied, dass die Inkubationsdauer auf 36 Stunden reduziert wurde. Der Grund dafür lag im Zeitverlauf der Isobavachalkon-Akkumulation (IV.4.1.2.3), bei dem bereits 36 Stunden nach Zusatz von Jasmonsäure und PPB₁ in der Zellkultur eine maximale Phytoalexin-Konzentration vorlag. Nach Extraktion mit salzsäurem Ethanol (80% v/v, 0,18% HCl) und anschließender Zentrifugation bei 2900 x g (III.2.2.1.1) wurde der ethanolische Extrakt direkt über HPLC unter folgenden Bedingungen analysiert.

IV. Ergebnisse

HPLC-Anlage: analytische HPLC-Anlage Waters (siehe II.5)
Säule: LiChrospher 250 x 4 mm Partikelgrösse 10µm (Knauer)
Injektionsvolumen: 100 µl
Laufmittel: A: Wasser/Acetonitril/Phosphorsäure 85% (v/v) (95:5:0.1, v/v)
B: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure 85% (v/v) (90:10:0.1, v/v)
Gradient:

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
5	40	60
15	0	100
20	0	100

Fluss: 1 ml/min
Detektion: $\lambda = 366 \text{ nm}$
Retentionszeit: Isobavachalkon: 17,3 min

Abbildung IV.31 zeigt ein Chromatogramm nach Behandlung der Zellkultur mit 100 µM Jasmonsäure und 20 µl Methanol (Kontrolle).

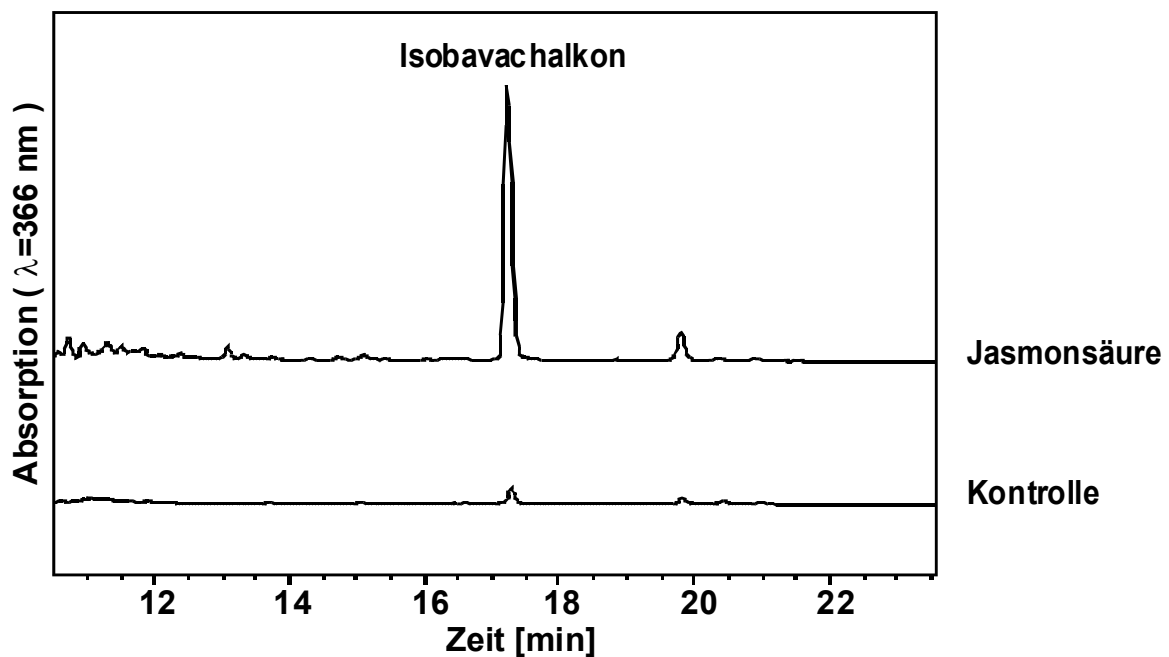


Abbildung IV.31: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes von *C. cobalticola* ohne bzw. nach Behandlung mit 100 µM Jasmonsäure.

Gleichzeitig konnte aufgrund der Detektion mittels Photodiodenarray-Detektor ein UV-Spektrum der chromatographierten Verbindung aufgenommen werden, welches Hinweise lieferte, dass es sich bei der untersuchten Substanz tatsächlich um ein Chalkon handelte (Abbildung IV.32).

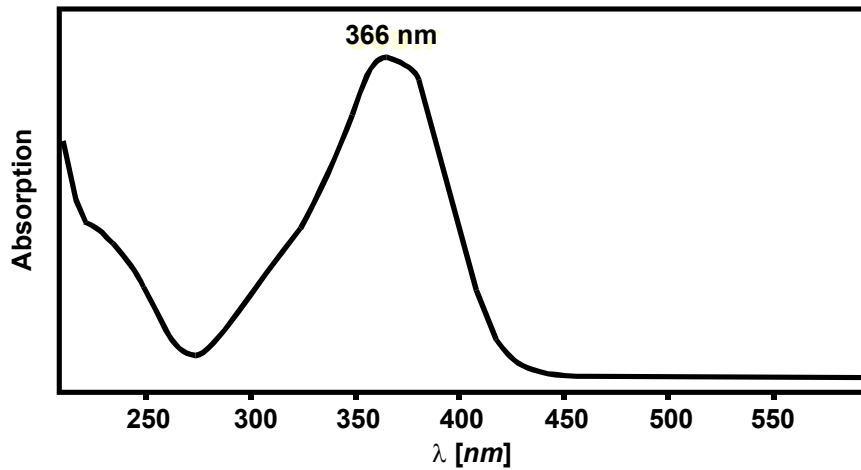


Abbildung IV.32: UV-Spektrum von Isobavachalkon.

Die eluierte Verbindung wurde gesammelt, unter Vakuum getrocknet und in Methanol gelöst. Anschließend wurde Isobavachalkon per Direkteinlaß mittels EI-MS analysiert. Anhand des erhaltenen Massenspektrums und Vergleich mit Referenzsubstanz konnte Isobavachalkon eindeutig identifiziert werden (Abbildung IV.33).

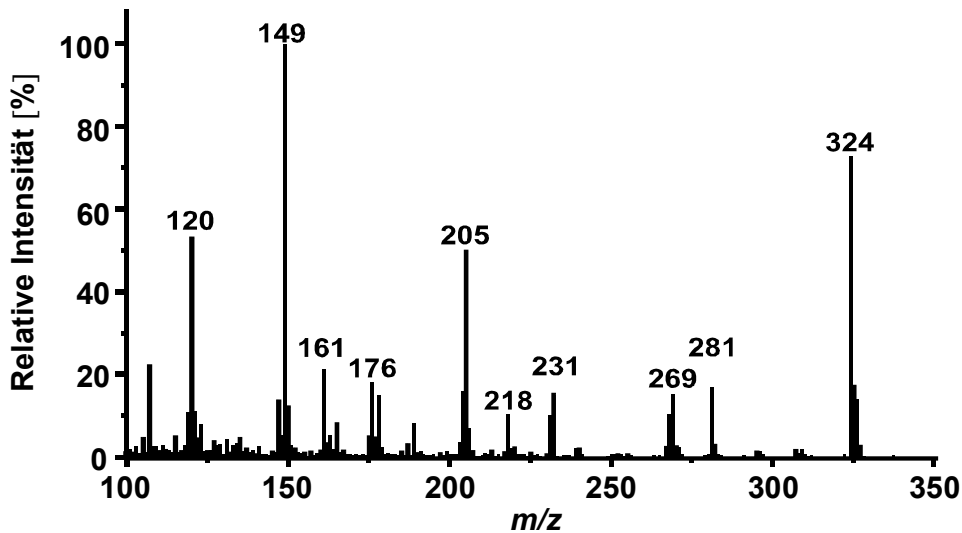


Abbildung IV.33: Massenspektrum von Isobavachalkon.

IV.4.1.2.2 PPB₁ induzieren die Biosynthese von Isobavachalkon in *C. cobalticola*

Zur Untersuchung der Wirkung von PPB₁ bezüglich der Phytoalexin-Synthese in *C. cobalticola* wurden zu 1 ml der Zellkultur jeweils 20 µl einer Konzentrationsreihe von PPB₁ Typ I und Typ II zugesetzt. Zur Kontrolle wurden der Zellkultur 20 µl der gleichen Konzentrationen an Jasmonsäure oder 20 µl Methanol zugegeben. Eine Bestimmung der vorliegenden Gehalte von Isobavachalkon war in Ermangelung eines geeigneten Standards nicht möglich. Daher wurde zur Auswertung der Anstieg des Isobavachalkon-Gehaltes gegenüber der mit MeOH behandelten Kontrolle herangezogen.

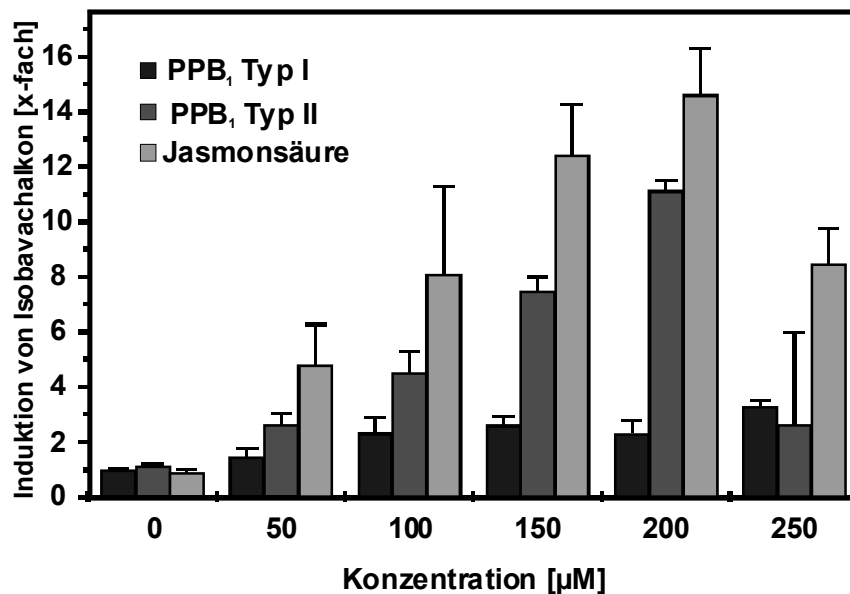


Abbildung IV.34: Induktion der Isobavachalkon-Akkumulation 36 Stunden nach Behandlung von *C. cobalticola* mit PPB₁ Typ I und Typ II und Jasmonsäure.

Die Isobavachalkon-Synthese in *C. cobalticola* wurde durch Behandlung mit PPB₁ stimuliert (Abbildung IV.34). Die Auswirkungen von PPB₁ Typ II auf die Synthese von Isobavachalkon (8,5-fache Induktion) waren etwas schwächer als die von Jasmonsäure (11-fache Induktion der Isobavachalkon-Synthese). Interessanterweise war das Regioisomer Typ I wie im Testsystem *E. californica* fast nicht aktiv (zweifache Induktion).

IV.4.1.2.3 Zeitverlauf der Induktion von Isobavachalkon

Zur Untersuchung des Zeitverlaufes der Phytoalexin-Produktion in *C. cobalticola* nach Phytoprostan-Zugabe wurde die Zellkultur mit Stereoisomeren-Gemischen von PPE₁, PPB₁ und PPF₁ versetzt. In der Versuchsreihe wurden Ansätze mit Jasmonsäure und Methanol als Kontrollen mitgeführt. Die Endkonzentration der zu untersuchenden Substanz in der Zellkultur lag jeweils bei 100 µM. Abbildung IV.35 spiegelt die Zeitverläufe der Isobavachalkon-Synthese nach Behandlung mit Phytoprostanen und Jasmonsäure wider.

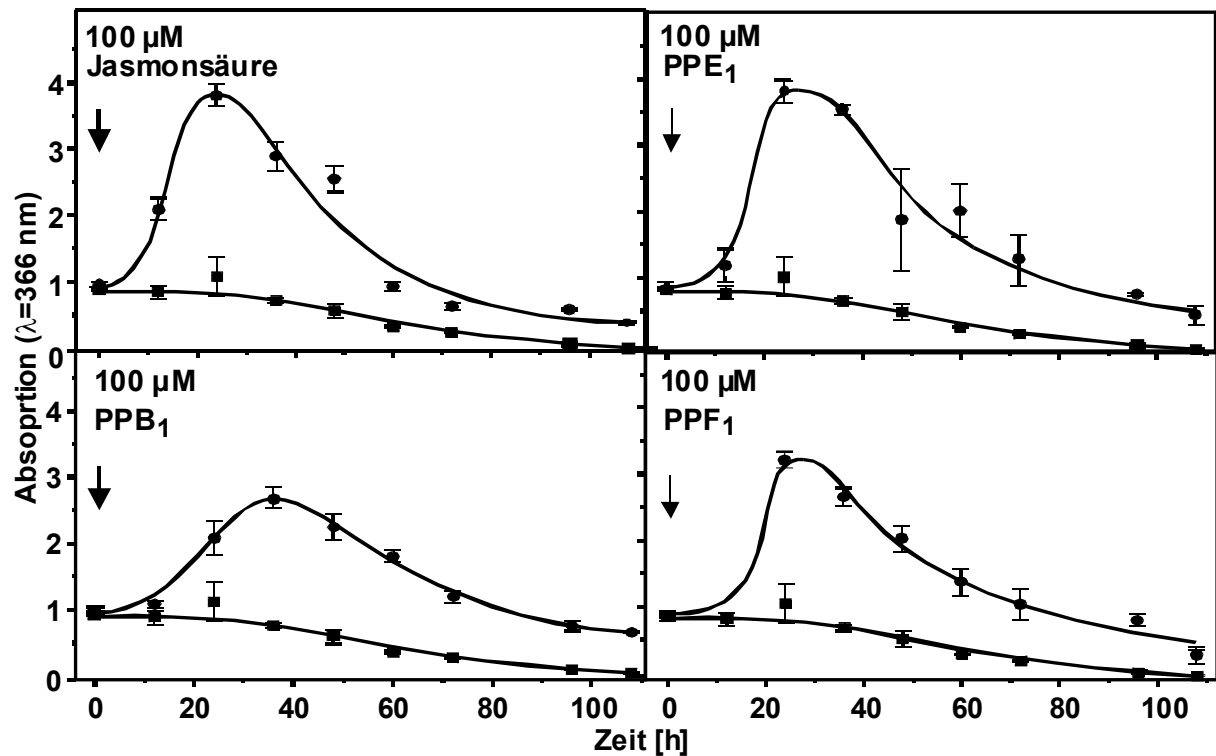


Abbildung IV.35: Zeitlicher Verlauf der Biosynthese von Isobavachalkon in *C. cobalticola* nach Behandlung mit je 100 µM Jasmonsäure, PPE₁, PPB₁ und PPF₁ (●) bzw. Methanol (■ Kontrolle).

Im Verlauf der Induktion von Isobavachalkon in *C. cobalticola* nach Behandlung mit Jasmonsäure bzw. Phytoprostanen kommt es nur zu einem transienten Anstieg des Phytoalexins, was wahrscheinlich auf eine rasche Glycosylierung des Isobavachalkons zurückzuführen ist. Dabei kommt es nach etwa 36 Stunden zur Ausbildung eines Maximums der Phytoalexin-Konzentration. Der zeitliche Verlauf der Isobavachalkon-Akkumulation nach Behandlung mit PPB₁, PPE₁ und PPF₁ ähnelt dem Zeitverlauf nach Jasmonsäure-Behandlung. Dies bestärkt die Vermutung, dass der Wirkung von Jasmonsäure und Phytoprostanen ein ähnlicher Mechanismus, nämlich gesteigerte Genexpression zu Grunde liegen könnte.

IV.4.1.3 Untersuchungen zur Induktion von Scopoletin in *Nicotiana tabacum* durch Enantiomere von PPB₁

Nicotiana tabacum (Solanaceae) produziert in Folge verschiedener Formen von Stress verstärkt das Phytoalexin Scopoletin (Sequeira, 1968; Taguchi et al., 2001). Scopoletin ist ein Hydroxycoumarinderivat und entstammt dem Phenylpropanstoffwechsel. Die Enzyme dieses Biosynthese-Weges, unter anderem Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), werden häufig im Verlauf von Abwehrreaktionen induziert (Hahlbrock and Scheel, 1989; Dorey et al., 1997).

Scopoletin wird in der Zelle durch Glycosyltransferasen zu Scopolin, einer Speicher- und Transportform umgesetzt. Die Induktion von Abwehrreaktionen, verbunden mit einem Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration in der Pflanze, führt häufig zu einer gesteigerten Exkretion von Scopolin in den Extrazellularraum. Dort setzen β -Glucosidasen das Aglykon Scopoletin frei. Scopoletin wirkt antimikrobiell (Goy et al., 1993), antiviral (Chong et al., 1999) und besitzt Radikalfänger-Eigenschaften (Chong et al., 2002), wobei es unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid oxidiert wird.

