

**Oxidativer Stress in Pflanzen:
Untersuchungen zum D₁-Phytoprostan-Signalweg**

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

**vorgelegt von
Markus Krischke
aus
Starnberg**

Würzburg, 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

1. Gutachter: Prof. Dr. M. J. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Högger

Tag des Promotionskolloquiums:

Promotionsurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
I.1	Oxylipine in Tieren	2
I.1.1	Enzymatisch gebildete Oxylipine - Prostaglandine	2
I.1.1.1	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentan(on)-Prostaglandinen	2
I.1.1.2	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Prostaglandinen	4
I.1.1.3	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Prostanoiden in Invertebraten	5
I.1.2	Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine - Isoprostanoide	6
I.1.2.1	Vorkommen und Biosynthese von Isoprostanen	7
I.1.2.2	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Isoprostanen	9
I.1.2.3	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Neuroprostanen	10
I.2	Biologische Aktivität von Oxylipinen in Tieren	10
I.2.1	Biologische Aktivität von Cyclopentan(on)-Oxylipinen	11
I.2.2	Biologische Aktivität von Cyclopentenon-Oxylipinen	11
I.2.2.1	Cyclopentenon-Prostaglandine als natürliche Liganden für PPAR γ	12
I.2.2.2	Cyclopentenon-Prostaglandine als NF- κ B-Inhibitoren	13
I.3	Oxylipine in Pflanzen	14
I.3.1	Enzymatisch gebildete Oxylipine - Jasmonate	15
I.3.2	Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine - Phytoprostane	19
I.3.2.1	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentan(on)-Phytoprostanen	19
I.3.2.2	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Phytoprostanen	22
I.3.3	Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Oxylipinen in <i>Chromolaena</i> -Spezies	24
I.4	Biologische Aktivität von Oxylipinen in Pflanzen	25
I.4.1	Biologische Aktivität von Cyclopentanon-Oxylipinen	25
I.4.2	Biologische Aktivität von Cyclopentenon-Oxylipinen	26
I.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	28
II.	MATERIAL	30
II.1	Pflanzliches Material	30
II.1.1	Zellsuspensionskulturen	30
II.1.2	Frische Pflanzenorgane	30

II.2	Chemikalien	31
II.3	Verbrauchsmaterial	31
II.4	Geräte	32
III.	METHODEN	35
III.1	Derivatisierung von freien Fettsäuren und deren Derivate	35
III.1.1	Herstellung von Diazomethan	35
III.1.2	Herstellung von Methylestern	35
III.1.3	Herstellung von Pentafluorbenzylestern	35
III.1.4	Herstellung von Trimethylsilylethern	36
III.1.5	Herstellung von Methoximen	36
III.2	Katalytische Hydrierung	36
III.3	Isolierung von F₁-Phytosteranen	37
III.3.1	Reinigung von α -Linolensäure	37
III.3.2	Autoxidation von α -Linolensäure zur Herstellung von PPF ₁	37
III.3.3	Präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von PPF ₁	37
III.3.4	Festphasenextraktion von PPF ₁	37
III.3.5	Quantifizierung von PPF ₁	38
III.3.6	Festphasenextraktion von PPF ₁ -PFB-Estern	38
III.4	Chromatographische Methoden	38
III.4.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	38
III.4.2	Festphasenextraktion (SPE)	39
III.4.3	Präparative Säulenchromatographie	40
III.4.4	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	41
III.4.4.1	Analytische HPLC-Trennung von Deoxy-J ₁ /A ₁ -Phytosteranen	41
III.4.4.2	Analytische HPLC-Trennung von 15-Deoxy-Prostaglandinen J ₂ /A ₂	41
III.4.4.3	HPLC-Quantifizierung von Deoxy-J ₁ /A ₁ -Phytosteranen	42
III.4.4.4	Semipräparative HPLC-Trennung von D ₁ /E ₁ -Phytosteranen	42
III.4.4.5	Präparative HPLC-Trennung von Deoxy-J ₁ -Phytosteranen	43
III.4.4.6	Fluoreszenz-HPLC zur Bestimmung von Cyclopentenonen	43
III.4.4.7	Fluoreszenz-HPLC zur Bestimmung von Scopoletin	45
III.4.5	Gaschromatographie (GC)	46

III.5	Massenspektrometrie (MS)	49
IV.	ERGEBNISSE	50
IV.1	Gewinnung von PPD₁ und dPPJ₁ durch Partialsynthese	50
IV.1.1	Isolierung von F ₁ -Phytosteranen	51
IV.1.2	Herstellung von PPF ₁ -n-Butylboronsäure-Estern	52
IV.1.3	Festphasenextraktion von PPF ₁ -n-Butylboronsäure-Estern	53
IV.1.4	Herstellung von Tetrahydropyranylethern	53
IV.1.5	Hydrolyse von PPF ₁ -n-Butylboronsäure-Estern	53
IV.1.6	Festphasenextraktion von F ₁ -Phytosteran-THP-Ethern	54
IV.1.7	Oxidation von PPF ₁ -Tetrahydropyranylethern	54
IV.1.8	Hydrolyse von D ₁ /E ₁ -Phytosteran-THP-Ethern	55
IV.1.9	Herstellung von Deoxy-J ₁ /A ₁ -Phytosteranen	55
IV.1.10	Festphasenextraktion von dPPJ ₁ und dPPA ₁	56
IV.1.11	Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Isolierung von Cyclopentenonen	57
IV.1.12	HPLC-Nachweis und -Isolierung von Cyclopentenon-Phytosteranen bzw. -Prostaglandinen	57
IV.2	Massenspektrometrische Charakterisierung von Cyclopentenon- Phytosteranen	60
IV.2.1	GC-MS-Analytik von dPPJ ₁ /A ₁ -Methylestern	60
IV.2.2	GC-MS-Analytik von dPPJ ₁ -Methoxim-Methylestern	63
IV.2.3	GC-MS-Analytik von hydrierten dPPJ ₁ /A ₁ -Methylestern	65
IV.2.4	GC-MS-Analytik von hydrierten dPPJ ₁ /A ₁ -PFB-Estern	70
IV.3	Quantifizierung von Deoxy-J₁-Phytosteranen	73
IV.4	Gewinnung von PPD₁ und dPPJ₁ durch Autoxidation von α-Linolensäure	74
IV.4.1	Autoxidation von α-Linolensäure zur Herstellung von PPD ₁	74
IV.4.2	Präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von PPD ₁	75
IV.4.3	HPLC-Isolierung von D ₁ -Phytosteranen	76
IV.4.4	GC-MS-Analytik von D ₁ -Phytosteranen	78
IV.4.5	Herstellung und präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von dPPJ ₁	80
IV.4.6	Präparative HPLC-Isolierung von Deoxy-J ₁ -Phytosteranen	81