In unserem Labor konnte bereits gezeigt werden, dass *t*-BuOOH, Jasmonsäure und Phytoprostane die Scopoletin-Freisetzung induzieren (Abbildung IV.36) (Thoma et al., 2003b).

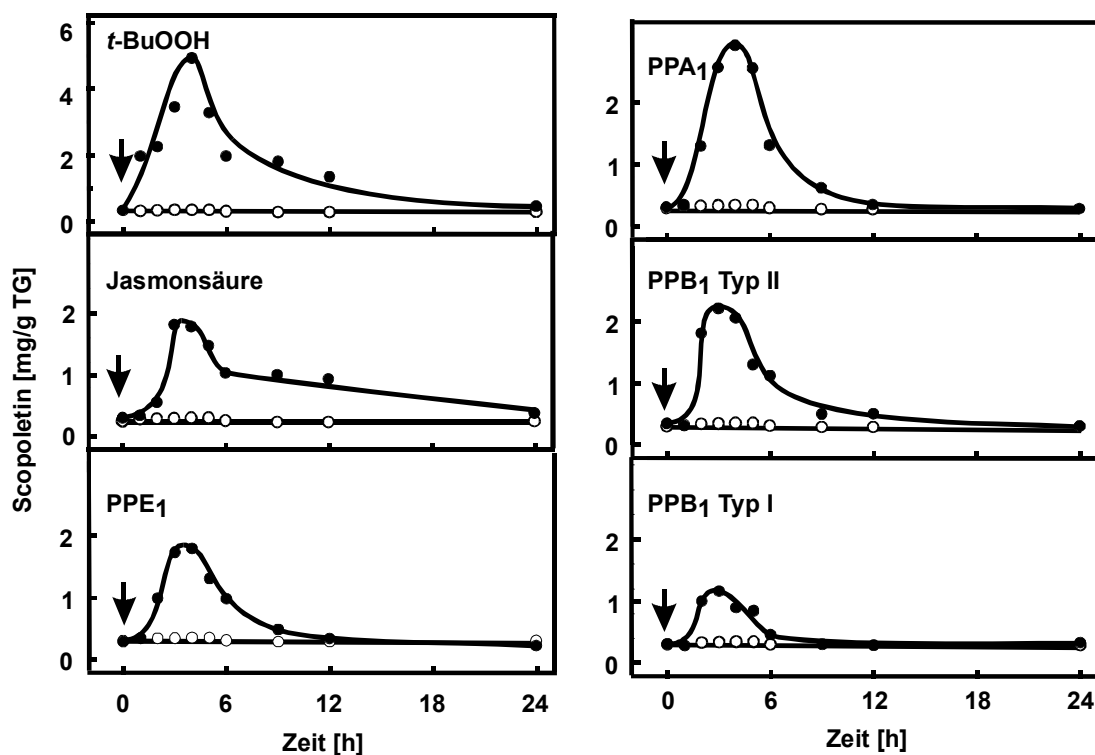


Abbildung IV.36: Zeitverlauf der Scopoletin-Akkumulation nach Behandlung mit *t*-BuOOH in einer Endkonzentration von 1 mM, sowie Jasmonsäure, PPE₁, PPA₁ und den Regioisomeren von PPB₁ in einer Endkonzentration von 10 μ M.

Die Zugabe von 10 μM PPE₁, PPA₁ und PPB₁ Typ I und Typ II zu Zellkultur von *N. tabacum* ssp. *xanthii* steigerte die Scopoletin-Konzentration im Medium innerhalb von 4 Stunden, wobei PPE₁ eine sechsfache, PPA₁ eine zehnfache, PPB₁ Typ II eine siebenfache und Typ I eine zweifache Induktion der Scopoletin-Akkumulation hervorrief. Die Behandlung der Zellkultur mit Jasmonsäure führte zu einer sechsfachen Erhöhung des Scopoletin-Gehaltes im Medium. Der Zusatz von *t*-BuOOH in einer Endkonzentration von 1 mM steigerte die Scopoletin-Konzentration auf das 16-fache.

Genauso wie in den beiden zuvor untersuchten Testsystemen *E. californica* und *C. cobalticola* wies das Regioisomer Typ II von PPB₁ auch in *N. tabacum* eine stärkere Aktivität bezüglich einer Phytoalexin-Induktion auf als das Regioisomer Typ I.

Nun sollte am Beispiel von PPB₁ geklärt werden, ob diese Abwehrreaktion spezifisch von einzelnen Isomeren der PPB₁ induziert wird oder ob die Enantiomere der beiden Typen synergistisch bzw. additiv zusammenwirken. Dazu wurden einer Zellkultur von *N. tabacum* ssp. *xanthii* die 4 Isomere von PPB₁ zugesetzt, welche über chirale HPLC aufgetrennt worden waren (IV.1.2). Für diese Auftrennung war eine Derivatisierung der Carboxylgruppe notwendig gewesen, weshalb die enantiomerenreinen PPB₁ als Methylester (MePPB₁) vorlagen. Eine Methylierung könnte jedoch die Wirksamkeit der Substanzen, z.B. durch veränderte Kinetik aufgrund erleichterter Diffusion der Verbindungen in die Zellen beeinflussen, weshalb für die Positivkontrolle an Stelle von Jasmonsäure Methyljasmonat ausgewählt wurde.

6 ml einer Zellkultur wurde mit 25 ml LS-Medium versetzt und 3 Tage unter Standardbedingungen (II.1.1) kultiviert. Anschließend wurden jeweils 10 ml der Zellkultur in sterile 30 ml-Erlenmeyerkolben überführt und 2 Stunden stehengelassen. Dieses Vorgehen war notwendig, da *N. tabacum*-Zellkultur auf den Transfer in ein anderes Kulturgefäß mit einer Scopoletin-Freisetzung reagiert. Der Scopoletin-Gehalt hatte sich nach 2 Stunden wieder auf den Basalwert der mitgeführten Kontrolle reduziert.

Ein Aliquot (10 ml) der Zellkultur wurde abzentrifugiert und das Verhältnis von Medium zu Zellen bestimmt. Das Volumen des Mediums wurde herangezogen, um die einzusetzende Menge an methylierten PPB₁ bzw. Methyljasmonat zu berechnen. Die Zellen wurden zur Trockengewichtsbestimmung gewogen und bei 80°C über 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet.

Die restlichen Zellkultur-Aliquots wurden mit den Enantiomeren von MePPB₁ in einer Endkonzentration von 10 μM versetzt und in Erlenmeyerkölbchen 4 Stunden inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels HPLC wie unter III.2.2.2. beschrieben. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abbildung IV.37 dargestellt.

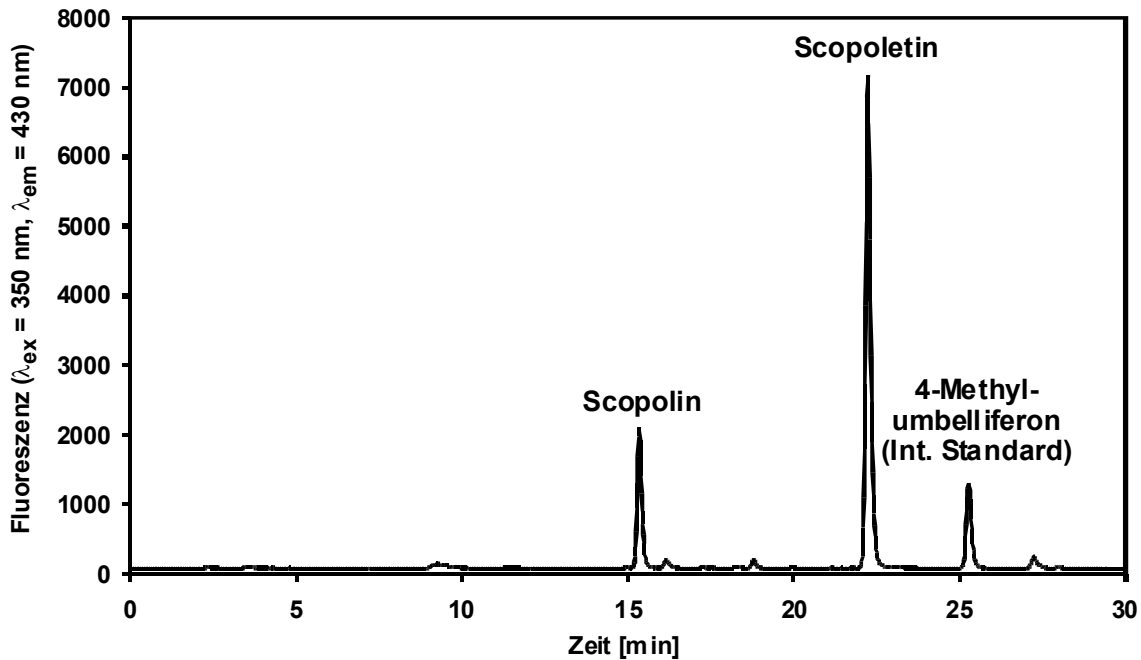


Abbildung IV.37: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm eines Extraktes von *Nicotiana tabacum*-Zellkultur nach Behandlung mit Methyljasmonat. Trennbedingungen siehe III.2.2.2. Chromatogramme von Extrakten einer Zellkultur nach Behandlung mit MePPB₁ wiesen keine wesentlichen Unterschiede zu oben abgebildetem Chromatogramm auf.

Die jeweilige Konzentration an Scopoletin wurde anhand des internen Standards 4-Methylumbelliferon berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung IV.38 zusammengefasst.

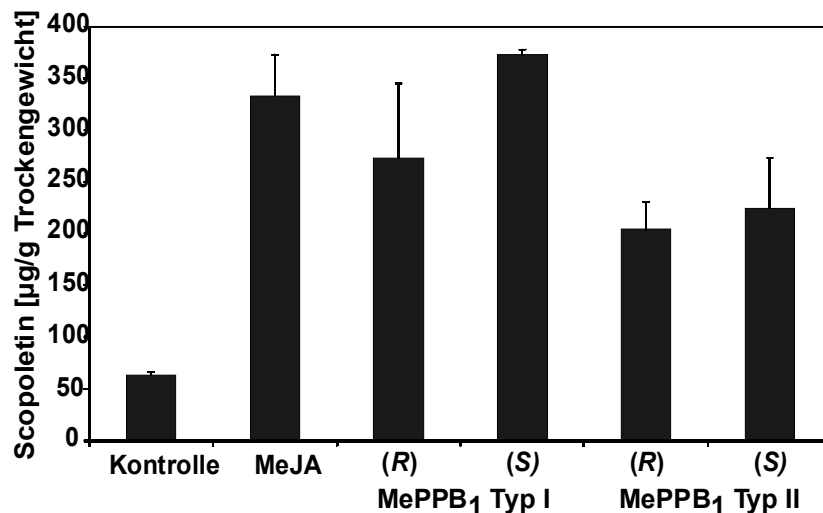


Abbildung IV.38: Induktion von Scopoletin in *N. tabacum*-Zellkultur. Das Diagramm zeigt den Anstieg von Scopoletin 4 Stunden nach Behandlung mit 10 µM der methylierten Enantiomere von PPB₁ und Methyljasmonat. Die Balken geben den Mittelwert ±SD (n=5) an.

Nach Zugabe aller 4 Isomere von MePPB₁ konnte man einen deutlichen Anstieg der Scopoletin-Konzentrationen erkennen. Ein Vergleich der Enantiomere zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen (R)- und (S)-konfigurierten MePPB₁ (t-Test = 0,28,

zweiseitig getestet). Die Behandlung der Zellkultur mit MePPB₁ Typ I führte zu einer 4,3-fachen Induktion durch das (*R*)-konfigurierte Enantiomer und einer 5,9-fachen Induktion durch das (*S*)-konfigurierte Enantiomer. Die Zugabe des (*R*)-konfigurierten Enantiomers von MePPB₁ Typ II bewirkte eine 3,2-fache Induktion der Scopoletin-Freisetzung, die des (*S*)-konfigurierten Enantiomers eine 3,5-fache Induktion.

Ein Vergleich der Induktion der Scopoletin-Freisetzung durch MePPB₁ mit der Induktion durch Methyljasmonat zeigte, dass die Wirkung der Phytoprostan-Derivate in diesem Testsystem nicht an die Wirkung von Methyljasmonat (5,3-facher Anstieg der Scopoletin-Konzentration) heranreichte.

Außerdem fiel auf, dass in dieser Untersuchung das Regioisomer Typ I stärker aktiv war als Typ II. Dieses Ergebnis war überraschend, da in vorangegangenen Experimenten im *N. tabacum*-Testsystem Typ II das aktivere Isomer darstellte (Thoma et al., 2003b), wie es auch in *E. californica* (IV.4.1.1.5) und *C. cobalticola* (IV.4.1.2.2) gezeigt worden war. Diese Experimente waren jedoch mit freien PPB₁ und Jasmonsäure durchgeführt worden, wohingegen in hier beschriebenem Experiment methylierte Verbindungen eingesetzt worden waren. Eine Methylierung könnte die Aufnahme oder den Metabolismus der Verbindungen beeinflussen. Möglicherweise liegt dadurch nach Zusatz von MePPB₁ mehr Regioisomer Typ I im Vergleich zu Typ II in den Zellen vor, als nach Behandlung mit gleichen Konzentrationen nicht methylierter Phytoprostane.

IV.4.2 PPA₁ und PPB₁ induzieren die Jasmonsäure-Biosynthese nicht

Da Phytoprostane ebenso wie die Jasmonate die Phytoalexin-Synthese in den Testsystemen *E. californica*, *C. cobalticola* und *N. tabacum* induzieren (siehe IV.4.1), wäre es denkbar, dass Phytoprostane ihre Wirkung über Jasmonsäure vermitteln. So wäre es möglich, dass Phytoprostane die Biosynthese von Jasmonsäure stimulieren und die verstärkte Phytoalexin-Synthese durch die erhöhte Jasmonsäure-Konzentration ausgelöst wird.

Um dies zu untersuchen, wurden einer Zellkultur von *N. tabacum* ssp. *xanthii* PPA₁, PPB₁ Typ I und Typ II in einer Endkonzentration von 50 µM bzw. Methanol (Kontrolle) zugesetzt und der Jasmonsäure-Gehalt nach 1,5 Stunden analysiert (vergleiche III.3.1).

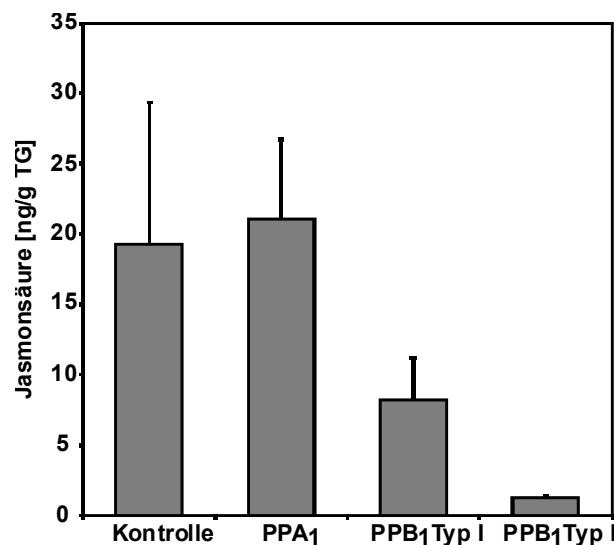


Abbildung IV.39: Jasmonsäure-Konzentration in einer Zellkultur von *Nicotiana tabacum* nach Behandlung mit Methanol (Kontrolle) bzw. 50 µM PPA₁, PPB₁ Typ I oder Typ II. Die Balken repräsentieren den Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

Es konnte gezeigt werden, dass weder PPA₁ noch PPB₁ Typ I oder Typ II die Jasmonsäure-Konzentration in der Zellkultur stimulierten. Darüberhinaus wurde durch Zusatz von PPB₁ der Jasmonsäure-Gehalt in der Zellkultur von 19 ng/g TG in der Kontrolle auf 8 ng/g TG (Typ I) bzw. 1 ng/g TG (Typ II) reduziert. Ob dies auf eine Hemmung der Jasmonsäure-Synthese durch PPB₁ zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass PPA₁ oder PPB₁ ihre Aktivität über die Bildung von Jasmonsäure vermitteln. Dieses Ergebnis wird von der Tatsache untermauert, dass die Behandlung von Zellkulturen von *N. tabacum* mit 1 mM *t*-BuOOH zu keiner Verstärkung der Jasmonsäure-Biosynthese führt, wohingegen die PPE₁ und PPA₁/PPB₁-Konzentrationen durch diese Behandlung deutlich gesteigert wurden (Thoma et al., 2003b). Auch dies zeigt – wenn auch indirekt – dass unter dem Einfluss von ROS bzw. *t*-BuOOH PPA₁/PPB₁ verstärkt gebildet werden, diese aber nicht die Biosynthese von Jasmonsäure induzieren.