IV.5	Nachweis von PPD₁ und dPPJ₁ in pflanzlichem Material	82
IV.5.1	Nachweis von PPD ₁ und dPPJ ₁ mittels GC-MS	82
IV.5.2	Nucleophile Addition von Glutathion an α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen	86
IV.5.3	Nachweis von Deoxy-J ₁ -Phytosteranen mittels Fluoreszenz-HPLC	87
IV.5.4	Extraktion und Reinigung von dPPJ ₁ aus Pflanzenmaterial	90
IV.5.5	Extraktion und Reinigung von PPD ₁ aus Pflanzenmaterial	92
IV.6	Vorkommen von dPPJ₁ und PPD₁ in Pflanzen	93
IV.6.1	Basale Konzentrationen von dPPJ ₁ und PPD ₁ in Pflanzenmaterial	93
IV.6.2	Induzierte Akkumulation von dPPJ ₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen	95
IV.6.3	Induzierte Akkumulation von dPPJ ₁ in Pflanzen	99
IV.7	Biologische Aktivität von dPPJ₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen	101
V.	DISKUSSION	106
V.1	Synthese von D ₁ -Phytosteranen und Deoxy-J ₁ -Phytosteranen	106
V.2	Vorkommen von Cyclopentenon-Isoprenen in der Natur	113
V.3	Phytosterane: Mediatoren von oxidativem Stress?	126
V.4	Ausblick	133
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	134
VI.	SUMMARY	137
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

13-HPOTE	13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
AOC	Allenoxid-Synthase
AOS	Allenoxid-Cyclase
BHT	Butylhydroxytoluol
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CI	positive chemische Ionisation (engl.: chemical ionization)
COX	Cyclooxygenase
d	Deoxy
DC	Dünnschichtchromatographie
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
dnOPDA	Dinor-Oxo-Phytodiensäure
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOT	12,13(S)-Epoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
FG	Feuchtwicht
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
iP	Isoprostane
JA	Jasmonsäure
K	Kinase
LOX	Lipoxygenase
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MGDG	Monogalactosyl-Diacylglycerol
MS	Massenspektrometrie
NH ₂	Aminopropyl-
NICI	negative chemische Ionisation (engl.: negative ion chemical ionization)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance)
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
OPR	12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PFB-	Pentafluorbenzyl-
PFB-Br	α -Brom-2,3,4,5,6-Pentafluortoluol (Pentafluorbenzylbromid)
PG	Prostaglandin
PP	Phytosteran
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren (engl.: peroxisome-proliferator-activated receptors)
RES	Reaktive Elektrophile Spezies
RF	relative Laufstrecke zur Front
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RP-	Umkehrphase (reversed phase-)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SiOH	Silica-
SOD	Superoxid-Dismutase
SPE	Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction)
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TG	Trockengewicht
THP-	Tetrahydropyranyl-
TMS-	Trimethylsilyl-
TPP	Triphenylphosphin
UV	ultravioletter Bereich des Lichtes
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

I. EINLEITUNG

Biomembranen sind wahrscheinlich genauso alt wie lebende Organismen, da erst durch sie eine Abgrenzung des Zellinhaltes von seiner Umgebung möglich ist. Biomembranen dienen als Grenzflächen zwischen einzelnen Zellen, Zellen und ihrer Umgebung und zwischen Zellorganellen und dem Cytoplasma. Membranen sind außerdem auch an Signalwahrnehmung und Signalweiterleitung beteiligt. Sie stellen zudem eine wichtige Quelle für die Bildung von Signalmolekülen, die aus Fettsäuren generiert werden, dar. Diese Moleküle können als intrazelluläre Mediatoren, extrazelluläre Signale oder als Botenstoffe zwischen verschiedenen Organismen fungieren.

Oxygenierte Fettsäuren (Oxylipine) sind sowohl im Tier als auch in der Pflanze als Signalstoffe seit langem etabliert. Eine der bedeutendsten und am besten untersuchten Substanzen im Tier stellen Cyclopentan(on)-Verbindungen wie z. B. die Prostaglandine dar. In den vergangenen Jahren wurde eine weitere Verbindungsklasse genauer charakterisiert, die ein eigenes Spektrum an biologischen Aktivitäten besitzt, die Cyclopentenon-Prostaglandine. Das im Vergleich zu den Cyclopentanonen unterschiedliche Wirkspektrum wird zum Teil auf das α,β -ungesättigte Keton im Ringsystem zurückgeführt (Straus und Glass, 2001). Interessanterweise besitzen Oxylipine in Tieren und Pflanzen auffallende Ähnlichkeiten in Struktur, Biosynthese und Funktion (Blée, 2002). Ein wichtiger Signalstoff in Pflanzen ist Jasmonsäure (JA), eine Cyclopentanon-Verbindung, die an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen in der Pflanze beteiligt ist, z. B. bei pflanzlichen Abwehrreaktionen (Farmer und Ryan, 1992). 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), ein Zwischenprodukt in der Jasmonsäure-Biosynthese mit Cyclopentenon-Struktur, ist ebenfalls biologisch aktiv. OPDA ist beispielsweise der entscheidende Signalstoff bei der Rankenspiralisierung von *Bryonia dioica* (Weiler *et al.*, 1993). Jasmonsäure und 12-Oxo-Phytodiensäure besitzen zum Teil gleiche biologische Funktionen, während an anderen Reaktionen nur ein Signalstoff beteiligt zu sein scheint. Dieser Unterschied im Wirkungsspektrum kann in Analogie zu den Cyclopentenon-Prostaglandinen im Tier in der reaktiven Cyclopentenon-Struktur von 12-Oxo-Phytodiensäure begründet sein (Farmer *et al.*, 2003; Stintzi *et al.*, 2001; Weber, 2002).

I.1 Oxylipine in Tieren

Der größte Teil der in tierischen Organismen gebildeten Oxylipine leitet sich von Arachidonsäure (20:4) ab, der häufigsten ungesättigten Fettsäure in Membranlipiden. Die daraus gebildeten Fettsäure-Derivate werden als Eicosanoide bezeichnet (griech. εἴκοσιν = zwanzig)?