IV.4.3 PPA₁ und PPB₁ induzieren den Schluss von Stomata in *Vicia faba*

Die Bedeutung von Wasserstoffperoxid in der pflanzlichen Abwehr und seine Position in der Signaltransduktion wurden in der Literatur mehrfach diskutiert (Lamb and Dixon, 1997; Hancock et al., 2001; Neill et al., 2002a). Dabei wird häufig auch die Rolle von Wasserstoffperoxid bei dem Schluss von Stomata durch Abscisinsäure (ABA) und Elicitoren behandelt. Sowohl ABA als auch Pathogenbefall induzieren die Wasserstoffperoxid-Bildung, was wiederum den Schluss von Stomata stimuliert (Cross and Jones, 1986; (Pei et al., 2000). Da oxidativer Stress die Bildung von Phytoprostanen verstärkt (Parchmann, 1999; Imbusch and Mueller, 2000a; Thoma et al., 2003b), entstehen diese Oxylipine möglicherweise auch im Lauf der oben beschriebenen Signaltransduktion.

Darüber hinaus wurde eine Modulation der Stomataweite durch Prostaglandine und Jasmonsäure, welche mit den Phytoprostanen strukturell verwandt sind, beschrieben (Beltrano et al., 1997; Herde et al., 1997; Jin and Wu, 1999). Daher ist es vorstellbar, dass Phytoprostane ebenfalls Einfluss auf die Stomata-Schließung ausüben könnten.

Um den Einfluss von Phytoprostanen auf Stomata zu untersuchen, wurden 4 Wochen alte Pflanzen von *Vicia faba* (Fabaceae) aus dem Gewächshaus verwendet. Von der Blattunterseite ausgewachsener Blätter wurden mit einer Pinzette vorsichtig Epidermisstreifen abgezogen und in Pufferlösung (50 mM Mes/Tris pH 5,6; 50 mM KCl) eingelegt. Die Pufferlösung enthielt 0,1 mM CaCl₂, da für die Schließung von Stomata Ca²⁺-Ionen essentiell sind. Der Pufferlösung wurden methanolische Lösungen von PPA₁, PPB₁, PGA₁, Jasmonsäure, PGB₁, ABA, Linolensäure oder Linolsäure bis zu einer Endkonzentration von je 100 µM, sowie Methanol für den Kontrollansatz zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation unter Tageslicht wurde die Spaltöffnungsweite der Schließzellen (Abbildung IV.40A) unter einem Mikroskop vermessen. Bei jedem Ansatz wurden 200 Stomata von verschiedenen Blättern vermessen, wobei jedes Experiment dreimal durchgeführt wurde. Die Daten wurden mit dem Mann und Whitney U-Test (p > 0.0001) ausgewertet. Jeder Datenpunkt steht für einen Mittelwert aus 600 Stomataöffnungen, die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert des Standardfehlers (Abbildung IV.40

Abbildung IV.40B).

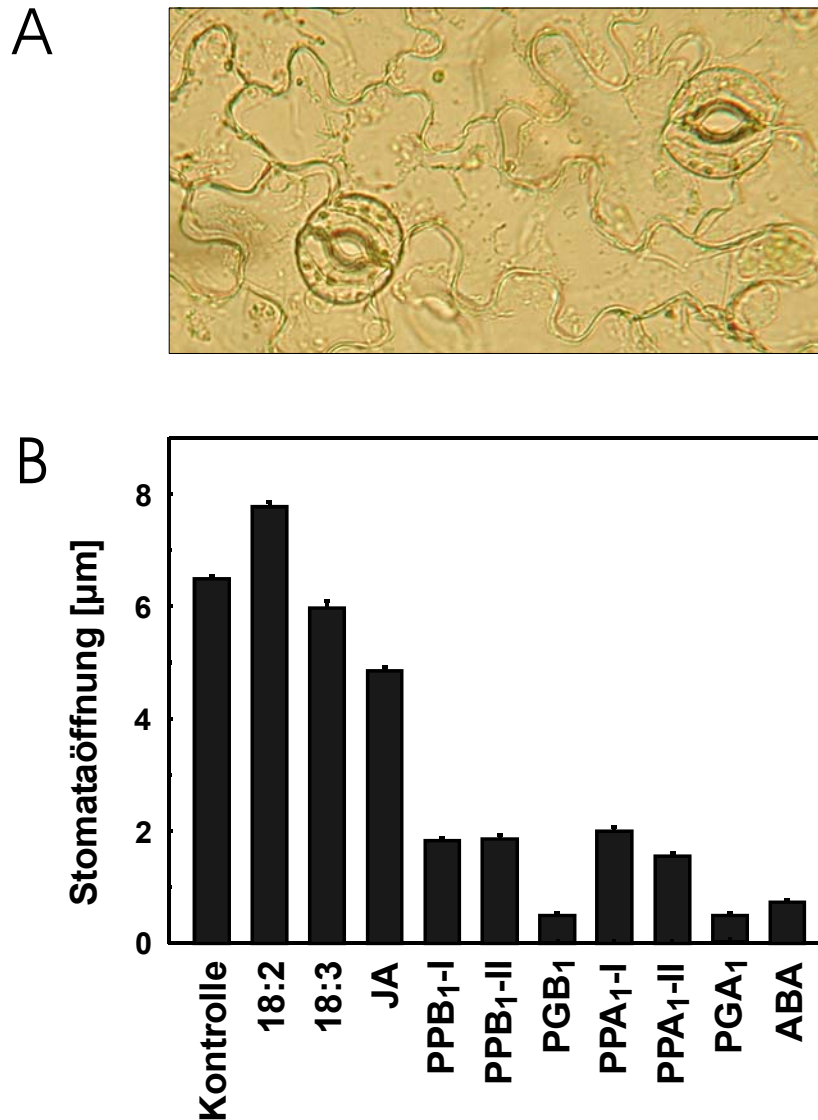


Abbildung IV.40: (A) Spaltöffnungen von *Vicia faba*. (B) Stomataweite nach einstündiger Inkubation in Methanol (Kontrolle) bzw. 100 µM Testlösungen von Linolsäure, Linolensäure, Jasmonsäure, PPB₁ Typ I und Typ II, PGB₁, PPA₁ Typ I und Typ II, PGA₁ und Abscisinsäure. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert aus 600 Messungen ± SE dar.

Der Zusatz von Abscisinsäure führte wie erwartet zu einer Schließung der Stomata, wobei die Öffnungsweite 11% im Vergleich zur Stomataöffnung in den Kontrollansätzen (100%), welche nur mit Methanol versetzt worden waren, betrug. Nach Behandlung mit Prostaglandinen A₁ und B₁ schlossen sich die Spaltöffnungen ebenfalls (7% und 8% der Stomataweite im Vergleich zum Kontrollansatz). Der Zusatz von PPA₁ führte zu einer Verengung der Spaltöffnung auf 31% durch Typ I und auf 24% durch Typ II. PPB₁ Typ I und Typ II verursachten jeweils eine Schließung auf 29% der Stomataweite im Kontrollansatz. Phytoprostane waren also fast genauso aktiv, wie ABA in der Positivkontrolle. Allerdings wurden Abscisinsäure und Phytoprostane in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt. Um die Wirkstärke vergleichen zu können, muss die Konzentrationsabhängigkeit bestimmt werden. Dies war im Rahmen dieser Untersuchung jedoch nicht weiter untersucht worden.

Es konnte keine signifikante Stereospezifität durch die unterschiedlichen Regioisomere festgestellt werden. Dies veranlasste uns zu der Frage, inwieweit dieses System spezifisch auf Fettsäure-Derivate reagiert. Daher testeten wir Jasmonsäure, sowie Linolen- und Linolsäure auf ihre Aktivität (

Abbildung IV.40). Die Zugabe von Jasmonsäure und Linolensäure hatte nur einen geringen Effekt auf die Spaltöffnungen (75% und 92% im Vergleich zur Öffnungsweite der Kontrollen), der Zusatz von Linolsäure veranlasste sogar eine verstärkte Öffnung der Stomata (120% im Vergleich zum Kontrollansatz).

Die Weite von Spaltöffnungen kann also durch die Zugabe von Phytoprostanen reguliert werden. Spaltöffnungen stellen die Eintrittspforte für Gase in das Pflanzengewebe dar, hier wird auch der Einstrom von Sauerstoff in das Gewebe kontrolliert. Es könnte hier also ein negativer Rückkopplungsmechanismus vorliegen: Bei hoher Konzentration an Sauerstoff entstehen aufgrund der Tätigkeit der Mitochondrien vermehrt ROS (Vranova et al., 2002), welche in hohen Konzentrationen wiederum zu einer Induktion des PPE₁-Biosyntheseweges führen. Durch den daraus resultierenden Schluss der Spaltöffnungen könnten Phytoprostane demnach an der Reduktion des Sauerstoffeinstroms beteiligt sein und so die erhöhte ROS-Produktion senken.

IV.5 Bestimmung von Phytoprostanen in Blütenpollen

Die bisher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten sich mit dem Vorkommen von PPA₁ und PPB₁ und ihrer Wirkung in Pflanzen beschäftigt. Aufgrund der ähnlichen Strukturen von Phytoprostanen und Prostaglandinen, welche potente Signalstoffe in tierischen Organismen darstellen, wäre eine Aktivität von Phytoprostanen auch in Tieren vorstellbar. In Kooperation mit einer Arbeitsgruppe von Dr. V. Dirsch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München konnte gezeigt werden, dass PPA₁ und PPB₁ in tierischen Zellen die Aktivität des Transskriptionsfaktors NF-κB hemmen, und somit Apoptose auslösen können (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf schwache bronchokonstriktorische Eigenschaften von PPB₁. Die Aktivität von PPB₁ war in dieser Untersuchung vergleichbar mit der von PGB₁ (Dr. Jan Lötvall, Lung Pharmacology Group, Dep. of Respiratory Medicine and Allergology, Sahlgrenska Hospital, Göteborg).

Da schon früher gezeigt worden war, dass PPF₁ in Blütenpollen in höherer Konzentration vorkommen (Imbusch, 2001), sollten auch PPA₁/PPB₁ in Pollen vorhanden sein und durch Inhalation von Pollen in die Bronchien gelangen können.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden getrocknete und gelagerte Pollen aus Wildsammlungen von *Betula pendula* (Betulaceae) und spanische Blütenpollen (Fa. Alfred Galke GmbH, 37543 Gittelde) bezüglich ihres Gehaltes an PPA₁ und PPB₁ analysiert. Parallel wurden PPE₁ und PPF₁ bestimmt, wobei die Analyse der PPF₁ nach einer Methode von Imbusch und Müller (Imbusch and Mueller, 2000b) erfolgte.

Da Pollen eine sehr harte, undurchlässige Exine haben, wurden die Extraktionsbedingungen im Vergleich zu den vorher durchgeführten Versuchen variiert.

Zu 200 mg Pollen wurden

- 18 ml Methanol/Chloroform (2:1, v/v),
- 80 µl 1M Citronensäure,
- 0,115 mg BHT,
- 20 mg TPP sowie
- 500 ng [¹⁸O]₃-PPF₁,
- 100 ng [¹⁸O]₂-PPE₁ und
- 100 ng ¹⁸O-PPB₁ als interne Standards gegeben.

Die Mischung wurde 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend über Nacht bei RT unter ständigem Schütteln extrahiert. Die Pollen wurden 10 min bei 2900 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zur Trockene eingengt. Dieser Lipidextrakt wurde zur Bestimmung von PPA₁, PPB₁, PPE₁ und PPF₁ wie folgt aufgearbeitet: Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure (67:33:1, v/v) gewaschen. In einem ersten Elutionsschritt wurden PPA₁ und PPB₁ mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure

(33:67:1, v/v) von der 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). PPE₁ und PPF₁ wurden mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Alle Eluate wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

Die Fraktion, welche PPE₁ und PPF₁ enthielt, wurde in 100 µl Methanol aufgenommen, mit 400 µl 100 mM KOH versetzt und 15 min bei 40°C inkubiert. Dadurch wurden PPE₁ zu PPB₁ isomerisiert, wohingegen PPF₁ unter diesen Bedingungen stabil bleiben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M Citronensäure gestoppt und Phytoprostane anschließend nach Zugabe von 2 ml Wasser zweimal mit 2 ml Diethylether extrahiert. Die Etherphase wurde getrocknet, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und auf eine SiOH-SPE-Säule aufgegeben. PPE₁, welche nun als PPB₁ vorlagen, wurden mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) von der Säule eluiert. Im Anschluss daran wurden PPF₁ mit 6 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) von der Säule gespült.

PPB₁ wurden anschließend zu PFB-TMS-Derivaten umgesetzt (III.3.3.3 und III.3.3.4), während PPF₁ vor der Derivatisierung zu PFB-TMS-Derivaten katalytisch hydriert wurden (Imbusch and Mueller, 2000b).

Alle Analysen wurden über GC-MS im NICI-Modus durchgeführt, wobei die unter III.4.4.2 und III.5.2 beschriebenen Bedingungen Anwendung fanden.

	Betula pendula-Pollen	Spanische Blütenpollen
	[ng/g TG]	[ng/g TG]
PPA ₁ /B ₁	149766 ± 11434	369 ± 85
PPE ₁	14363 ± 1330	839 ± 109
PPF ₁	32440 ± 806	2390 ± 350

Tabelle IV.4: Phytoprostangehalt von Blütenpollen. Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte ± SD einer Dreifachbestimmung.

Die Phytoprostan-Konzentration in den Pollen von *B. pendula* und den spanischen Blütenpollen lag deutlich über der in anderen Pflanzenorganen, so lag z.B. der Gehalt an PPA₁/B₁ in Pollen von *B. pendula* mit 149766 ng/g TG um vier Zehnerpotenzen über dem in Blättern (15 ng/g TG, siehe IV.2.3).

Da die Pollen käuflich erworben worden waren und somit die Dauer und die Qualität der Lagerung bis zum Zeitpunkt der Untersuchung unbekannt waren, konnte eine verstärkte Autoxidation von α-Linolensäure durch Lagerung nicht ausgeschlossen werden. Dennoch waren die Konzentrationen an Phytoprostanen in den Pollen so hoch, dass nach Inhalation von Pollen eine Wirkung von Phytoprostanen auf die Bronchien vorstellbar wäre.

V. Diskussion

V.1 Biosynthese und Metabolismus von Phytoprostanen A₁ und B₁

Freie radikal-katalysierte Peroxidation von α -Linolensäure führt zur Bildung von instabilen Endoperoxiden, den Phytoprostanen G₁ (PPG₁). Diese können in wässriger Lösung schnell zu anderen Phytoprostan-Klassen abgebaut werden. So können PPG₁ entweder zu PPF₁ reduziert oder zu PPE₁ und PPD₁ umgelagert werden. Phytoprostane F₁ und E₁ konnten bereits nach Autoxidation von Linolensäure sowie in verschiedenen Pflanzenspezies nachgewiesen werden (Parchmann, 1999; Imbusch and Mueller, 2000b). Aus PPE₁ wiederum können durch Dehydratisierung Cyclopentenon-Phytoprostane entstehen, wobei bei pH 3-4 PPA₁ und bei pH > 11 PPB₁ entsteht. Zu Beginn der Untersuchungen war unklar, ob diese Dehydratation auch *in planta*, also bei physiologischem pH-Wert stattfinden würde. Eine Gesamtbestimmung von PPA₁/PPB₁ in sechs taxonomisch entfernten Pflanzenspezies zeigte, dass PPA₁/PPB₁ in allen untersuchten Pflanzenspezies gebildet werden. Die Konzentrationen an PPA₁/B₁ im Pflanzenmaterial lagen zwischen 11 und 131 ng/g TG, wobei der Gehalt an PPA₁/PPB₁ in *A. thaliana* (131 ng/g TG) im Vergleich zu den Ergebnissen in den anderen Pflanzenspezies (11 bis 53 ng/g TG) durch einen sehr hohen Wert auffiel. Derart große Unterschiede zwischen Pflanzen verschiedener Spezies scheinen jedoch nicht ungewöhnlich zu sein. So wurden auch für die strukturverwandte 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) in einer Studie mit 26 Pflanzenspezies große Konzentrationsunterschiede gefunden (Stelmach et al., 1998). Der Gehalt an OPDA in *A. thaliana* ragte in dieser Untersuchung mit einem Spitzenwert von 1006 ng/g TG heraus, während für 20 der Pflanzenspezies Konzentrationen zwischen 4 bis 50 ng/g TG und für die restlichen 6 Spezies zwischen 200 und 1000 ng/g TG bestimmt wurde.

Die separate Bestimmung von PPA₁ und PPB₁ war methodisch sehr aufwendig und wurde daher nur exemplarisch an zwei Pflanzenspezies, *L. esculentum* und *N. tabacum*, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in beiden Spezies sowohl PPA₁ als auch PPB₁ vorlagen, wobei Phytoprostane A₁ einen Anteil von etwa 70% am vorher bestimmten Gesamtgehalt von PPA₁/PPB₁ ausmachten.