I.1.1 Enzymatisch gebildete Oxylipine - Prostaglandine

Eine wichtige Klasse der Eicosanoide sind die Prostaglandine (z.B. PGD_2 , PGE_2) (siehe Übersicht in Abbildung I.2), die enzymatisch aus Arachidonsäure gebildet werden. Ihr Name bezieht sich auf die Prostata, in der sie zuerst nachgewiesen wurden (von Euler, 1934). Die Struktur der Prostaglandine basiert auf der nicht natürlich vorkommenden Prostansäure (siehe Abbildung I.1). Der Buchstabe, der der Abkürzung PG nachgestellt ist, bezeichnet die Art der Sauerstoffsubstitution am Cyclopentanring mit Hydroxyl- bzw. Ketogruppen, der numerische Index gibt die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten an. Ein nachgestelltes α bzw. β (z.B. bei $\text{PGF}_{2\alpha}$) charakterisiert die Stellung der C9-Hydroxygruppe unterhalb oder oberhalb der Ringebene.

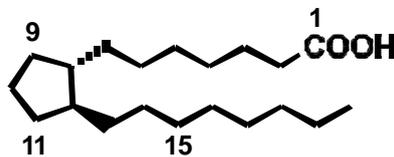


Abbildung I.1: Grundgerüst und Kohlenstoff-Numerierung der Prostansäure

Cyclopentan-Prostaglandine spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, beispielsweise bei der Regulation des Wasserhaushalts, bei Entzündungsprozessen, bei der Wundheilung und Reproduktion. Prostaglandine können in Säugetieren in fast allen Geweben und Organen synthetisiert werden, aber nicht in allen Zelltypen (Smith und Marnett, 1991).

I.1.1.1 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentan(on)-Prostaglandinen

Die Biosynthese dieser Verbindungen umfasst drei Schritte: die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranlipiden durch eine Phospholipase, die Umwandlung in PGH_2 durch die PGH -Synthase und die anschließende Bildung der verschiedenen Prostaglandin-Typen (siehe Abbildung I.2) (Smith und Fitzpatrick, 1996).

I. EINLEITUNG

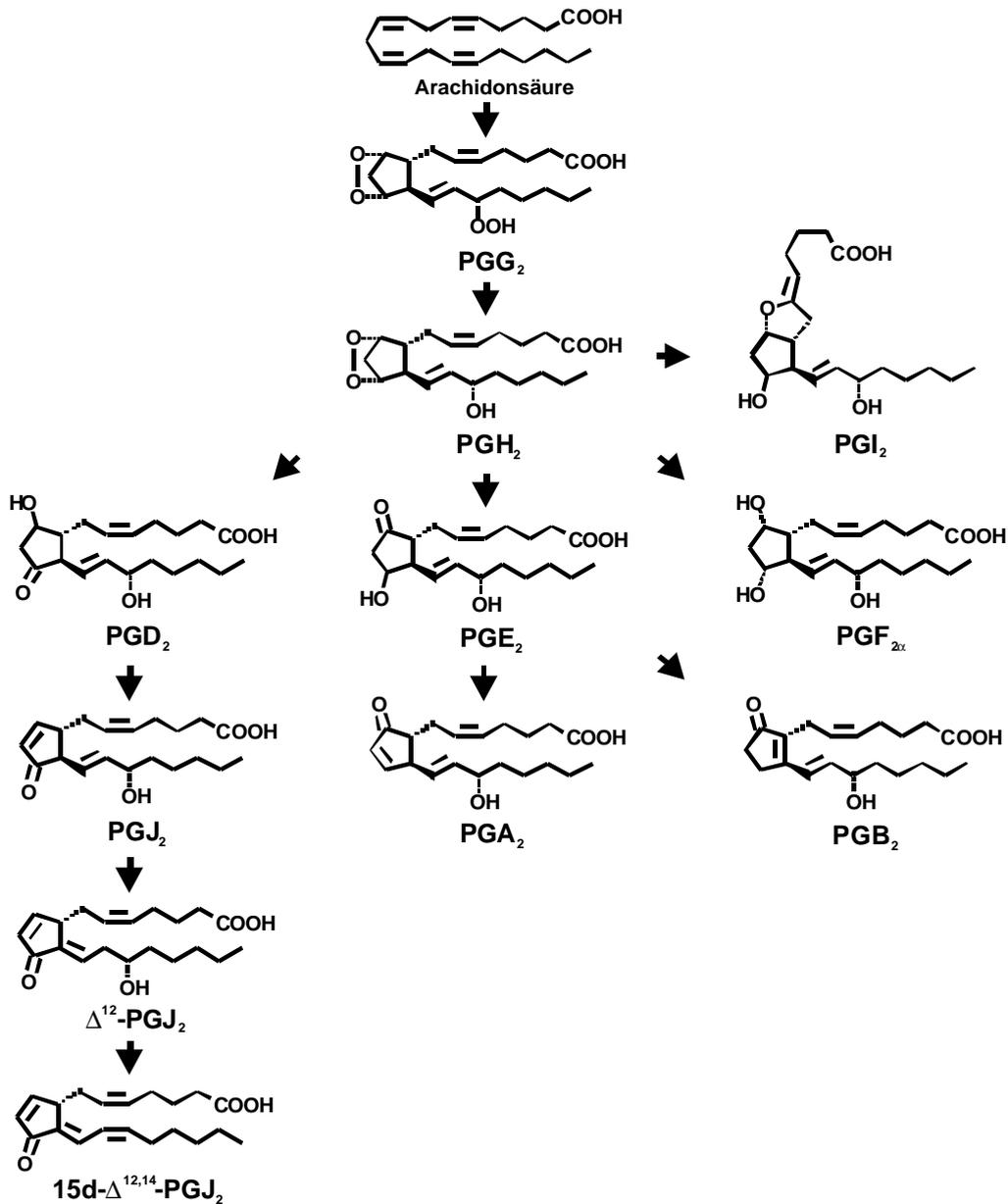


Abbildung I.2: Ringstrukturen verschiedener Prostaglandin-Klassen. PGG₂, H₂, D₂, E₂, F_{2a} und I₂ (Prostacyclin) sind enzymatisch gebildete Prostaglandine des tierischen Organismus. Die Cyclopentenone PGJ₂, D¹²-PGJ₂ und 15d-D^{12,14}-PGJ₂ sowie PGA₂ und PGB₂ sind nichtenzymatisch gebildete Abbauprodukte von PGD₂ bzw. PGE₂.

Prostaglandine werden *in vivo* nicht gespeichert, sondern nach Zellstimulation *de novo* synthetisiert (Marks und Fürstenberger, 1999). Dabei wird Arachidonsäure nach einem Reiz durch eine Phospholipase aus der Zellmembran herausgelöst und von der PGH-Synthase, einem bifunktionellen Enzym, bestehend aus einer Cyclooxygenase und einer Peroxidase, in ein Bicyclo-Endoperoxid überführt (PGH₂). Prostaglandin H₂ kann weiter über spezifische Synthasen in die entsprechenden Cyclopentan-Prostaglandine D, E und F sowie Thromboxan und Prostacyclin umgesetzt werden (Marks und

Fürstenberger, 1999). Welche Verbindung dabei gebildet wird, hängt vom Zelltyp ab, da fast jede Zelle nur ein PGH_2 -metabolisierendes Enzym besitzt (Smith und Marnett, 1991). Durch Reduktion kann aus PGH_2 Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ gebildet werden, die Prostaglandine D_2 und E_2 entstehen durch Umlagerung von PGH_2 (Smith, 1992).

I.1.1.2 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Prostaglandinen

D- und E-Ring-Verbindungen sind als β -Hydroxyketone im Gegensatz zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ relativ instabil, sie können nichtenzymatisch zu Cyclopentenon-Derivaten dehydratisieren. Prostaglandin E_2 und D_2 werden spontan unter Wasserabspaltung und Isomerisierung in PGA_2 bzw. PGB_2 sowie eine Serie von Prostaglandinen J umgewandelt (siehe Abbildung I.2) (Straus und Glass, 2001). PGJ_2 wurde erstmals von Fukushima *et al.* bei Untersuchungen zur antitumoralen Aktivität von PGD_2 entdeckt (Fukushima *et al.*, 1982). Ein Jahr später konnten Fitzpatrick und Wynalda durch *in vitro*-Inkubation von PGD_2 in Albumin-haltigem Puffer drei weitere Abbauprodukte isolieren, 15d-PGD_2 , $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ und $15\text{d-}\Delta^{12,14}\text{-PGJ}_2$ (Fitzpatrick und Wynalda, 1983). In neueren Untersuchungen zum *in vitro*-Abbau von PGD_2 wurde der bisher angenommene Weg zur Bildung von Cyclopentenon-Prostaglandinen widerlegt (Shibata *et al.*, 2002). Hier konnte gezeigt werden, dass die Bildung von 15d-PGD_2 , PGJ_2 und $15\text{d-}\Delta^{12,14}\text{-PGJ}_2$ Albumin-unabhängig abläuft, wobei $15\text{d-}\Delta^{12,14}\text{-PGJ}_2$ direkt aus PGJ_2 gebildet werden kann. Das bisher angenommene Intermediat $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$ entsteht dagegen nur über einen Albumin-abhängigen Abbauweg aus PGD_2 und stellt ein Endprodukt im PGD_2 -Metabolismus dar (siehe Abbildung I.3) (Shibata *et al.*, 2002).

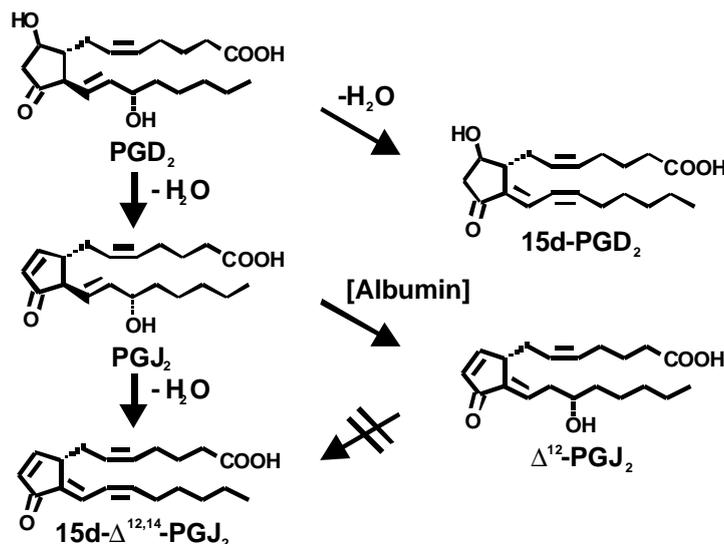


Abbildung I.3: PGD_2 -Abbauweg. Die in der Seitenkette von $\text{D}^{12}\text{-PGJ}_2$ enthaltene isolierte Hydroxy-Funktion ist reaktionsträge und wird nicht mehr als Wasser abgespalten.

Obwohl die *in vivo*-Existenz dieser Verbindungen seit ihrer Entdeckung kontrovers diskutiert wird (Maxey *et al.*, 2000), gibt es Evidenz für die Entstehung von Cyclopentenon-Derivaten, z.B. von 15d- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, *in vivo* (Gilroy *et al.*, 1999; Straus und Glass, 2001). Die entsprechende Literatur zu diesem Thema sollte kritisch betrachtet werden, da die Umwandlung von PGD₂ und PGE₂ auch *in vitro*, z.B. während der Probenaufarbeitung, stattfinden kann (Maxey *et al.*, 2000; Straus und Glass, 2001).

Cyclopentenon-Prostaglandine enthalten als gemeinsames Strukturmerkmal ein elektrophiles α,β -ungesättigtes Keton, das anfällig für nucleophile Additionen ist (Michael-Addition). Δ^{12} -PGJ₂ zum Beispiel reagiert *in vitro* kovalent mit Thiolen wie Cystein und Glutathion (GSH). Diese Konjugationsreaktion, die bereits nicht-enzymatisch abläuft, kann durch die Anwesenheit von Glutathion-S-Transferasen (GST) noch beschleunigt werden (Atsmon *et al.*, 1990).

I.1.1.3 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Prostanoiden in Invertebraten

Prostaglandine wurden neben in Säugetieren auch in einer Vielzahl anderer Wirbeltiere und Wirbellosen gefunden, z.B. in Vögeln, Fröschen und Insekten (Bundy, 1985). Eine große Vielfalt an Eicosanoiden wurde außerdem in Korallen nachgewiesen. Sowohl Prostaglandine vom A-, E- und F-Typ als auch verschiedene atypische Prostanoiden, wie Clavulone und Punaglandine, wurden bisher in Korallen entdeckt (siehe Abbildung I.4) (Gerwick, 1993).