Diese Messungen lassen den Schluss zu, dass sowohl PPA₁ als auch PPB₁ ubiquitär und konstitutiv *in planta* vorkommen.

Da Phytoprostane A₁ und B₁ *in vitro* durch radikal-katalysierte Lipidperoxidation gebildet werden, sollte ihre Synthese durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auch *in vivo* induziert werden können. Daher wurden Zellkulturen von *N. tabacum* mit 1 mM *t*-BuOOH versetzt und bezüglich ihres Gehaltes an PPA₁/PPB₁ analysiert. Dabei stiegen die PPA₁/PPB₁-Konzentrationen innerhalb von einer Stunde auf das vierfache des Ausgangswertes an und waren nach 3 Stunden bereits wieder auf den basalen Wert abgesunken. Dieser rasche Anstieg der Phytoprostan-Konzentration stand im Gegensatz zu der Beobachtung, dass PPE₁-

Konzentrationen in getrocknetem Pflanzenmaterial erst nach 98 Tagen Lagerung ansteigen. Vermutlich sind in getrocknetem Pflanzenmaterial endogene Antioxidantien enthalten, welche eine Lipidperoxidation unterbinden konnten. Durch Zugabe von 1 mM *t*-BuOOH scheinen jedoch die Antioxidantien schnell verbraucht zu werden, so dass eine Lipidperoxidation und damit eine Phytoprostan-Bildung innerhalb von Minuten einsetzen kann.

Eine Überlastung antioxidativer Schutzmechanismen von pflanzlichen Zellen wird in der Literatur auch während des „oxidative burst“ in Folge von Pathogenbefall beschrieben (Vranova et al., 2002). Hier setzt wenige Minuten nach Pathogen-Befall ein dramatischer Konzentrationsanstieg von ROS und NO[•] ein (Apostol et al., 1989; Delledonne et al., 1998), welcher für die Auslösung der Hypersensitiven Reaktion verantwortlich gemacht wird. ROS und NO[•] können eine Lipidperoxidation (Halliwell and Gutteridge, 1989; Murphy, 1999) und – wie zumindest als Folge von oxidativem Stress in Zellkulturen beobachtet (IV.3.1), (Parchmann, 1999; Imbusch and Mueller, 2000a) - auch die Phytoprostan-Synthese induzieren. Um eine mögliche Phytoprostan-Synthese in Pflanzen nach Pathogenbefall zu untersuchen, wurden Blätter von *L. esculentum* mit dem perthotropen (engl: *necrotrophic*) Pilz *Botrytis cinerea* infiziert (IV.3.3). Innerhalb von 48 Stunden bildeten sich nekrotische Läsionen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Blätter geerntet und bezüglich der Konzentrationen an Phytoprostanen E₁, A₁ und B₁ analysiert. In diesem Versuch konnte erstmals eine Akkumulation von Phytoprostanen in Folge von Pathogenbefall festgestellt werden: die Konzentrationen der Phytoprostane waren auf das 3- bis 4-fache des jeweiligen Kontrollwertes gestiegen. Dabei lagen die Konzentrationen der Phytoprostane sowohl in den infizierten Blättern als auch in den Kontrollen in der gleichen Größenordnung wie der Gehalt an Jasmonsäure, welcher aus demselben Pflanzenmaterial bestimmt worden war.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass in Folge von Pathogenbefall Lipidperoxidationsreaktionen auftreten können (Rusterucci et al., 1999; Gobel et al., 2001; Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002). In verschiedenen Veröffentlichungen wurden sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatische Lipidperoxidation untersucht und deren mögliche Beteiligung an der Hypersensitiven Reaktion diskutiert. Bei der enzymatischen Lipidperoxidation werden 9(*S*)- und 13(*S*)- Hydroperoxyfettsäuren durch die Aktivität von 9- bzw. 13-Lipoxygenasen (LOX) gebildet. Durch nicht-enzymatische Lipidperoxidation können darüber hinaus auch 9(*R,S*)-; 12(*R,S*)-, 13(*R,S*)- und 16(*R,S*)- Hydroperoxyfettsäuren entstehen. Die verschiedenen Hydroperoxyfettsäuren und die entsprechenden Hydroxyoktadekatriensäuren wurden als Marker für enzymatische bzw. nicht-enzymatische Lipidperoxidation herangezogen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass 12 bis 48 Stunden nach Pathogenbefall Lipidperoxidationsprodukte akkumulierten, die zu 90% enzymatisch und zu 10% nicht enzymatisch gebildet worden waren. Theoretisch wäre es denkbar, dass die enzymatischen Lipidperoxidationsprodukte, 9(*S*)- und 13(*S*)- Hydroperoxyoktadekatriensäure (HPODE), in die Phytoprostan-Synthese eingeschleust

werden können. Dabei sind 9- und 13-HPODE Vorstufen für PPG₁ Typ II. Verbindungen vom Typ I können daraus nicht entstehen (Mueller, 1998). Die Beteiligung einer Lipoxygenase würde dementsprechend ausschließlich zur Bildung von Phytoprostanen des Typs II führen. Da *in planta* jedoch keines der Regioisomere von PPE₁, PPA₁ oder PPB₁ bevorzugt entsteht (IV.2.3), scheint es sehr unwahrscheinlich, dass die Bildung von PPG₁ enzymatisch katalysiert abläuft. Dabei ist allerdings zu beachten, dass LOX bei Sauerstoffmangel in einer Nebenreaktion Radikale bildet, welche Lipidperoxidation induzieren können. In dieser anaeroben Nebenreaktion der LOX werden Hydroperoxyfettsäuren homolytisch gespalten, wobei Alkoxy-Radikale und OH[•] entstehen (Marks and Fürstenberger, 1999). Beide Produkte dieser Reaktion können radikal-katalysierte Lipidperoxidation auslösen. Auf diese Weise könnten LOX indirekt zu der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation und somit zur Phytoprostan-Synthese beitragen (Parchmann et al., 1997).

Man kann also davon ausgehen, dass LOX nicht direkt an der Bildung von Phytoprostan G₁ beteiligt ist, sondern lediglich über anaerobe Nebenreaktionen. An der Umwandlung von PPG₁ zu PPE₁, PPF₁ und PPD₁ hingegen könnten prinzipiell Enzyme beteiligt sein. Dass die Synthese von PPE₁ *in planta* aber auch ohne enzymatische Beteiligung stattfinden kann, zeigt der bereits erwähnte Versuch zur PPE₁-Bildung in gefriergetrockneten Pfefferminzblättern (IV.2.1). Dabei wurde eine Akkumulation von PPE₁ Typ II über 198 Tage beobachtet, obwohl nach Lyophilisierung alle enzymatischen Reaktionen ausgeschlossen sein sollten. Das Regioisomer vom Typ I wurde in diesem Experiment nicht bestimmt.

Ob die Dehydratisierung von PPE₁ zu PPA₁ und die anschließende Isomerisierung zu PPB₁ in pflanzlichen Zellen ausschließlich nicht-enzymatisch ablaufen, ist noch ungeklärt. Ein spontaner Abbau von E-Ring- zu A-Ring-Verbindungen in wässriger oder proteinhaltiger Lösung ist jedoch ein bekanntes Phänomen der Prostaglandin-Chemie (Straus and Glass, 2001).

Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bildung von Phytoprostanen vermutlich *in planta*, in abgestorbenen Pflanzen sowie *in vitro* über einen radikal-katalysierten Mechanismus verläuft. Hinweise für eine Beteiligung von Enzymen wurden nicht gefunden.

Demnach deutet die Akkumulation von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ nach Infektion von *L. esculentum* mit *Botrytis cinerea* auf eine verstärkte nicht-enzymatische Lipidperoxidation hin. In dieser Pflanzen-Pathogen-Interaktion wurde die Phytoprostan-Akkumulation nach der Ausbildung nekrotischer Läsionen untersucht. Ob eine Lipidperoxidation dabei Auslöser oder Folge des Zelltodes beteiligt war, ist ungeklärt. Eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Phytoprostan-Bildung und der Bildung nekrotischer Läsionen würde bereits erste Erkenntnisse liefern. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Interaktion von *L. esculentum* mit *B. cinerea* gibt darüber jedoch keinen Aufschluss, da die eingesetzten Pilzsporen auskeimen und sich die Hyphen fortlaufend ausbreiten. Daher ist der zeitliche Verlauf der Phytoprostan-Induktion durch eine Untersuchung des gesamten Blattes nicht zu

ermitteln. In der Literatur wurden Untersuchungen zur Lipidperoxidation in verschiedenen inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen bzw. nach Elicitor-Behandlung beschrieben, wobei als Marker Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren dienten (Rusterucci et al., 1999; Gobel et al., 2001; Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002). Die Experimente zeigten, dass Lipidperoxidation 12 bis 48 Stunden nach Pathogenbefall eintritt und zu 90 % auf die Aktivität von LOX zurückzuführen ist. Dabei korrelierte die enzymatische Lipidperoxidation mit der LOX-Aktivität, mit der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation sowie mit den Symptomen der Hypersensitiven Reaktion. Die Autoren werteten dies als Hinweise auf mögliche Beteiligung von enzymatischer Lipidperoxidation an der Hypersensitiven Reaktion (Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002). Sollte Lipidperoxidation jedoch Auslöser von Programmierterem Zelltod sein, so müsste sie vor der Ausbildung der nekrotischen Läsionen, also wenige Minuten bis Stunden nach der Infektion, eintreten. In dieser frühen Phase kann allerdings keine enzymatische Lipidperoxidation eintreten, da die LOX-Aktivität in den zitierten Untersuchungen erst nach 10-12 Stunden induziert wurde (Rusterucci et al., 1999; Gobel et al., 2001; Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002). Jedoch könnten theoretischen Überlegungen zufolge durch einen dramatischen Konzentrationsanstieg von ROS während des „oxidative burst“ innerhalb von Minuten eine rasche nicht-enzymatische Lipidperoxidation erfolgen. Dieser Zeitraum wurde jedoch in den zitierten Arbeiten lediglich durch ein Messintervall von drei bis zehn Stunden abgedeckt. Wie bei dem Versuch in Zellkultur von *N. tabacum* mit *t*-BuOOH beobachtet wurde (IV.3.1), ist ein solches Messintervall zu groß, um eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation zu erfassen.

Die Untersuchungen zur Phytoprostan-Bildung *in planta* lieferten also Hinweise auf eine nicht-enzymatische Synthese dieser Verbindungen. In Pflanzen wird die Phytoprostan-Konzentration jedoch sicher nicht ausschließlich durch die radikal-katalysierte Synthese beeinflusst. Auch enzymatische Prozesse könnten an der Regulation der Phytoprostan-Konzentration beteiligt sein. Phytoprostane werden vermutlich in Membranen gebildet (Imbusch and Mueller, 2000a), wie es auch für die tierischen Analoga, die Isoprostane, angenommen wird (Morrow et al., 1992a; Chen et al., 1999). Isoprostane und andere oxidierte Lipide werden in tierischen Membranen durch Lipasen aus Phospholipiden freigesetzt (Morrow et al., 1992b). Genauso könnten noch nicht identifizierte Lipasen Phytoprostane aus pflanzlichen Lipiden herauslösen. Hier könnten Phospholipasen A₂ eine Rolle spielen, da es Beispiele für eine rasche Induktion einer Phospholipase A₂ in Folge von Pathogenbefall gibt (Dhondt et al., 2000). Es ist allerdings unklar, ob diese Phospholipase A₂ auch oxidierte Lipide, wie beispielsweise präformierte Phytoprostane, aus Membranen freisetzen kann und ob sie in der untersuchten Pflanzen-Pathogen-Interaktion eine Rolle spielt.

Neben einer möglichen enzymatischen Freisetzung von Phytoprostanen aus Membranen wäre eine Regulation der Phytoprostan-Konzentration durch Metabolismus vorstellbar. Daher wurden Untersuchungen zum Abbau von PPB₁ in Zellkulturen von *E. californica* durchgeführt. Die Konzentration zugesetzter PPB₁ Typ I und Typ II im Medium der

Zellkultur sank innerhalb von zwei Stunden auf 2% des Ausgangswertes und verblieb bis zum Ende des Versuchszeitraumes auf dem niedrigen Niveau. In zellfreiem Medium hingegen waren PPB₁ über den gesamten Zeitraum der Untersuchung stabil. Für den PPB₁-Verlust aus dem Medium war also die Anwesenheit von Zellen notwendig, wobei eine Akkumulation von PPB₁ in den Zellen nicht messbar war. Es ist denkbar, dass PPB₁ entweder unter dem Einfluss von Enzymen, die die Zellen nach außen abgaben, abgebaut wurden oder dass sie in die Zellen aufgenommen und dort sehr schnell metabolisiert wurden.

Die Metabolisierung von Cyclopentenon-Phytosteranen könnte in Pflanzen analog zu der von Cyclopentenon-Isoprostanen in Tieren verlaufen. In Tieren werden Isoprostane A₂ rasch durch Konjugation an Glutathion inaktiviert, eine Reaktion, die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird (Chen et al., 1999).

In Pflanzen werden *Gst*-Gene durch einen „oxidative burst“ und elektrophile Moleküle induziert. Die *Gst1*-Expression wird in *Arabidopsis thaliana* durch OPDA, nicht aber durch Jasmonsäure verstärkt (Stintzi et al., 2001). OPDA unterscheidet sich von Jasmonsäure durch eine funktionelle Gruppe, die auch die Cyclopentenon-Phytosterane aufweisen: eine α,β -ungesättigte Carbonylfunktion. Dieses Strukturelement scheint essentiell für die Induktion von *Gst1* in *A. thaliana* zu sein (Vollenweider et al., 2000). Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe die Aktivierung des *Gst1*-Promotors in Blättern von *A. thaliana* auch nach Infiltration von PPA₁ bzw. PPB₁ beobachtet werden (Thoma et al., 2003b). PPA₁ und PPB₁ stimulieren also ein Entgiftungssystem für elektrophile Moleküle und damit vermutlich auch ihren eigenen Metabolismus.

Die Untersuchungen des ersten Arbeitsabschnittes zeigten, dass PPE₁, PPA₁ und PPB₁ in Pflanzen gebildet werden und in ihrer Konzentration moduliert werden können. Phytosterane können nicht nur durch abiotische Stimuli (oxidativer Stress) gesteigert sondern auch durch bestimmte Pathogene, z.B. eine Infektion von *L. esculentum* mit *B. cinerea*, induziert werden. Dabei verläuft die Biosynthese vermutlich über einen radikal-katalysierten Mechanismus. Interessanterweise werden die enzymatisch gebildeten Jasmonate in der gleichen Größenordnung wie die Phytosterane gebildet. Dies wurde sowohl bei der Untersuchung von basalen Werten in nicht-stimulierten Pflanzen als auch nach Induktion der Oxylin-Konzentrationen in der untersuchten Pflanzen-Pathogen-Interaktion festgestellt (jeweils 3-4 fache Induktion von PPE₁, PPA₁, PPB₁ und Jasmonsäure). Dies deutet auf eine parallele Bildung von Phytosteranen und Jasmonaten hin. Nach Behandlung von Tabak-Zellkulturen mit *t*-BuOOH hingegen wird selektiv die Bildung der Phytosterane A₁ und B₁ verstärkt. Eine Akkumulation von Jasmonsäure fand hier nicht statt. Dies zeigt, dass die Bildung der Phytosterane in Abhängigkeit vom Stimulus gleichzeitig, aber auch unabhängig von der Biosynthese der Jasmonate erfolgen kann. Hier existieren vermutlich zwei selbständige Biosynthesewege nebeneinander, wobei die Jasmonsäure-Biosynthese durch

Interaktion von extrazellulären Liganden mit membranständigen Rezeptoren und die Phytoprostan-Bildung durch erhöhte ROS-Konzentrationen induziert wird.

V.2 Biologische Aktivität von Phytoprostanen

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Phytoprostane lediglich als „Abfallprodukte“ einer Membranschädigung durch oxidativen Stress entstehen oder ob sie biologische Aktivität besitzen. Cyclopentenon-Phytoprostane, insbesondere PPA₁, sind mit Jasmonaten strukturell verwandt und kommen in *L. esculentum* in annähernd gleicher Konzentration wie die Jasmonate vor (IV.2.5). Jasmonsäure und ihr biosynthetischer Vorläufer OPDA sind etablierte Signalstoffe mit wichtigen Funktionen in der pflanzlichen Abwehr, der Entwicklung von Pflanzenorganen und in der Fortpflanzung (Liechti and Farmer, 2002). Eine biologische Eigenschaft von Jasmonaten ist die Induktion der *de novo*-Synthese von antimikrobiell wirkenden, sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Phytoalexinen) (Gundlach, 1992; Mueller et al., 1993). Phytoalexine gehören keiner einheitlichen Stoffklasse an, sondern umfassen ganz unterschiedliche Naturstoffklassen. So akkumulieren nach Jasmonsäure-Behandlung z.B. in *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae) Benzophenanthridin-Alkaloide, in *Crotalaria cobalticola* (Fabaceae) Isobavachalkon und in *N. tabacum* (Solanaceae) das Cumarin-Derivat Scopoletin (Gundlach, 1992).