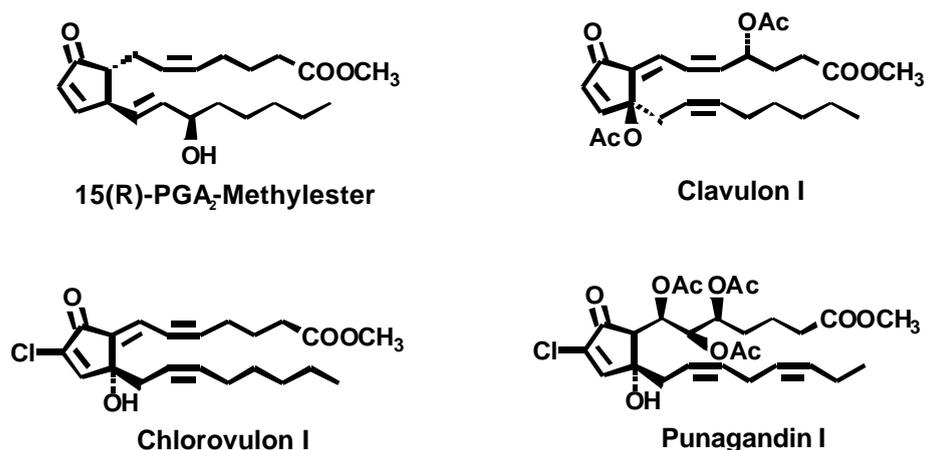


Abbildung I.4: Eine Auswahl verschiedener Prostanoiden, die aus Korallen isoliert wurden. Die C15-Hydroxy-Gruppe des PGA₂-Methylester aus *P. homomalla* weist im Gegensatz zu den Prostaglandinen in Säugetieren eine *R*-Konfiguration auf.

Die Karibische Koralle *Plexaura homomalla* ist der Organismus mit der höchsten Prostaglandin-Konzentration in der Natur (Varvas *et al.*, 1999). Neben E- und F-Ring-Verbindungen konnten mit PGA_2 -Ester Cyclopentenone als Hauptprodukte nachgewiesen werden (Varvas *et al.*, 1999). Interessanterweise sind die aus der Koralle isolierten 15*R*-Prostaglandine im Vergleich zu den 15*S*-Verbindungen im Säugetier entgegengesetzt konfiguriert (Valmsen *et al.*, 2001). Trotz der Charakterisierung einer Cyclooxygenase in *P. homomalla* ist die Biosynthese dieser Verbindungen noch nicht vollständig geklärt (Valmsen *et al.*, 2001).

Eine weitere Gruppe von Cyclopentenon-Prostanoiden, die Clavulone (Kikuchi *et al.*, 1982; Kobayashi *et al.*, 1982), sowie einfach halogenierte Clavulon-Analoga, wie z.B. die Chlorovulone (Iguchi *et al.*, 1985), konnten aus der Weichkoralle *Clavularia viridis* isoliert werden (siehe Abbildung I.4). Auch hier wurde ein Enzym mit Homologie zu Cyclooxygenasen im Säugetier gefunden (Koljak *et al.*, 2001). Ungeachtet dessen besteht die Möglichkeit, dass Prostanoiden wie die Clavulone in Korallen über einen Lipoxygenase/Allenoxid-Weg gebildet werden können (Varvas *et al.*, 1999), vergleichbar mit dem Biosyntheseweg von 12-Oxo-Phytodiensäure und Jasmonsäure in Pflanzen (Tijet und Brash, 2002).

Den Chloroclavulonen ähnliche Cyclopentenon-Verbindungen, sogenannte Punaglandine, wurden in der Achtstrahligen Koralle *Telestoa riisei* gefunden (siehe Abbildung I.4) (Baker *et al.*, 1985). Sowohl die Clavulone als auch ihre halogenierten Analoga, Chlorovulone und Punaglandine, besitzen cytotoxische und antiproliferative Aktivität in verschiedenen Zellsystemen (Gerwick, 1993). Die Cytotoxizität spielt möglicherweise bei der Verteidigung der Korallen gegen andere maritime Lebewesen eine Rolle (Grechkin, 1995).

I.1.2 Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine - Isoprostanoiden

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure sind äußerst oxidationsempfindlich. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff kann so eine Vielzahl von Peroxy-, Hydroxy- und Epoxy-Verbindungen durch Autoxidation gebildet werden. Die beiden dafür notwendigen Voraussetzungen sind das Vorhandensein von nichtkonjugierten, *cis*-ständigen Doppelbindungen in den Fettsäuren und die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (Marks und Fürstenberger, 1999).

Neben der enzymatischen Synthese von Prostaglandinen kann es durch nichtenzymatische, Radikal-katalysierte Oxidation von Arachidonsäure zur Bildung von Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen kommen (Morrow *et al.*, 1990a). Da diese Verbindungen racemische Isomere der Prostaglandine sind, werden sie als

Isoprostane (iP) bezeichnet (Rokach *et al.*, 1997a). Isoprostane unterscheiden sich von Prostaglandinen in der Länge und der Stereochemie der Seitenketten, die durch den unterschiedlichen Biosyntheseweg begründet ist (Rokach *et al.*, 1997b).

I.1.2.1 Vorkommen und Biosynthese von Isoprostanen

Isoprostane entstehen im Vergleich zu den Prostaglandinen über ähnliche Zwischenstufen. Bei der Prostaglandin-Biosynthese wird unter dem Einfluss der PGH-Synthase ausschließlich ein Isomer, Prostaglandin H₂, mit einer *trans*-Stellung der beiden Seitenketten gebildet. Dagegen entstehen bei der Radikal-katalysierten Oxidation von Arachidonsäure fast nur *cis*-Isomere (Liu *et al.*, 1998). Es gibt zwei Vorschläge für die Bildung von Isoprostanen, die jeweils nach einem darin vorkommenden Zwischenprodukt benannt wurden: den Endoperoxid- und den Dioxetanweg. In Abbildung I.5 ist der Endoperoxidweg dargestellt (Morrow *et al.*, 1990b):

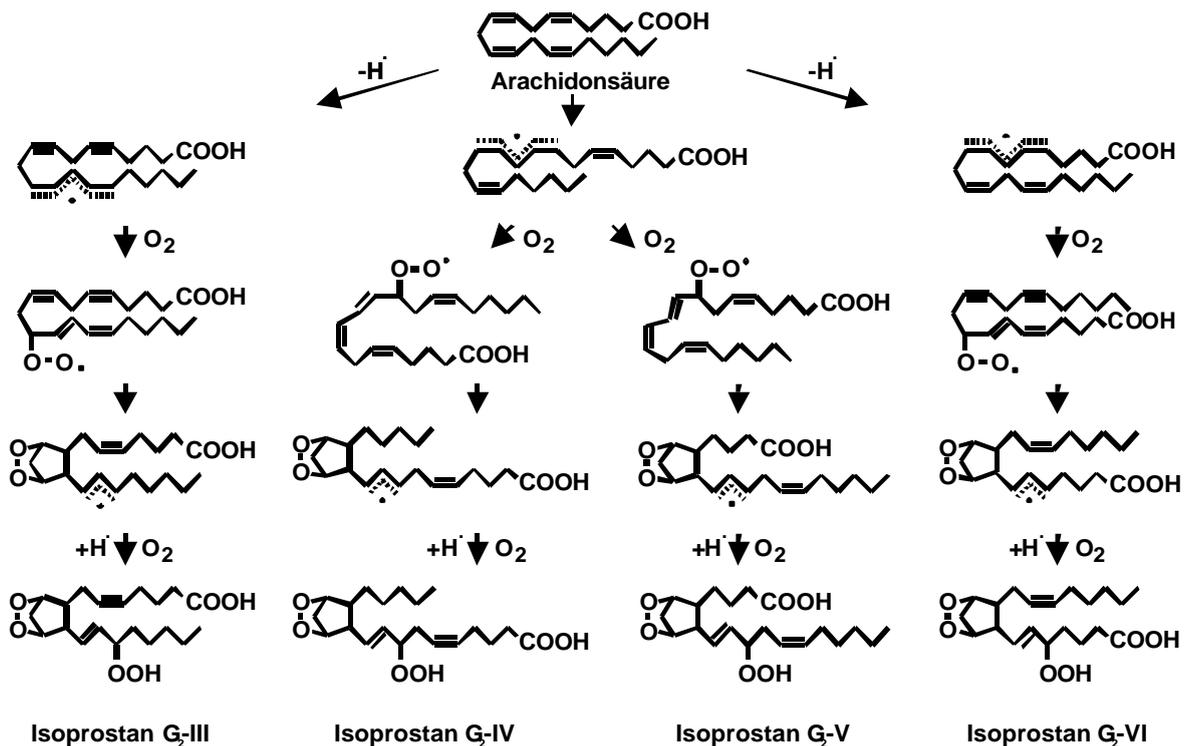


Abbildung I.5: Der Endoperoxidmechanismus: postulierte Synthese von Isoprostanen aus Arachidonsäure. Als Intermediat entsteht dabei ein Endoperoxid. Theoretisch können über diesen Reaktionsmechanismus vier regioisomere Verbindungen (III – VI) gebildet werden, die jeweils aus 16 Isomeren bestehen.

Da für die Bildung eines Cyclopentan-Rings lediglich eine 1,4,7-Octatrien-Einheit notwendig ist, können bei der Isoprostan-Biosynthese insgesamt vier Regioisomere mit unterschiedlich langen Seitenketten formiert werden (Rokach *et al.*, 1997b). Im ersten Schritt wird eines der bis-allylischen Wasserstoffatome von C 13, 10 oder 7 radikalisch abgespalten, die dabei entstehenden Pentadienylradikale können mit molekularem Sauerstoff Peroxylradikale bilden. Diese Radikale können zum Bicyclo-Endoperoxid umgelagert werden und anschließend ein weiteres Sauerstoffmolekül aufnehmen. Die so gebildeten Bicyclo-Endoperoxyradikale können wiederum z.B. von einer weiteren Fettsäure Wasserstoff abstrahieren. Da die Cyclisierung der Endoperoxide nach den Woodward-Hoffmann-Regeln disrotatorisch erfolgt, sind die Seitenketten fast ausschließlich *cis*-orientiert (Corey *et al.*, 1984; O'Connor *et al.*, 1984; Porter *et al.*, 1984). Diese in Analogie zu den Prostaglandinen als G₂-Isoprostane (iPG₂) bezeichneten Verbindungen lagern sich im wässrigen Milieu spontan zu D₂- und E₂-Isoprostanen um (Morrow *et al.*, 1994), durch direkte Reduktion entstehen F₂-Isoprostane (Morrow *et al.*, 1990a) (siehe Abbildung I.6).

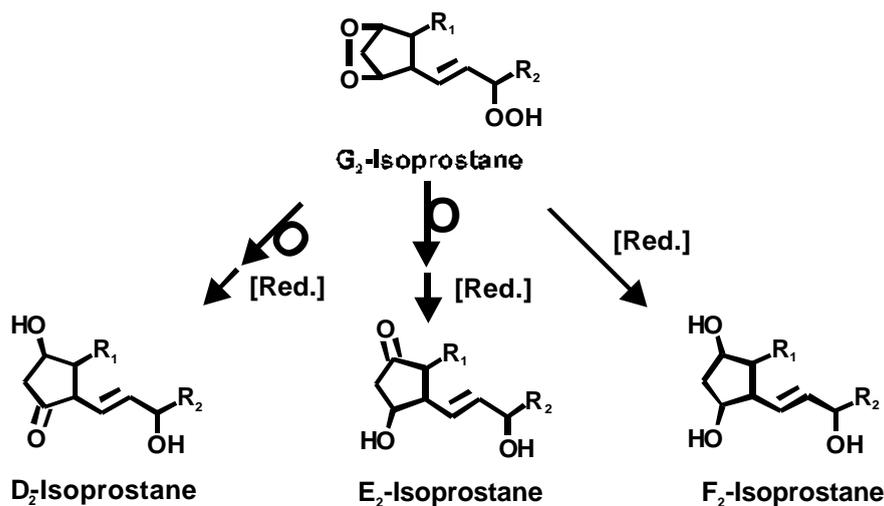


Abbildung I.6: Umlagerung des Endoperoxids iPG₂ in die verschiedenen Isoprostan-Klassen iPD₂, E₂ und F₂. Die Reste R₁ und R₂ repräsentieren die Carboxylat- bzw. die Methylenden von Arachidonsäure.

Für die Entstehung von Isoprostanen wurde zudem ein alternativer Biosyntheseweg diskutiert, der über eine Dioxetan-Zwischenstufe verläuft (nicht abgebildet) (Corey und Wang, 1994). Inzwischen konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Isoprostan-Biosynthese über den Dioxetanweg unwahrscheinlich ist (Yin *et al.*, 2003).

Isoprostane konnten in allen tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Morrow und Roberts, 1997), wobei ihre Konzentration die der Prostaglandine um mehr als eine Zehnerpotenz übersteigen kann (Liu *et al.*, 1998). Bei

vielen pathophysiologischen Prozessen im tierischen Organismus, z.B. bei Asthma, Diabetes oder Krebs, werden verstärkt freie Radikale bzw. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die ungesättigte Fettsäuren oxidieren können (Janssen, 2001; Morrow *et al.*, 1999). Tatsächlich wird bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine verstärkte Bildung von Isoprostanen nachgewiesen (Janssen, 2001), diese Verbindungen können deshalb als Marker für oxidativen Stress eingesetzt werden (Roberts und Morrow, 2002). Isoprostane sind darüber hinaus biologisch aktiv. Zwei synthetisch hergestellte Isomere, iPE₂ Typ III und iPF_{2α} Typ III, sind potente renale Vasokonstriktoren, lösen Bronchokonstriktion aus und modulieren die Plättchenaggregation (Pratico *et al.*, 2001). Während Isoprostane als Marker für Lipidperoxidation etabliert sind, ist ihre Rolle als Mediator von oxidativem Stress noch unklar (Janssen, 2001).