Zellkulturen von *E. californica* wurden bereits in verschiedenen Studien als Testsystem eingesetzt, um die Aktivität von Jasmonaten bzw. Jasmonat-ähnlichen Verbindungen zu untersuchen (Schuhmacher et al., 1987; Gundlach et al., 1992; Haider et al., 2000). Der Einsatz eines Isomeren-Gemisches von PPE₁ in dieses Testsystem zeigte, dass Phytoprostane E₁ die Phytoalexin-Akkumulation induzieren können (IV.4.1.1). Die Phytoprostane waren dabei in dem gleichen Konzentrationsbereich (10 µM bis 250µM) wirksam, wie die als Kontrolle eingesetzte Jasmonsäure. Dies war ein sehr interessantes Ergebnis, da PPE₁ den untersuchten Pflanzen in ähnlicher Konzentration wie die Jasmonsäure vorkommen (Parchmann, 1999) und darüber hinaus nach Befall von *L. esculentum* mit *B. cinerea* in gleichem Maß induziert wurden.

Bei der Interpretation der Daten, die unter Verwendung des Isomerengemisches von PPE₁ erhalten wurden, muss jedoch berücksichtigt werden, dass PPE₁, die durch Autoxidation von α -Linolensäure hergestellt wurden, lediglich eine Reinigung über Säulenchromatographie und präparative Dünnschichtchromatographie erfahren hatten. Durch die Herstellungsmethode konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in dem Gemisch neben den Isomeren von PPE₁ noch andere Autoxidationsprodukte der α -Linolensäure enthalten waren, die möglicherweise ebenfalls biologisch aktiv sein könnten. Daher sollen zukünftig totalsynthetisch hergestellte, reine Phytoprostane in den Bioassays verwendet werden. PPE₁ sind gegenwärtig noch nicht verfügbar, PPF₁ wurden vor kurzem als erste Phytoprostane totalsynthetisch hergestellt und stehen uns jetzt zur Verfügung (El Fangour et al., 2003). Die partialsynthetisch hergestellten

und über HPLC aufgetrennten Regioisomere von PPA₁ und PPB₁ sind frei von weiteren, möglicherweise biologisch aktiven Komponenten. Diese Verbindungen wurden mittels HPLC, GC-MS und im Fall von PPB₁ auch mittels NMR auf Reinheit überprüft.

Wie das Isomerengemisch von PPE₁ wurden auch die Regioisomere von PPA₁ und PPB₁ der Zellkultur von *E. californica* zugesetzt und die Benzophenanthridin-Synthese beobachtet. Dabei wiesen interessanterweise die Regioisomere der Typen I und II von PPA₁ und PPB₁ quantitative Unterschiede in der Aktivität auf. Während die Behandlung der Zellkultur mit Typ II einen starken Anstieg der Benzophenanthridin-Alkaloid-Konzentrationen hervorrief, änderte sich der Alkaloidgehalt nach Zugabe von Typ I kaum. Es zeigte sich also, dass die Alkaloid-Synthese in *E. californica* spezifisch von den Regioisomeren des Typs II ausgelöst wird.

Untersuchungen des Benzophenanthridin-Musters nach Behandlung mit Jasmonsäure und PPB₁ Typ II lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Beide Oxylipine stimulierten die Biosynthese von Sanguinarin, Chelirubin und in geringerem Maß auch von Macarpin. Diese Übereinstimmung in den Wirkungen von Jasmonsäure und den aktiven Regioisomeren von PPB₁ ist ein Hinweis auf gleiche Signaltransduktionswege der beiden Oxylipin-Klassen.

Darüber hinaus fiel auf, dass sich die Zellen insbesondere nach Behandlung mit hohen Konzentrationen ($\geq 200 \mu\text{M}$) von PPA₁ Typ II entfärbten. Dieser Effekt korrelierte mit einer Abnahme des Alkaloid-Gehaltes im Vergleich zu den Proben, denen $150 \mu\text{M}$ oder weniger PPA₁ Typ II zugesetzt worden war. Dieses Phänomen konnte durch das Absterben der Zellen während der 5-tägigen Versuchsdauer erklärt werden. Ob es sich hierbei um direkte toxische Effekte oder um programmierten Zelltod handelte, ist noch ungeklärt.

Interessanterweise können die Cyclopentenon-Prostaglandine PGA₂ und dPGJ₂ in tierischen Organismen eine Form des programmierten Zelltods – Apoptose – durch Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B auslösen (Kim et al., 1993; Rossi et al., 2000; Castrillo et al., 2003). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. V. Dirsch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München konnte gezeigt werden, dass PPA₁ ebenfalls Apoptose, hervorgerufen durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auslösen können (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Induktion der Phytoalexin-Synthese um einen spezifischen Effekt in *E. californica* handelt, wurde das Experiment mit einer anderen Zellkultur wiederholt. Dazu wurde mit *C. cobalticola* eine taxonomisch entfernte Pflanzenspezies ausgewählt, welche Phytoalexine, hauptsächlich Isobavachalkon, bildet, welche aus dem Phenylpropanstoffwechsel stammen (Dixon et al., 2002). Auch die Zellkultur von *C. cobalticola* wurde mit steigenden Konzentrationen von PPB₁-Regioisomeren und Jasmonsäure versetzt. Wie bereits zuvor in *E. californica* beobachtet, wurde die Isobavachalkon-Synthese in *C. cobalticola* durch PPB₁ Typ II genauso stark induziert wie durch Jasmonsäure, während Typ I nahezu inaktiv war.

Auch an Zellkulturen von *N. tabacum* wurde nach Zusatz von PPE₁, PPA₁, PPB₁ Typ II und Typ I die Phytoalexin-Akkumulation untersucht, wobei im Medium der Zellkultur Scopoletin akkumulierte (Thoma et al., 2003b). Während die Behandlung mit PPB₁ Typ I nur zu einem schwachen Anstieg der Scopoletin-Konzentration führte, waren PPE₁, PPA₁ und PPB₁ Typ II auch in diesem System mindestens genauso wirksam wie Jasmonsäure.

In allen drei Systemen war die Wirkung von PPB₁ Typ II deutlich stärker ausgeprägt als die von PPB₁ Typ I (Abbildung V.1). Erstere reichte sogar an die Aktivität von Jasmonsäure heran.

	PPB ₁ Typ I	PPB ₁ Typ II	Jasmonsäure
Benzophenanthridin-Alkaloide (<i>E. californica</i>) (x-facher Anstieg)	1,5	5	5
Isobavachalkon (<i>C. cobalticola</i>) (x-facher Anstieg)	2	8,5	11
Scopoletin (<i>N. tabacum</i>) (x-facher Anstieg)	2	7	6

Abbildung V.1: Maximale Induktion der Phytoalexin-Akkumulation in verschiedenen Zellkulturen nach Zusatz von PPB₁ Typ I, II und Jasmonsäure.

Vermutlich ist die Fähigkeit, eine Phytoalexin-Akkumulation in den vorgestellten Systemen zu induzieren, abhängig von der Länge der Seitenketten der Phytoprostane. Die Substituenten am Ringsystem scheinen eine weniger ausgeprägte Rolle zu spielen, da auch PPA₁ und PPE₁ die Phytoalexin-Synthese in *E. californica* und *N. tabacum* induzieren konnten.

Die Seitenketten der Phytoprostane besitzen ein Stereozentrum am C16 (Typ I) bzw. C9 (Typ II), welches mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist. Die Konfiguration dieser funktionellen Gruppe ist ein Strukturmerkmal, welches Einfluss auf die biologische Aktivität der Verbindung ausüben könnte.

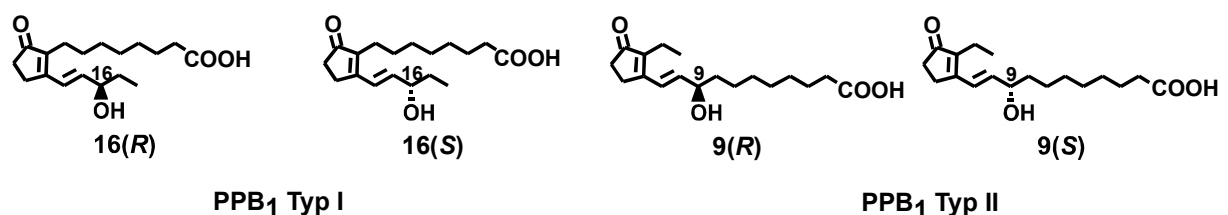


Abbildung V.2: Isomere Strukturen von PPB₁.

Um dies zu untersuchen, wurden die vier Isomere – ein Enantiomerenpaar je Regioisomer – von PPB₁ isoliert, wobei die Phytoprostane aus methodischen Gründen methyliert wurden. Anschließend wurden MePPB₁ mittels Circular dichroismus charakterisiert und ihre Wirksamkeit im Testsystem *N. tabacum* bezüglich der Scopoletin-Akkumulation überprüft. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der biologischen Wirksamkeit von (*R*)- und (*S*)-konfigurierten MePPB₁ festgestellt werden. Die Stellung der Hydroxygruppe der Seitenkette hat also keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von PPB₁ bezüglich der Akkumulation von Scopoletin.

Auffällig war, dass in diesem Experiment die Regioisomere des Typs I stärker wirksam waren als die des Typs II. Dieses Ergebnis stand in Gegensatz zu den Befunden mit den freien Säuren aus den vorherigen Experimenten in diesem Testsystem. Im Unterschied zu den Untersuchungen mit den freien PPB₁ waren hier jedoch methylierte Verbindungen eingesetzt worden. Methylester werden in Zellen häufig sehr rasch enzymatisch hydrolysiert, wie es beispielsweise bei Jasmonsäure, welche aus Methyljasmonat freigesetzt wird (Stuhlfelder et al., 2002), der Fall ist. Eine Substrat-Spezifität einer solchen Esterase für Phytoprostane vom Typ I könnte das Konzentrationsverhältnis der freien Phytoprostan-Regioisomere zugunsten des Typ I verschieben und so die erhöhte Wirksamkeit des Typs I in diesem Experiment erklären.

Vorstellbar wäre auch, dass freie Phytoprostane in Analogie zu den tierischen Prostaglandinen über spezifische Transporter in die Zelle gelangen. Dabei könnte die Transportrate für einzelne Isomere differieren, wodurch Regioisomere des Typs II in den Zellen stärker akkumulieren. Methylester hingegen können vermutlich aufgrund ihrer Lipophilie in Zellen diffundieren, wobei hier kein Unterschied zwischen den Isomeren zu erwarten ist. Dies könnte die unterschiedlich stark ausgeprägte Wirkstärke von freien Phytoprostanen und die nahezu gleiche Wirksamkeit der methylierten Phytoprostane erklären.

In den untersuchten Testsystemen wurde neben der Konzentrationsabhängigkeit der biologischen Aktivität von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ auch der zeitliche Verlauf der Phytoalexin-Akkumulation nach Phytoprostan- und Jasmonsäure-Behandlung untersucht. In *E. californica* erfolgte die Alkaloid-Akkumulation nach Behandlung mit allen Testsubstanzen nahezu linear und hielt bis zum Ende der Untersuchung an. In *C. cobalticola* akkumulierte das Phytoalexin Isobavachalkon nach Zusatz der verschiedenen Oxylipine nur vorübergehend, da das Chalkon vermutlich schnell glycosyliert und somit der Analyse entzogen wurde. Auch in *N. tabacum* erfolgte die Scopoletin-Akkumulation im Medium der Zellkultur nach Jasmonsäure- und Phytoprostan-Behandlung transient (Thoma et al., 2003b). In den drei Testsystemen waren die Reaktionen auf die Behandlung mit PPE₁, PPA₁ und PPB₁ und Jasmonsäure zwar unterschiedlich stark ausgeprägt, zeitlich verliefen die Phytoalexin-Akkumulationen jedoch nahezu gleich.

In *N. tabacum* wird eine gesteigerte Expression des *Pal*-Gens für die Scopoletin-Akkumulation nach Methyljasmonat-Behandlung verantwortlich gemacht (Taguchi et al.,

2001). *Pal* codiert für die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und ist neben der Synthese von Scopoletin in *N. tabacum* auch an der Synthese von Chalkonen, wie Isobavachalkon in *C. cobalticola* beteiligt (Dixon et al., 2002). Um eine Expressions-Steigerung von *Pal* durch Phytoprostane experimentell zu bestätigen, wurden in Kooperation mit Dr. A. Sinha Zellkulturen nach PPA₁- bzw. PPB₁-Behandlung bezüglich der Transskriptionsrate verschiedener Gene untersucht.

Sowohl nach Behandlung von Zellkulturen von *L. esculentum* mit Methyljasmonat als auch mit PPB₁ Typ I bzw. Typ II konnte eine verstärkte *Pal*-Expression festgestellt werden (Thoma et al., 2003b). Dabei stiegen die mRNA-Konzentrationen 30 bis 60 min nach PPB₁-Behandlung an. Die Gabe von Methyljasmonat führte zu einem späteren und schwächeren Anstieg der mRNA-Level (Abbildung V.3, Thoma et al. 2003b). Erstaunlicherweise induzierten PPA₁ die *Pal*-Expression in *L. esculentum* nicht, obwohl man dies aufgrund des Testergebnisses zur Phytoalexin-Akkumulation in *N. tabacum* annehmen könnte, wo nach PPA₁-Behandlung die Scopoletin-Konzentration angestiegen war. Jedoch war in diesem Testsystem nicht die Biosynthese von Scopoletin in den Zellen, sondern dessen Akkumulation im Medium untersucht worden, welche hauptsächlich durch eine Freisetzung von Scopoletin aus dem Glycosid Scopolin erfolgt. Möglicherweise provozierte PPA₁ eine Scopoletin-Akkumulation im Medium nicht über eine verstärkte Biosynthese, sondern durch Aktivierung von Glucosidasen, welche Scopoletin aus Scopolin freisetzen (Taguchi et al., 2001).

Jasmonaten werden neben der stimulierenden Wirkung auf Gene von Phytoalexin-Biosynthesewegen, z.B. *Pal*, wichtige Funktionen in der pflanzlichen Reaktion auf Verwundung zugesprochen (Liechti and Farmer, 2002). So induzieren Jasmonate beispielsweise die Expression von Proteinase-Inhibitor-Proteinen (PIN) (Farmer and Ryan, 1990, 1992). Diese Proteine können bei Befall der Pflanze durch herbivore Insekten das Wachstum und die Entwicklung der Frassfeinde beeinträchtigen, indem sie den Proteinabbau im Verdauungsapparat des Insektes hemmen. Wie erwartet, induzierte Methyljasmonat die Expression von *Pin2* in *L. esculentum*, dieser Effekt konnte jedoch für keines der Cyclopentenon-Phytoprostane gefunden werden (Abbildung V.3) (Thoma et al., 2003b).

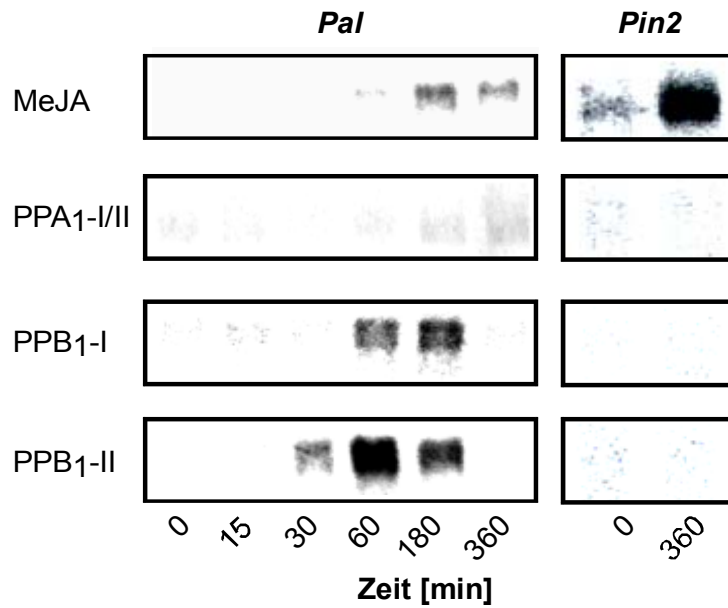


Abbildung V.3: Genexpression von *Pal* und *Pin2* nach Behandlung mit Methyljasmonat, PPA₁ und PPB₁. Die Northern Blot Analysen waren von Dr. A. Sinha in einer Kooperation mit I. Thoma durchgeführt worden (Thoma et al., 2003b).