I.1.2.2 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Isoprostanen

Das wachsende Interesse an reaktiven Cyclopentenon-Prostaglandinen aufgrund ihres im Vergleich zu den Cyclopentan(on)-Verbindungen unterschiedlichen Wirkungsspektrums führte auch zur Entdeckung einer weiteren Gruppe von Isoprostanen, die ebenfalls ein α,β -ungesättigtes Keton enthalten.

In Analogie zu den Prostaglandinen sind auch die D₂- und E₂-Isoprostane instabile Verbindungen, die spontan unter Wasserabspaltung in Cyclopentenon-Isoprostane umgewandelt werden können (siehe Abbildung I.7).

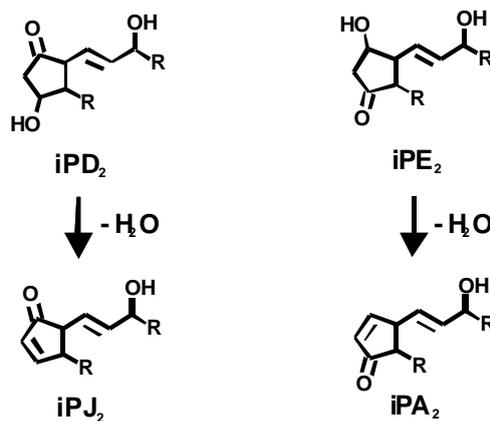


Abbildung I.7: Bildung von Cyclopentenon-Isoprostanen durch Dehydratisierung.

Chen *et al.* konnten zeigen, dass A₂- und J₂-Isoprostane *in vitro* durch Autoxidation von Arachidonsäure gebildet werden können (Chen *et al.*, 1999). Außerdem gelang es, diese Verbindungen in veresterter Form in Lipiden nachzuweisen (Chen *et al.*, 1999). Unveresterte, freie Cyclopentenon-Isoprostane konnten *in vivo* dagegen nicht detektiert

werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die schnelle Metabolisierung dieser Moleküle sein (Roberts und Morrow, 2002), da α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen kovalent mit Nucleophilen wie Glutathion oder freien Thiolen, z.B. in Proteinen, reagieren (Chen *et al.*, 1999).

I.1.2.3 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Neuroprostanen

Cyclische Verbindungen können durch Autoxidation aus jeder mindestens dreifach ungesättigten Fettsäure gebildet werden. Die einzig notwendige Voraussetzung ist die Anwesenheit einer 1,4,7-Octatrieneinheit, molekularer Sauerstoff und ROS (Roberts und Morrow, 2002). Aus Docosahexaensäure (DHA, 22:6 ω 3), einer besonders in der grauen Substanz im Gehirn häufig vorkommenden ungesättigten Fettsäure, können nichtenzymatisch Isoprostan-ähnliche Verbindungen, sogenannte Neuroprostane, gebildet werden (Roberts *et al.*, 1998). Ein signifikanter Anstieg von F₄-Neuroprostanen konnte in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden, so dass diese Verbindungen einen Hinweis auf die Beteiligung freier Radikale bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen geben können (Roberts *et al.*, 1998).

Da die Biosynthese der Neuroprostane wie die Entstehung der Isoprostane über Endoperoxide verläuft, ist auch hier neben der Reduktion zu F-Ring-Verbindungen die Umlagerung zu D₄/E₄-Neuroprostanen möglich (Reich *et al.*, 2000). Diese wiederum können spontan *in vitro* und *in vivo* zu J₄/A₄-Neuroprostanen dehydratisieren (Fam *et al.*, 2002). Obwohl diese Verbindungen wie alle oben genannten Cyclopentenone mit Glutathion reagieren, sind die in verschiedenen biologischen Systemen nachgewiesenen Mengen um eine Zehnerpotenz höher als alle bisher analysierten Neuroprostane (Fam *et al.*, 2002).

Inwieweit Isoprostane und ihre verwandten Verbindungen, insbesondere die mit hochreaktiven Cyclopentenon-Strukturen, auch eine physiologische Rolle spielen, ist noch weitgehend unklar.

I.2 Biologische Aktivität von Oxylipinen in Tieren

Prostaglandine sind essentielle Mediatoren für eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in Säugetieren. Cyclopentan(on)-Prostaglandine binden an membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wodurch intrazelluläre „second messenger“ wie cAMP und Inositoltriphosphat reguliert werden (Straus und Glass, 2001). Während für Cyclopentenon-Prostaglandine noch keine membranständigen Rezeptoren identifiziert wurden, konnte jedoch nachgewiesen werden, dass

sie aktiv in die Zellen transportiert werden können (Negishi und Katoh, 2002) und mit zellulären Zielproteinen wie Transkriptionsfaktoren oder Signalmolekülen reagieren (Straus und Glass, 2001).

I.2.1 Biologische Aktivität von Cyclopentan(on)-Oxylipinen

Bislang konnten acht spezifische Prostanoid-Rezeptoren charakterisiert werden, vier davon für PGE (EP₁₋₄), je ein Rezeptor für PGF (FP), PGD (DP) und Prostacyclin (IP) sowie einer für Thromboxan (TP) (Narumiya *et al.*, 1999). Die Prostanoid-Rezeptoren können in drei Gruppen eingeteilt werden, je nach der Art der Signalweiterleitung und ihrer Effekte: Rezeptoren, die über einen cAMP-Anstieg eine Entspannung glatter Muskulatur auslösen (IP, DP, EP₂ und EP₄), Rezeptoren, die über eine Ca²⁺-Freisetzung zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur führen (TP, FP und EP₁) und ein inhibierender Rezeptor (EP₃), der über eine cAMP-Abnahme die Entspannung der glatten Muskulatur verhindert (Narumiya *et al.*, 1999). Entsprechend vielfältig sind die dadurch vermittelten Reaktionen, z.B. auf die Blutplättchenaggregation, die Regulation der Nierenfunktion, auf eine Aktivierung sensorischer Nerven sowie bei Schmerz- und Entzündungsreaktionen (Narumiya *et al.*, 1999).