Die Untersuchung zur Induktion des *Pin*-Gens in *L. esculentum* führte zu qualitativ unterschiedlichen Ergebnissen nach Jasmonat- bzw. Phytoprostan-Behandlung. Es existieren also vermutlich zwei unterschiedliche Signalwege, die zum Teil die gleichen Wirkungen vermitteln (bezüglich Phytoalexin-Synthese, sowie *Pal*- und *Gst*-Induktion), die sich aber in ihren Wirkungen auch unterscheiden können, wie bei der *Pin*-Induktion beobachtet. In einem weiteren Experiment wurden Zellkulturen von *N. tabacum* mit PPA₁ und PPB₁ behandelt und die Jasmonsäure-Konzentration analysiert. Dabei konnte keine verstärkte Biosynthese von Jasmonsäure festgestellt werden, woraus man schließen kann, dass Phytoprostane ihre Wirkung nicht über Jasmonsäure vermitteln. Es stellte sich nun die Frage, wie die Signaltransduktion der Phytoprostane erfolgt.

Ein in Eukaryoten weit verbreitetes frühes Signaltransduktionsereignis ist die Aktivierung von Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) beispielsweise durch abiotischen Stress, Infektionen und Hormone (Hirt, 2000; Zhang and Klessig, 2001). Diese Enzyme sind häufig in einer dreistufigen Kaskade angeordnet, wobei MAPK durch doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-haltigen Motiven aktiviert werden können. MAPK sind vermutlich an der Aktivierung von Abwehrgenen, wie z.B. *Pal* (Zhang et al., 1998; Yang et al., 2001), aber auch an der Initiierung der Hypersensitiven Reaktion in *N. tabacum* beteiligt (Zhang and Klessig, 1998; Desikan et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Samuel et al., 2000; Zhang et al., 2000; Yang et al., 2001). Um zu untersuchen, ob MAPK auch in die Signaltransduktion von Phytoprostanen involviert sind, wurden in Kooperation mit Dr. A. Sinha in unserer Arbeitsgruppe Versuche zur MAPK-Aktivität in Zellkulturen von *L. esculentum* nach Zusatz von PPA₁ bzw. PPB₁ durchgeführt. Nach fünfminütiger Behandlung der Zellkulturen mit Phytoprostanen A₁ und B₁ wurden Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit anti-pTyr-

Antikörpern präzipitiert und in einem „in gel kinase assay“ mit MBP (myelin basic protein) analysiert. Sowohl in den mit PPA₁ Typ I, Typ II als auch mit PPB₁ Typ II versetzten Zellkulturen konnte eine starke MAPK-Aktivierung festgestellt werden. Nach Behandlung der Zellkultur mit PPB₁ Typ I hingegen wurde keine signifikante Kinase-Aktivierung beobachtet. Es ist demnach vorstellbar, dass Phytoprostane ihre Wirkung über eine Aktivierung von MAPK vermitteln.

Dagegen führte eine Behandlung der Zellkultur mit Methyljasmonat zu keiner signifikanten MAPK-Aktivierung. Vermutlich vermitteln Jasmonate und Phytoprostane ihre Wirkungen über unterschiedliche Signaltransduktionswege.

Jasmonate sind als Signalstoffe nicht nur an der pflanzlichen Abwehr sondern auch an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Fruchtreifung, Rankenspiralisierung, Stoffspeicherung und Fortpflanzung beteiligt (Creelman and Mullet, 1997; Mueller, 1997). Aufgrund der sich teilweise deckenden Wirkspektren von Jasmonaten und Phytoprostanen wurde untersucht, ob PPA₁ und PPB₁ ebenfalls noch weitere biologische Wirkungen besitzen. In der Literatur war eine Schließung von Stomata durch Jasmonsäure beschrieben worden (Beltrano et al., 1997; Herde et al., 1997; Jin and Wu, 1999), ein Prozess, der durch Abscisinsäure und durch Pathogenbefall induziert werden kann (Pei et al., 2000; Neill et al., 2002b). Zudem war gezeigt worden, dass PGE₁, welches das gleiche Ringsystem wie die korrespondierenden Phytoprostane besitzt, eine Stomataöffnung induzieren kann. Wenn PGE₁ und Jasmonsäure Stomataöffnungen induzieren können, könnten auch die strukturell mit den beiden Verbindungen verwandten Phytoprostane einen Einfluß auf Stomataöffnungen ausüben. Als Testsystem wurde das etablierte Testsystem *Vicia faba* ausgewählt, da sich die Epidermis der *Vicia faba*-Blätter leicht mit einer Pinzette abziehen lässt. Solche Epidermisstreifen wurden in Pufferlösung unter Lichteinfluß inkubiert, damit sich die Stomata weit öffnen. Dann wurde die Inkubationslösung mit Abscisinsäure, PGA₁, PGB₁, PPA₁ Typ I und II bzw. PPB₁ Typ I und II versetzt und die Öffnungsweite der Schließzellen vermessen. Der Zusatz der Prostaglandine A₁ und B₁ führte zu einer deutlichen Schließung der Stomata, wohingegen laut Literaturangaben PGE₁ eine Öffnung der Stomata induziert. Entgegengerichtete Aktivitäten verschiedener Prostaglandinklassen sind nicht ungewöhnlich, so sind beispielsweise auch PGE₂ und dPGJ₂ Gegenspieler im Entzündungsgeschehen (Vane, 1971; Straus and Glass, 2001).

Die Behandlung der Schließzellen mit den Prostaglandin-Analoga PPA₁ und PPB₁ führte zu dem Ergebnis, dass sowohl die Regioisomere Typ I als auch Typ II beider Phytoprostan-Klassen eine Reduktion der Öffnungsweite in nahezu gleichem Ausmaß wie Abscisinsäure hervorriefen. Da alle getesteten cyclischen Oxylipine in diesem Testsystem aktiv waren, wurde durch Untersuchung weiterer Fettsäuren und Oxylipine die Spezifität des Testsystems auf Fettsäure-Derivate überprüft. Dazu wurde der gleiche Versuch mit Jasmonsäure, Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) durchgeführt. Hier konnte jedoch nur ein geringer Stomataschluss durch Jasmonsäure und Linolensäure und sogar eine verstärkte Öffnung der

Schließzellen durch Linolsäure festgestellt werden. Es handelt sich demnach bei der Reduktion der Stomataweite durchaus um eine spezifische Antwort auf die prostanoiden Verbindungen. Allerdings wurden die Versuche mit einer relativ hohen Konzentration (100 μM) an ABA und Phytoprostanen durchgeführt. Um die Wirkstärke der Verbindungen vergleichen zu können müssen Dosis-Wirkungskurven aufgenommen werden. Diese Untersuchungen sind jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ in pflanzlichen Zellen durch oxidativen Stress und während Pflanzen-Pathogen-Interaktionen gesteigert werden können. Darüber hinaus konnte biologische Wirksamkeit von PPE₁, PPA₁ und PPB₁ in verschiedenen Testsystemen gezeigt werden. Diese deckten sich teilweise mit den Aktivitäten von Jasmonaten, es gibt aber auch auffallende Parallelen zum in der Literatur beschriebenen Aktivitätsspektrum von ROS (Tabelle V.1).

Wirkung	ROS	PPA ₁ und PPB ₁
Zelltod	Induktion von Programmierem Zelltod (Neill et al., 2002a).	PPA ₁ Typ II $\geq 200 \mu\text{M}$ Zelltod (programmierter Zelltod oder Nekrose) (IV.4.1.1). PPA ₁ Typ I, PPB ₁ $> 250 \mu\text{M}$ Zelltod
Abwehrgene	In Kombination mit NO [•] : Induktion u. a. von <i>Pal</i> , <i>Gst</i> und <i>PrI</i> (Desikan et al., 2001a; de Pinto et al., 2002).	PPA ₁ : Induktion von <i>Gst</i> PPB ₁ : Induktion von <i>Pal</i> und <i>Gst</i> (Thoma et al., 2003b).
Stomata	Schließung (Lee et al., 1999; Neill et al., 2002b).	PPA ₁ , PPB ₁ : Schließung (IV.4.3).
MAPK	Aktivierung von AtMPK6 in <i>A. thaliana</i> , Aktivierung von SIPK und WIPK in <i>L. esculentum</i> (Zhang and Klessig, 2001).	PPA ₁ , PPB ₁ : MAPK-Aktivierung in <i>L. esculentum</i> (Thoma et al., 2003b).
Phytoalexine	<i>t</i> -BuOOH: Induktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden in <i>E. californica</i> und von Scopoletin in <i>N. tabacum</i> (IV.4.1.1). ROS: Induktion der Phytoalexin-Synthese in Zellkulturen von <i>Petroselinum crispum</i> und <i>Glycine maxima</i> (Apostol et al., 1989; Jabs et al., 1997).	PPA ₁ , PPB ₁ : Induktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden in <i>E. californica</i> , von Isobavachalkon in <i>C. cobalticola</i> und von Scopoletin in <i>N. tabacum</i> (IV.4.1.1).

Tabelle V.1: Wirkungen von ROS und PPA₁/PPB₁.

Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Phytoprostane trotz der auffälligen strukturellen Ähnlichkeit zu den Jasmonaten Teil eines eigenständigen Signalweges sind. Es wäre vorstellbar, dass durch steigende Konzentrationen von ROS (beispielsweise während des „oxidative burst“) die Biosynthese von freien oder membrangebundenen Phytoprostanen induziert wird. Die in Membranlipiden veresterten Phytoprostane könnten beispielsweise in Folge von Pathogenbefall durch Lipasen freigesetzt werden und als freie Phytoprostane verschiedene biologische Wirkungen vermitteln (Abbildung V.4). Die Wirkspektren von Jasmonsäure und Phytoprostanen überschneiden sich trotz der vermutlich unterschiedlichen Signaltransduktionswege, so beispielsweise bei der Induktion der Phytoalexin-Synthese.

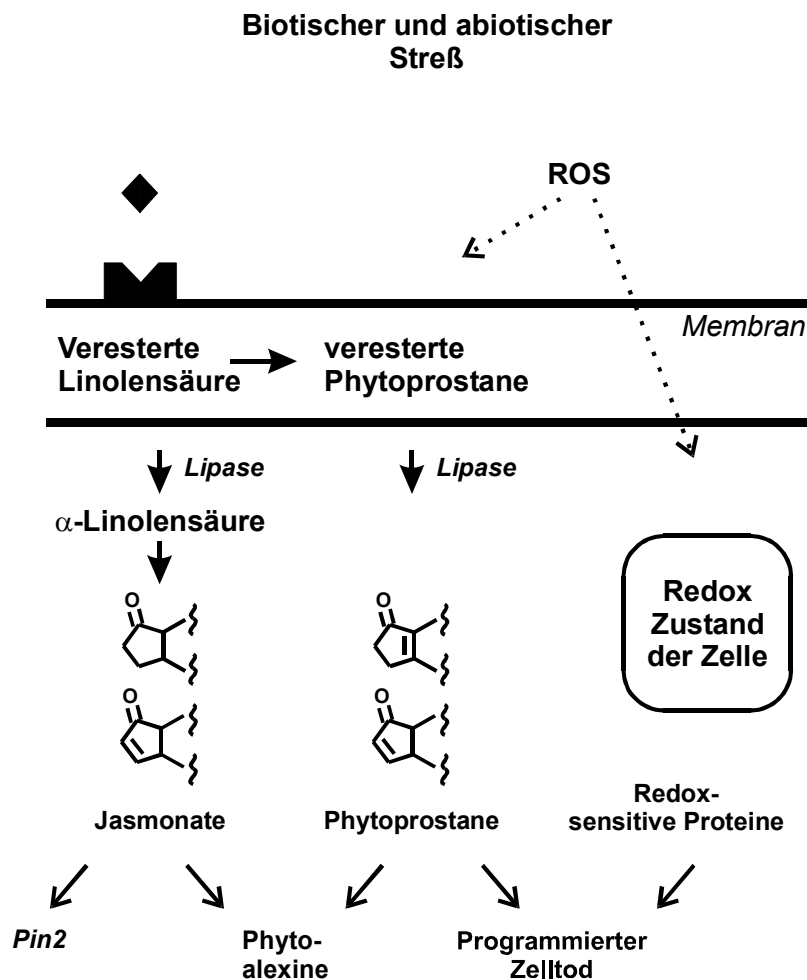


Abbildung V.4: Mögliche Signalwege von Jasmonaten, Phytoprostanen und ROS.

V.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Cyclopentenon-Phytoprostane untersucht. Diese kommen vermutlich ubiquitär vor und können durch verschiedene Stimuli, wie Peroxide oder Pathogenbefall induziert werden. Darüber hinaus stimulieren Cyclopentenon-Isoprostane die Phytoalexin-Synthese in pflanzlichen Zellkulturen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Hypothese aufgestellt, nach der Phytoprostane Mediatoren von oxidativem Stress darstellen.

In einer Untersuchung von *N. tabacum*-Zellen nach Behandlung mit 1 mM *t*-BuOOH wurde gezeigt, dass die Konzentration von freien Phytoprostanen A₁, B₁ und E₁ durch oxidativen Stress ansteigt. Auch während einer Pflanzen-Pathogen-Interaktion von *L. esculentum* und *Botrytis cinerea* konnte eine Akkumulation von freien PPE₁, PPA₁ und PPB₁ beobachtet werden. Diese Induktion von freien Phytoprostanen könnte durch Lipidperoxidation von freier Linolensäure erfolgt sein oder auf einer Freisetzung von Phytoprostanen aus Membranlipiden beruhen.

Dabei ist das Vorkommen von veresterten Phytoprostanen in Membranen noch nicht sicher nachgewiesen worden. Erste Hinweise darauf lieferten Untersuchungen von PPF₁, wobei sich die Konzentration freier PPF₁ nach alkalischer Hydrolyse von Lipidfraktionen pflanzlicher Zellen verzehnfachten (Imbusch and Mueller, 2000b). Ein direkter Nachweis von veresterten Phytoprostanen in Membranlipiden könnte durch Zusatz von Lipasen zu Lipidextrakten pflanzlicher Zellen erhalten werden.

Sollten Phytoprostane durch Lipasen freigesetzt werden können, müsste in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob Stimuli wie Pathogenbefall oder Verwundung eine Lipase aktivieren und ob diese Lipase wiederum Phytoprostane aus Membranen herauslöst. Aus der Literatur ist bekannt, dass nach Pathogenbefall die Phospholipase A-Aktivität ansteigt (Chandra et al., 1996; Dhondt et al., 2000) und der Akkumulation von OPDA und Jasmonsäure vorausgeht (Dhondt et al., 2000). Ob diese Phospholipase A₂ oder andere Lipasen Phytoprostane aus der Esterbindung freisetzen kann, ist noch ungeklärt. Eine Behandlung von pflanzlichen Zellen mit einer unspezifischen Lipase und Analyse der Phytoprostan-Konzentrationen könnte erste Hinweise auf eine enzymatische Freisetzung von Phytoprostanen aus Membranen liefern. Dabei sollte durch den Versuchsaufbau sichergestellt sein, dass es nicht durch Oxidation freigesetzter Linolensäure zu einer Verfälschung des Ergebnisses kommt.

Um einer potentiellen Funktion als Mediatoren von oxidativem Stress gerecht zu werden, müssen Phytoprostane nicht nur durch oxidativen Stress induziert werden, sondern auch eine biologische Wirkung besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Phytoprostane E₁, A₁ und B₁ in verschiedenen Zellkulturen die Bildung von niedermolekularen, antimikrobiellen Sekundärstoffen (Phytoalexinen) stimulieren und somit pflanzliche Abwehrreaktionen induzieren können. Darüber hinaus konnte nach PPA₁ und PPB₁-

Behandlung von Zellkulturen von *L. esculentum* eine verstärkte Expression des *Pal*-Gens beobachtet werden, welches an der Biosynthese verschiedener Phytoalexine wie Scopoletin und Isobavachalkon beteiligt ist. Vermutlich induzieren Phytoprostane E₁, A₁ und B₁ eine *de novo*-Synthese von Phytoalexinen. Ob Phytoprostane dabei essentiell für die Induktion dieser Abwehrreaktion sind oder ob die Phytoalexin-Synthese auch in Abwesenheit von Phytoprostanen erfolgen kann, ist noch ungeklärt. Eine Untersuchung dieser Fragestellung mit Hilfe von Mutanten ist auf Grund der radikal-katalysierten Synthese der Phytoprostane nicht möglich. Jedoch könnte mit Hilfe von Radikalfängern eine Induktion der Phytoprostan-Bildung durch ROS oder Pathogene unterbunden werden. Ist eine Phytoprostan-Akkumulation essentiell für die Bildung von Phytoalexinen, so sollte diese Abwehrreaktion erst durch Zusatz von Phytoprostanen initiiert werden können.

VI. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die Phytoprostane (PP), untersucht. Mehrere Klassen von Phytoprostanen können durch nicht-enzymatische, freie Radikal-katalysierte Oxidation von Linolensäure *in vitro* und *in vivo* gebildet werden. Aufgrund theoretischer Überlegung wurde postuliert, dass in Pflanzen die Bildung von Cyclopentenon-Phytoprostanen, den PPA₁ und PPB₁, aus bekannten Vorstufen möglich sein sollte. Die postulierten Cyclopentenon-Phytoprostane sind strukturell verwandt mit Phytohormonen vom Typ der Jasmonsäure und tierischen Gewebshormonen vom Typ der Prostaglandine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob PPA₁ und PPB₁ tatsächlich in Pflanzen vorkommen und, falls ja, ob diese Jasmonat-ähnliche Wirkungen aufweisen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Phytoprostane E₁ wurden durch Autoxidation von Linolensäure hergestellt, gereinigt und partialsynthetisch in Phytoprostane A₁ und Phytoprostane B₁ umgewandelt. PPA₁ und PPB₁ bestehen jeweils aus zwei Regioisomere, die mittels HPLC präparativ isoliert werden konnten. Die PPA₁ Regioisomere wurden durch GC-EI-MS und durch Derivatisierung zu bekannten Verbindungen in ihrer Struktur aufgeklärt. Die Regioisomere repräsentieren racemische Mischungen (jeweils 8 Isomere), die nicht weiter aufgetrennt wurden.
2. Phytoprostane B₁ bestehen aus zwei Regioisomeren und diese jeweils aus zwei Enantiomeren. Alle vier Isomere konnten auf einer chiralen Säule getrennt werden und ihre absolute Konfiguration in Kooperation mit Prof. Bringmann, Organische Chemie, Würzburg mittels Circular dichroismus aufgeklärt werden.
3. Es wurden empfindliche und spezifische GC-NICI-MS-Analysemethoden entwickelt um Cyclopentenon-Phytoprostane in Pflanzen nachweisen zu können. ¹⁸O-markierte Standards wurden synthetisiert und als interne Standards für die Analyse eingesetzt.
4. PPA₁ und PPB₁ konnten erstmals in Pflanzen identifiziert werden. Hierzu wurden zwei sich ergänzende Methoden entwickelt, die in Kombination eine separate Quantifizierung von PPA₁ und PPB₁ erlaubten. Mit Hilfe des ersten Verfahrens wurde der Gesamtgehalt an PPA₁ und PPB₁ in insgesamt sieben taxonomisch verschiedenen Pflanzenarten analysiert. In allen Spezies konnten PPA₁ und PPB₁ nachgewiesen werden. Die basalen Konzentrationen von PPA₁/PPB₁ lagen zwischen 11 und 131 ng/g Trockengewicht. Da PPA₁/PPB₁ nicht-enzymatisch aus ubiquitär in Pflanzen vorkommender Linolensäure gebildet werden können, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PPA₁/PPB₁ ubiquitär in Pflanzen vorkommen.

Eine aufwendige, separate Bestimmung von PPA₁ und PPB₁ wurde exemplarisch in *Lycopersicon esculentum* und *Nicotiana tabacum* durchgeführt. Dabei wurde für Tomatenblätter ein Gehalt von 12 ng PPA₁ und 4,5 ng PPB₁ pro Gramm

Trockengewicht und für Tabakblätter ein Gehalt von 37 ng/g Trockengewicht PPA₁ und 16 ng/g Trockengewicht PPB₁ erhalten.

Interessanterweise liegen die Konzentrationen der nicht-enzymatisch gebildeten PPA₁/PPB₁ nahe den Konzentrationen der enzymatisch gebildeten, strukturell verwandten Jasmonate.

5. Die Biosynthese von Phytoprostanen in Pflanzen kann durch exogene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden. Eine massive Bildung von ROS wird bei der Interaktion von *L. esculentum* mit *Botrytis cinerea* beobachtet. Eine Analyse von infizierten und nicht-infizierten Tomatenblättern ergab, dass 48 Stunden nach der Infektion sowohl die Konzentration von Jasmonsäure als auch der Phytoprostane PPE₁, PPA₁ und PPB₁ in den infizierten Blättern um das drei- bis vierfache erhöht war. Diese Ergebnisse warfen die Frage nach der biologischen Aktivität und der Funktion von Phytoprostanen erneut auf.
6. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Cyclopentenon-Phytoprostane PPA₁ und PPB₁ zu Jasmonsäure wurden PPA₁ und PPB₁ in einem klassischen Bioassay-System für Jasmonate getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass PPA₁ und PPB₁ die Biosynthese von antimikrobiellen Abwehrsubstanzen (Phytoalexinen) in *Eschscholtzia californica*-Zellkulturen im selben Konzentrationsbereich (50 – 250 µM) wie Jasmonsäure induzierten. Die Phytoalexine wurden mit EI-MS und mit HPLC als Sanguinarin, Chelirubin und Macarpin identifiziert. Diese Alkaloide wurden auch durch Jasmonsäure induziert. Die Regioisomere vom Typ II der PPA₁ und PPB₁ erwiesen sich als ähnlich wirksam wie die Jasmonsäure, während die Regioisomere vom Typ I inaktiv, bzw. deutlich schwächer aktiv waren.
7. In *Crotalaria cobalticola*-Zellkulturen induzierten PPA₁ und PPB₁ ebenfalls ein Phytoalexin, welches mittels UV-Spektroskopie und EI-MS als Isobavachalkon identifiziert werden konnte. Auch in diesem Testsystem erwiesen sich die Phytoprostane A₁ und B₁ im Konzentrationsbereich von 50 – 250 µM als ähnlich aktiv wie Jasmonsäure bezüglich der Induktion von Isobavachalkon.
8. In *Nicotiana tabacum*-Zellkulturen stimulierten PPA₁ und PPB₁ bereits in einer Konzentration von 10 µM die Akkumulation eines Phytoalexins, Scopoletin. Da PPB₁ bereits in die zwei Regioisomere und diese wiederum in jeweils zwei Enantiomere präparativ aufgetrennt worden waren, konnten sie als reine Isomere in einer Endkonzentration von 10 µM bezüglich der Scopoletin-Induktion in *N. tabacum*-Zellkulturen getestet werden. In diesem Experiment konnten keine Unterschiede in der Wirkstärke der einzelnen Isomere, die aus technischen Gründen als Methylester getestet wurden, festgestellt werden.
9. Da erstmals festgestellt wurde, dass PPA₁ und PPB₁ in drei taxonomisch weit entfernten Pflanzenspezies jeweils den Gehalt von Jasmonsäure-induzierbaren Phytoalexinen steigerten, stellte sich die Frage, ob PPA₁ und PPB₁ ihre Wirkungen

über Jasmonsäure vermitteln. Zu *N. tabacum*-Zellkulturen exogen zugefügte PPA₁ oder PPB₁ induzierten jedoch die Jasmonsäure-Synthese nicht.

10. Von den strukturell nahe verwandten Prostaglandinen ist in der Literatur beschrieben, dass sie bei exogener Applikation an Blattepidermisstreifen eine Schließung von Stomata induzierten. Exogene Applikation von Prostaglandin A₁, B₁, PPA₁, PPB₁ und Abscisinsäure in einer Konzentration von 100 µM an Epidermisstreifen von *Vicia faba* induzierte eine Verringerung der Stomataweite um 93%, 92%, 63% , 71% bzw. 89%.
11. Da aus Kooperationen mit Pharmakologen bekannt war, dass PPB₁ in Tieren schwach bronchokonstriktorisch wirken, wurden Pollen, welche eingeatmet werden können, auf ihren Gehalt an PPA₁/PPB₁ untersucht. In Pollen von *Betula pendula* wurden Konzentrationen von 149766 ng/g Trockengewicht gefunden, was 4 Zehnerpotenzen über dem Gehalt in frischen Blättern derselben Spezies (15 ng/g Trockengewicht) lag. Diese Gehalte sind vermutlich einige Größenordnungen zu niedrig, um eine Bronchokonstriktion in Tieren/Menschen auszulösen. Allerdings sind Prostanoiden mit dem F-Ring-System um bis zu 3 Größenordnungen aktiver als die hier untersuchten B-Ring-Verbindungen. Diese und andere Phytoprostane sind jedoch noch nicht systematisch bezüglich ihrer Aktivität in tierischen Organismen untersucht worden.

VI. Summary

In the present thesis novel prostaglandin-like compounds, the phytoprostanes (PP) were investigated. Several classes of phytoprostanes are formed *in vitro* and *in vivo* by non enzymatic, radical-catalyzed oxidation of linolenic acid. Based on theoretical considerations, it was postulated, that the formation of previously unknown cyclopentenone phytoprostanes A₁ and B₁ from phytoprostane-precursors should be possible *in planta*. The postulated cyclopentenone phytoprostanes are structurally related to the phytohormone jasmonic acid and the mammalian prostaglandins. The aim of the present thesis was, to investigate whether PPA₁ and PPB₁ exist in plants and, if this holds true, whether they display biological activity.

The following results were obtained:

1. Phytoprostanes E₁ were prepared by autoxidation of linolenic acid and converted by partial synthesis into phytoprostanes A₁ and B₁. PPA₁ and PPB₁ comprise two regioisomeres which were isolated by HPLC. The structures of the PPA₁ regioisomeres were elucidated by GC-EI-MS and derivatisation to known compounds. Each regioisomer represents a racemic mixture composed of 8 isomers that were not further separated.
2. Phytoprostanes B₁ comprise two regioisomeres, each of which is composed of two enantiomers. All four isomers were separated on a chiral column and their absolute configuration was revealed by circular dichroism-spectroscopy in cooperation with Prof. Dr. Bringmann, Organic Chemistry, Würzburg.
3. Highly sensitive and specific GC-NICI-MS-methods were developed to identify cyclopentenone phytoprostanes in plants. ¹⁸O-labelled PPB₁ were synthesized and used as internal standard for GC-MS-analysis.
4. PPA₁ and PPB₁ were identified in plants for the first time. To analyse PPA₁ and PPB₁ *in planta*, two complementary methods were developed that allowed quantitation of PPA₁ and PPB₁. With the first method the total concentrations of PPA₁ and PPB₁ were determined in seven systematically distant plant species. PPA₁/PPB₁ were detected in all species so far analysed. The basal concentrations range from 11 to 131 ng /g of dry weight. These findings and the fact, that the precursor of phytoprostanes, linolenic acid, exists ubiquitously in the plant kingdom suggests, that PPA₁ and PPB₁ occur ubiquitously in the plant kingdom.

Separate analyses of PPA₁ and PPB₁ were performed in *L. esculentum* and *N. tabacum*. Levels in tomato leaves amounted to 12 ng/g of dry weight for PPA₁ and 4,5 ng/g of dry weight for PPB₁. Tobacco leaves contained 37 ng/g PPA₁ and 16 ng/g PPB₁. Notably, levels of nonenzymatically formed PPA₁/PPB₁ were only slightly below the concentrations of enzymatically formed, structurally related jasmonic acid.

5. The biosynthesis of phytoprostanes in plants can be triggered by exogenous reactive oxygen species (ROS). A massive endogenous ROS generation is observed during the interaction of *L. esculentum* and *Botrytis cinerea*. Analysis of infected and non infected tomato leaves revealed, that levels of jasmonic acid and phytoprostanes PPA₁, PPA₁ and PPB₁ increased three to four fold in the infected leaves 48 hours after infection. This prompted us to investigate the biological properties of phytoprostanes.
6. Due to the structural similarity of cyclopentenon phytoprostanes PPA₁ and PPB₁ to jasmonic acid, PPA₁ and PPB₁ were tested in a well established bioassay for jasmonates. Experiments revealed, that PPA₁ and PPB₁ induced the biosynthesis of antimicrobial defense compounds (phytoalexins) in cell culture of *Eschscholtzia californica* within the same concentration range (50 – 250 µM) as jasmonic acid. Phytoalexins were identified by EI-MS as well as HPLC and were shown to be sanguinarine, chelirubine and macarpine. Type II regioisomers of PPA₁ and PPB₁ were as effective as jasmonic acid, whereas type I regioisomers were less active.
7. In cell cultures of *Crotalaria cobalticola*, PPA₁ and PPB₁ induced in a concentration range of 50 - 250 µM the biosynthesis of a phytoalexin as well. The predominant phytoalexin was identified by UV-spectroscopy and EI-MS as Isobavachalcon. In this bioassay PPA₁ and PPB₁ were again as active as jasmonic acid with respect to isobavachalcon induction.
8. In *Nicotiana tabacum* cell culture 10 µM PPA₁ and PPB₁ triggered the accumulation of a phytoalexin that was identified as scopoletin.
Since all four theoretically possible PPB₁-isomers were available, they could be tested in scopoletin induction experiments in a *N. tabacum* bioassay. No significant differences in the biological activities of the four isomers were detected. For technical reasons the isomers were tested as methyl esters.
9. Since PPA₁ and PPB₁ triggered the synthesis of jasmonic acid-inducible phytoalexins in three taxonomically distant plant species, PPA₁ and PPB₁ could potentially mediate their activities by inducing jasmonic acid. However treatment of *N. tabacum* cell cultures with exogenous PPA₁ and PPB₁ did not induce jasmonic acid synthesis. Thus, this possibility could be ruled out at least in *N. tabacum* cell cultures.
10. The structurally related prostaglandins have been reported to induce stomatal closure, when applied exogenously to epidermal strips to certain plant species. Exogenous application of prostaglandin A₁, and B₁, PPA₁ PPB₁ and abscisic acid in a concentration of 100 µM to epidermal strips of *Vicia faba* induced a reduction of the stomatal aperture of about 93%, 92%, 63% , 71% and 89% respectively.
11. Since it was shown, that PPB₁ act in animals as weak bronchoconstrictors, pollen, that can be inhaled, were analysed for their PPA₁/PPB₁ content. Pollen of *Betula pendula* were found to contain 149566 ng/g of dry weight of PPA₁/PPB₁, which is at least 10-fold higher than the levels in leaves of the same species (15 ng/g of dry weight).

However, PPA₁/PPB₁ levels in *Betula pendula* pollen are probably not sufficient to induce bronchoconstriction in mammals. F ring prostanoids are about three orders of magnitude more active than the analysed B-ring compounds. F-ring-phytoprostanes, however, have not yet been investigated systematically concerning their biological activity in mammals.

VII. Literaturverzeichnis

- Andersen, N.H.** (1969). Dehydration of prostaglandins: study by spectroscopic method. *J Lipid Res* **10**, 320-325.
- Anderson, M.D., Chen, Z., and Klessig, D.F.** (1998). Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry* **47**, 555-566.
- Apostol, I., Heinstein, P.F., and Low, P.S.** (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* **90**, 109-116.
- Arrigo, A.P.** (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* **27**, 936-944.
- Beckman, J.S., and Koppenol, W.H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* **271**, C1424-1437.
- Beltrano, J., Ronco, M.G., Montaldi, E.R., and Carbone, A.** (1997). Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonat. *J Plant Growth Regul* **17**, 53-57.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.Q., and Zenk, M.H.** (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4099-4105.
- Blee, E.** (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**, 315-322.
- Bolwell, G.P.** (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 287-294.
- Bolwell, G.P., and Wojtaszek, P.** (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-366.
- Bui, T., and Straus, D.S.** (1998). Effects of cyclopentenone prostaglandins and related compounds on insulin-like growth factor-I and Waf1 gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1397**, 31-42.
- Castrillo, A., Traves, P.G., Martin-Sanz, P., Parkinson, S., Parker, P.J., and Bosca, L.** (2003). Potentiation of protein kinase C ζ activity by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF- κ B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol Cell Biol* **23**, 1196-1208.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Camp, W.** (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5818-5823.
- Chandra, S., Heinstein, P.F., and Low, P.S.** (1996). Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiol* **110**, 979-986.
- Chen, Y., Morrow, J.D., and Roberts, L.J., 2nd.** (1999). Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* **274**, 10863-10868.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D.F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**, 1883-1886.
- Chong, J., Baltz, R., Fritig, B., and Saindrenan, P.** (1999). An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H_2O_2 metabolism. *FEBS Lett* **458**, 204-208.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., and Saindrenan, P.** (2002). Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**, 1093-1107.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., and Klessig, D.F.** (2000). Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1380-1384.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., and Ryan, C.A.** (1996). Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Plant Physiol* **111**, 797-803.
- Corey, E.J., and Wang, Z.** (1994). Conversion of Arachidonic acid to the prostaglandin endoperoxide PGG_2 , a chemical analog of the biosynthetic pathway. *Tetrahedron Lett* **35**, 539-542.

- Corey, E.J., Shih, C., Shih, N.-Y., and Shimoji, K.** (1984). Preferential formation of 8-*epi*-prostaglandin F_{2α} via the corresponding endoperoxide by a biomimetic cyclization. *Tetrahedron Lett* **25**, 5013-5501.
- Creelman, R.A., and Mullet, J.E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 355-381.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F.** (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**, 779-795.
- de Pinto, M.C., Tommasi, F., and De Gara, L.** (2002). Changes in the Antioxidant Systems as Part of the Signaling Pathway Responsible for the Programmed Cell Death Activated by Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant Physiol* **130**, 698-708.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C.** (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13454-13459.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biondani, A., Polverari, A., and Lamb, C.** (2002). Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem* **40**, 605-610.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. *Biochem J* **330 (Pt 1)**, 115-120.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2001a). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**, 159-172.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Planta* **210**, 97-103.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., and Neill, S.J.** (2001b). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* **126**, 1579-1587.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M., and Heitz, T.** (2000). Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J* **23**, 431-440.
- Dittrich, H., and Kutchan, T.M.** (1991). Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9969-9973.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S., and Wang, L.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**, 371-390.
- Durner, J., and Klessig, D.F.** (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11312-11316.
- Durner, J., and Klessig, D.F.** (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 369-374.
- El Fangour, S., Guy, A., Vidal, J.-P., Rossi, J.-P., and Durand, T.** (2003). Total synthesis of phytoprostane F₁ and its 16 epimer. *Tetrahedron Lett* **im Druck**.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7713-7716.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134.
- Farmer, E.E., Weber, H., and Vollenweider, S.** (1998). Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta* **206**, 167-174.
- Feussner, I., and Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297.

- Fukushima, M.** (1990). Prostaglandin J₂ - anti-tumour and anti-viral activities and the mechanisms involved. *Eicosanoids* **3**, 189-199.
- Fukushima, M.** (1992). Biological activities and mechanisms of action of PGJ₂ and related compounds: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **47**, 1-12.
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* **128**, 790-792.
- García-Mata, C., and Lamattina, L.** (2003). Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science* **8**, 20-26.
- Gobel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S.** (2001). Oxylinin Profiling Reveals the Preferential Stimulation of the 9-Lipoxygenase Pathway in Elicitor-treated Potato Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 6267-6273.
- Govrin, E.M., and Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**, 751-757.
- Goy, P.A., Signer, H., Reist, R., Aichholz, R., Blum, W., Schmidt, E., and Kessmann, H.** (1993). Accumulation of scopoletin is associated with high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* X *Nicotiana debneyi*. *Planta* **191**.
- Griffith, O.W., and Stuehr, D.J.** (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**, 707-736.
- Gundlach, H.** (1992). Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2389-2393.
- Haider, G., von Schrader, T., Fusslein, M., Blechert, S., and Kutchan, T.M.** (2000). Structure-activity relationships of synthetic analogs of jasmonic acid and coronatine on induction of benzo[c]phenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholzia californica* cell cultures. *Biol Chem* **381**, 741-748.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.** (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford: Oxford University Press).
- Hancock, J.T., Desikan, R., and Neill, S.J.** (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* **29**, 345-350.
- Herde, O., Pena-Cortes, H., Willmitzer, L., and J., F.** (1997). Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient plants. *Plant Cell Environ* **20**, 136-141.
- Hirt, H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* **2**, 11-15.
- Hirt, H.** (2000). MAP kinases in plant signal transduction. *Results Probl Cell Differ* **27**, 1-9.
- Hurst, J.S., Flatman, S., and McDonald-Gibson, R.G.** (1987). Thin-layer chromatography (including radio thin-layer chromatography and autoradiography) of prostaglandins and related compounds. In *Prostaglandins and related substances: a practical approach*, C. Benedetto, R.G. McDonald-Gibson, S. Nigam, and T.F. Slater, eds (IRL Press, Oxford).
- Imbusch, R.** (2001). Phytoprostane F₁ - eine neue Klasse Prostaglandin-ähnlicher Verbindungen in Pflanzen. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Imbusch, R., and Mueller, M.J.** (2000a). Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F₁ (phytoprostanes F₁) in plants. *Plant Physiol* **124**, 1293-1304.
- Imbusch, R., and Mueller, M.J.** (2000b). Formation of isoprostane F₂-like compounds (phytoprostanes F₁) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radic Biol Med* **28**, 720-726.
- Imsaide, J.** (1999). Iron-sulfur-clusters: formation, perturbation and physiological functions. *Plant Physiol Biochem* **37**.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., and Dangel, J.L.** (1996). Initiation of Runaway Cell Death in an Arabidopsis Mutant by Extracellular Superoxide. *Science* **273**, 1853-1856.
- Jabs, T., Tschoumlpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4800-4805.

- Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetse, K., Agnel, J.P., Delannoy, E., Triantaphylides, C., Daniel, J.F., Marmey, P., Geiger, J.P., and Nicole, M.** (2002). Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant Journal* **32**.
- Janssen, L.J.** (2001). Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L1067-1082.
- Jin, X.-C., and Wu, W.-H.** (1999). Involvement of cyclic AMP in ABA and Ca²⁺-mediated signaltransduction of stomatal regulation in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1127-1133.
- Kim, I.-K., Lee, J.-H., Sohn, H.-W., Kim, H.-S., and Kim, S.-H.** (1993). Prostaglandin A₂ and Δ^2 -prostaglandin J₂ induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Letters* **321**, 209-214.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., and Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8849-8855.
- Kliebenstein, D.J., Dietrich, R.A., Martin, A.C., Last, R.L., and Dangl, J.L.** (1999). LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 1022-1026.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S.** (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* **5**, 834-842.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2940-2945.
- Krischke, M., Loeffler, C., and Mueller, M.J.** (2003). Biosynthesis of 13,14-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones via the phytoprostane D₁ pathway. *Phytochemistry*, in Druck.
- Kumar, D., and Klessig, D.F.** (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 347-351.
- Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.-S., Oh, K.-Y., Jeong Choi, E., Schroeder Taylor, A.T., Low, P.S., and Lee, Y.** (1999). Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* **121**, 147-152.
- Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I.** (1995). Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol* **108**, 1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
- Liechti, R., and Farmer, E.E.** (2002). The jasmonate pathway. *Science* **296**, 1649-1650.
- Linsmaier, E.M., and Skoog, F.** (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **18**, 100-127.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.** (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory press).
- Marks, F., and Fürstenberger, G.** (1999). *Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids. From biogenesis to clinical application.* (wiley-vch).
- May, M.J., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.** (1996). Involvement of Reactive Oxygen Species, Glutathione Metabolism, and Lipid Peroxidation in the Cf-Gene-Dependent Defense Response of Tomato Cotyledons Induced by Race-Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol* **110**, 1367-1379.
- Mittler, R., Feng, X., and Cohen, M.** (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* **10**, 461-473.
- Montillet, J.L., Agnel, J.P., Ponchet, M., Vailleau, F., Roby, D., and Triantaphylidès, C.** (2002). Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 633-639.

- Moore, K.P., Darley-USmar, V., Morrow, J., and Roberts, L.J., 2nd.** (1995). Formation of F₂-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res* **77**, 335-341.
- Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., and Roberts, L.J., 2nd.** (1992a). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10721-10725.
- Morrow, J.D., Hill, H.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., and Roberts, L.J.** (1990). A series of prostaglandin F₂ like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase free radical catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9383-9387.
- Morrow, J.D., Awad, J.A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K.F., Roberts, L.J., 2nd, and 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., Minton, T.A., Mukundan, C.R., Campbell, M.D., Zackert, W.E., Daniel, V.C., Badr, K.F., Blair, I.A., and Roberts, L.J., 2nd.** (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.
- 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**, R323-333.
- Mueller, M.J., and 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., and Zenk, M.H.** (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7490-7494.
- Murgia, I., Delledonne, M., and Soave, C.** (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. *Plant J* **30**, 521-528.
- Murphy, M.P.** (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 401-414.
- Neill, S., Desikan, R., and Hancock, J.** (2002a). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 388.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., and Hancock, J.T.** (2002b). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**, 13-16.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T.** (2002c). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53**, 1237-1247.
- O'Connor, D.E., Mihelich, E.D., and Coleman, M.C.** (1984). Stereochemical course of the autoxidative cyclisation of lipid hydroperoxides to prostaglandin-like bicyclic endoperoxides. *J Am Chem Soc* **106**, 3577-3584.
- Orozco-Cardenas, M., Narvaez-Vasquez, J., and Ryan, C.** (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**, 179-191.
- Parchmann, S.** (1999). Prostaglandin-Analoga in Pflanzen: 12-Oxo-Phytodiensäure und Dinor-Isoprostane. Dissertation, Ludwigs-Maximilian-Universität München.
- Parchmann, S., and Mueller, M.J.** (1998). Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from alpha-linolenic acid in plants. *J Biol Chem* **273**, 32650-32655.
- Parchmann, S., Gundlach, H., and Mueller, M.J.** (1997). Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* **115**, 1057-1064.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Porter, N.A., Zuraw, P.J., and Sullivan, J.A.** (1984). Peroxymercuration-demercuration of lipid hydroperoxides. *Tetrahedron Lett* **25**, 807-810.
- Pratico, D., Lawson, J.A., Rokach, J., and FitzGerald, G.A.** (2001). The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 243-247.

- Roberts, L.J., 2nd, and Morrow, J.D.** (2002). Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* **59**, 808-820.
- Rogers, K.R., Albert, F., and Anderson, A.J.** (1988). Lipid peroxidation is a consequence of elicitor activity. *Plant Physiol* **86**, 547-553.
- Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., and FitzGerald, G.A.** (1997a). Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* **54**, 853-873.
- Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., and FitzGerald, G.A.** (1997b). The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* **54**, 823-851.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M.G.** (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* **403**, 103-108.
- Rusterucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P., and Triantaphylides, C.** (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**, 36446-36455.
- Ryals, J., Lawton, K.A., Delaney, T.P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., and Weymann, K.** (1995). Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4202-4205.
- Samuel, M.A., Miles, G.P., and Ellis, B.E.** (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J* **22**, 367-376.
- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., and Weiler, E.W.** (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**, 979-984.
- Schuhmacher, H.M.** (1987). Untersuchungen zur induzierten Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden bei Zellkulturen von *Eschscholtzia californica*. Dissertation, Ludwigs-Maximilian-Universität München.
- Schuhmacher, H.M., Gundlach, H., Fiedler, F., and Zenk, M.H.** (1987). Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Rep* **6**, 410-413.
- Sequeira, L.** (1968). Synthesis of scopolin and scopoletin in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **59**, 473-478.
- Smith, W.L., and Marnett, L.J.** (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1083**, 1-17.
- Stehle, R.G.** (1982). Physical chemistry, stability and handling of prostaglandins E₂, F_{2 α} , D₂ & I₂: a critical summary. *Methods Enzymol* **86**, 436-458.
- Stelmach, B.A., Muller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L., and Weiler, E.W.** (1998). Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* **47**, 539-546.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12837-12842.
- Straus, D.S., and Glass, C.K.** (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**, 185-210.
- Stuhlfelder, C., Lottspeich, F., and Mueller, M.J.** (2002). Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry* **60**, 233-240.
- Suzuki, K., Yano, A., and Shinshi, H.** (1999). Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol* **119**, 1465-1472.
- Taber, D.F., Morrow, J.D., and Roberts, L.J., 2nd.** (1997). A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* **53**, 63-67.
- Taguchi, G., Yoshizawa, K., Kodaira, R., Hayashida, N., and Okazaki, M.** (2001). Plant hormone regulation on scopoletin metabolism from culture medium into tobacco cells. *Plant Science* **160**, 905-911.
- Tanahashi, T., and Zenk, M.H.** (1990). New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *J Nat Prod* **53**, 579-586.

- Thoma, I., Krischke, M., Loeffler, C., and Mueller, M.J.** (2003a). The isoprostanoïd pathway in plants. Im Druck, Chem Phys Lipids.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., and Mueller, M.J.** (2003b). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen spezies trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. Im Druck, Plant J.
- Vane, J.R.** (1971). Inhibition of prostaglandin-synthesis is a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature **231**, 232-235.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A., and Farmer, E.E.** (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. Plant J **24**, 467-476.
- Vranova, E., Inze, D., and Van Breusegem, F.** (2002). Signal transduction during oxidative stress. J Exp Bot **53**, 1227-1236.
- Weber, H.** (2002). Fatty acid-derived signals in plants. Trends Plant Sci **7**, 217-224.
- Weiler, E.W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Liß, H., Andert, L., and Spengler, P.** (1993). Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoïd precursors in tendril coiling response of *Bryonia dioica*. Phytochemistry **32**, 591-600.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., and Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends Plant Sci **6**, 177-183.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J **322** (Pt 3), 681-692.
- Yang, K.Y., Liu, Y., and Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. Proc Natl Acad Sci U S A **98**, 741-746.
- Yin, H., Havrilla, C.M., Gao, L., Morrow, J., and Porter, N.A.** (2003). Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid: "Dioxetane" intermediate or β -fragmentation of peroxyradicals? Im Druck, J Biol Chem.
- Zhang, S., and Klessig, D.F.** (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 7433-7438.
- Zhang, S., and Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci **6**, 520-527.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D.F.** (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. Plant Cell **10**, 435-450.
- Zhang, S., Liu, Y., and Klessig, D.F.** (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. Plant J **23**, 339-347.
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W., and Song, C.-P.** (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. Plant Physiol **126**, 1438-1448.

Publikationsliste

Thoma, I., Krischke, M., Loeffler, C. and Mueller, M. J.,(2003). The isoprostanoid pathway in plants. Chem Phys Lipids, im Druck

Loeffler, C., Thoma, I., Krischke, M. and Mueller, M.J., (2003). The isoprostanoid pathway in plants. In: Advances in prostaglandin, leukotriene and other bioactive lipid research: basic science and clinical applications, im Druck.

Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T. and Mueller, M.J.; (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen spezies trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. Plant J, im Druck.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Martin J. Mueller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Er hat durch zahlreiche wertvolle Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sein stetes Interesse, seine ansteckende Begeisterung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen waren stets ein Ansporn.

Herrn Dr. Kim Messer (Institut für Organische Chemie, Würzburg) gilt mein Dank für die Aufnahme von Circular dichroismus-Spektren, sowie die Unterstützung bei deren Interpretation.

Von unschätzbarem Wert war die gute Zusammenarbeit mit allen Kollegen. Mein Dank gilt insbesondere Herrn M. Krischke, Frau S. Koch und Herrn Dr. A. Sinha. In gleichem Maße möchte ich Frau M. Eisenmann und Frau B. Dierich für die engagierte und kompetente Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Untersuchungen danken. Das gute Verhältnis zu allen Kollegen war Grundlage einer besonderen Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. R. Imbusch und Frau Dr. C. Löffler nicht nur für wertvolle wissenschaftliche Ratschläge und anregende fachliche Diskussionen bedanken. Ihre Freundschaft und persönliche Unterstützung gaben mir wertvollen Rückhalt.

Für wertvolle Hinweise zur Anfertigung der Arbeit danke ich Frau Dr. G. Gresser.

Im Rahmen ihrer Ausbildung führten Frau B. Glas, Frau B. Röger, Frau E. Kneuer, Frau S. Lüdemann, Frau D. Lobanowitsch, Herr K. Konrad, Frau V. von Neumann-Cosel und Herr M. Schulz zahlreiche Experimente tatkräftig und kompetent durch. Für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit möchte ich mich bedanken.

Herrn Dr. M. Voitke gilt mein Dank für die Beratung in statistischen Fragestellungen. Frau Dr. S. Berger danke ich für die Überlassung von mikrobiologischen Kulturen, sowie die Einführung in den Umgang mit Pilzen und Bakterien. Für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung von Computern und Netzwerk gilt mein herzlicher Dank Herrn A. Zeitler.

Den Institutsgärtnern in Würzburg und den Damen des Zellkulturlabors in München möchte ich für die Anzucht und Pflege des für die Versuche benötigten pflanzlichen Materials danken. Frau Rickl und Frau Gotovac gebührt mein Dank für die Aufnahme zahlreicher Diapositive.

Den Sonderforschungsbereichen 369 in München und 567 in Würzburg danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung und stete Förderung die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichte. Ebenso möchte ich Martin danken, der mir in den letzten Monaten den nötigen privaten Rückhalt gab. In gleichem Maße möchte ich meinen Freunden, vor allem Nadja und Thomas, danken, die mir mit ihrer Freundschaft jederzeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Ingeborg Thoma
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdatum und -ort 22.08.1973; München

Schulbildung

09.1979 - 07.1992 Grundschule und neusprachliches Thomas-Mann-Gymnasium,
München
08.07.1992 Abitur

Hochschulstudium

10.1992 - 03.1993 Biologiestudium an der LMU München
03.1993 - 11.1997 Pharmaziestudium an der LMU München
05.09.1995 Erste Pharmazeutische Staatsprüfung
06.11.1997 Zweite Pharmazeutische Staatsprüfung

Praktische Ausbildung

03.1994 und 09.1994 Famulatur Kristall-Apotheke, München
11.1997 - 04.1998 Praktikum bei Novartis AG, Basel
05.1998 - 12.1998 Praktische Ausbildung Äskulap Apotheke, München
03.12.1998 Dritte Pharmazeutische Staatsprüfung
15.12.1998 Approbation als Apothekerin
10.1994 - 07.2001 Mitarbeiterin der Äskulap Apotheke, München
05.1998 - 12.1998 Praktische Ausbildung zur Apothekerin

Promotionsstudium

02.1999 - 07.2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von
Privatdozent Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für
Pharmazeutische Biologie der LMU München
08.2001 - 12.2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Dr.
Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen 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