I.2.2 Biologische Aktivität von Cyclopentenon-Oxylipinen

Verschiedene Mitglieder der Cyclopentenon-Familie besitzen antivirale, antitumorale und antiinflammatorische Eigenschaften (Straus und Glass, 2001). Prostaglandin A₂ und Δ¹²-Prostaglandin J₂ können zum Beispiel durch eine verstärkte Bildung cytoprotektiver Proteine die virale Replikation sowohl von DNA- als auch von RNA-Viren inhibieren (Santoro, 1997). PGA₂ und Prostaglandine der J-Familie hemmen die Zellproliferation und induzieren die Zelldifferenzierung (Fukushima, 1990; 1992). In höheren Konzentrationen sind diese Verbindungen cytotoxisch und können zur Apoptose führen (Fukushima, 1990; 1992; Kim *et al.*, 1993). 15d-PGJ₂ unterdrückt in aktivierten Makrophagen die Expression verschiedener Gene, z.B. für die Cyclooxygenase 2 (COX-2), den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Straus und Glass, 2001). Cyclopentenone werden auch als Stressantwort auf verschiedene Umweltreize gebildet, wobei sie selbst die Biosynthese verschiedener Stressbezogener Proteine induzieren, z.B. die Bildung von Hitzeschockproteinen (HSP) oder Proteindisulfid-Isomerasen (Straus und Glass, 2001). Außerdem können weitere cytosolische Zielproteine durch kovalente Reaktion mit Cyclopentenonen wie 15d-PGJ₂ irreversibel modifiziert werden. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor NF-κB (siehe

I.2.2.2) (Cerunda-Morollon *et al.*, 2001; Straus *et al.*, 2000), I- κ B β Kinase, eine NF- κ B-aktivierende Kinase (Rossi *et al.*, 2000), und die Thioredoxin-Reduktase (TrxR), die an der Regulation des Redox-Status in der Zelle beteiligt ist (Moos *et al.*, 2003). 1995 wurde gezeigt, dass 15d-PGJ₂ ein natürlicher Ligand mit hoher Affinität für den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptor ist (PPAR γ) (siehe I.2.2.1) (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). 15d-PGJ₂ aktiviert zudem H-Ras-Proteine durch direkte Reaktion mit einem Cystein-Rest. H-Ras-Proteine sind an der Kontrolle von Zellproliferation und Ausdifferenzierung beteiligt (Oliva *et al.*, 2003).

Für viele der oben genannten biologischen Aktivitäten scheint das Vorhandensein eines α,β -ungesättigten Ketons notwendig zu sein (Straus und Glass, 2001). In tierischen Systemen konnten einige Wirkungen der Cyclopentenon-Prostaglandine durch die Chemikalie 2-Cyclopenten-1-on imitiert werden, wenn auch in 30- bis 100-fach höherer Konzentration (Rossi *et al.*, 1996; Straus und Glass, 2001).

I.2.2.1 Cyclopentenon-Prostaglandine als natürliche Liganden für PPAR γ

Die γ -Isoform des Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors γ (PPAR γ), die vor allem im Fettgewebe lokalisiert ist, ist ein spezifischer Kernrezeptor für 15d-PGJ₂ (Negishi und Katoh, 2002). Δ^{12} -PGJ₂ bindet ebenfalls an diesen Kernrezeptor, jedoch mit geringerer Affinität (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). PPAR γ ist unter anderem entscheidend an der Ausdifferenzierung von Präadipozyten in Adipozyten beteiligt (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995).

Bindet ein Ligand wie 15d-PGJ₂ an PPAR γ , kann es zur verstärkten Transkription von Genen, zum Beispiel für die Bildung von Hitzeschockproteinen (HSP) und dem Hitzeschockfaktor (HSF), kommen. Andererseits kann dies auch zu einer negativen Regulation von Genen und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B führen (siehe Abbildung I.8) (Straus und Glass, 2001).

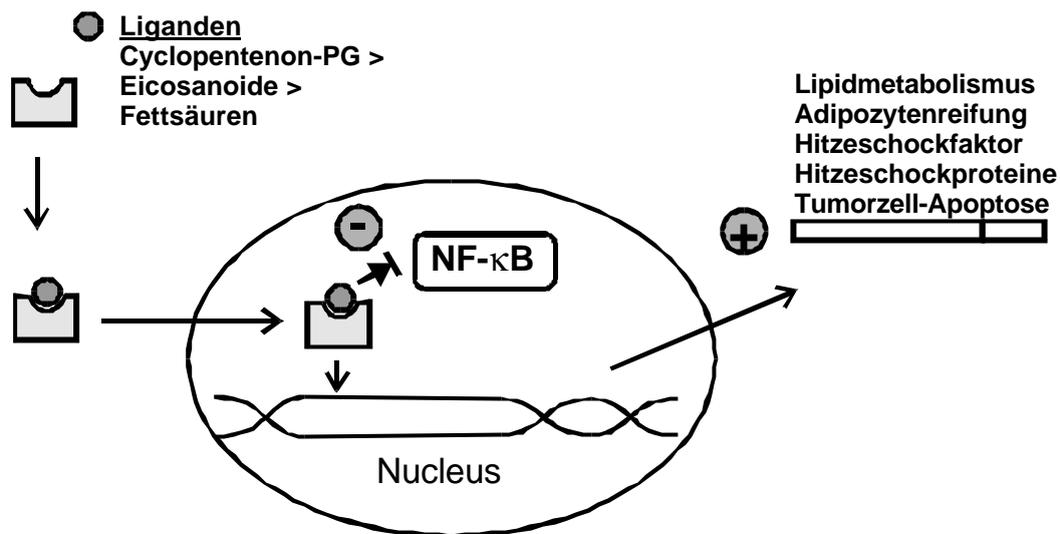


Abbildung I.8: Eine Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors g durch natürliche Liganden wie 15d-PG₂ führt u.a. zu einer verstärkten Genexpression.

I.2.2.2 Cyclopentenon-Prostaglandine als NF-κB-Inhibitoren

NF-κB spielt eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen, zellulären Stressantworten und bei der Regulation des Immunsystems (Cernuda-Morollon *et al.*, 2001). NF-κB liegt in der Zelle assoziiert mit I-κB vor (Straus *et al.*, 2000). Die I-κB-Kinase (IKK) phosphoryliert I-κB, was zur Dimerisierung und damit zur Aktivierung von NF-κB führt, während das phosphorylierte I-κB in Proteasomen abgebaut wird (Negishi und Katoh, 2002; Straus und Glass, 2001). Die NF-κB-Dimere können in den Zellkern einwandern und Zielgene aktivieren, z.B. die COX-2 (Rossi *et al.*, 2000).

15d-PG₂ inhibiert direkt die NF-κB-abhängige Genexpression. Dabei werden sowohl in der DNA-Bindedomäne von NF-κB-Untereinheiten als auch in der β-Untereinheit der I-κB-Kinase Cystein-Reste kovalent modifiziert und so der Transkriptionsfaktor inaktiviert (siehe Abbildung I.9) (Negishi und Katoh, 2002).

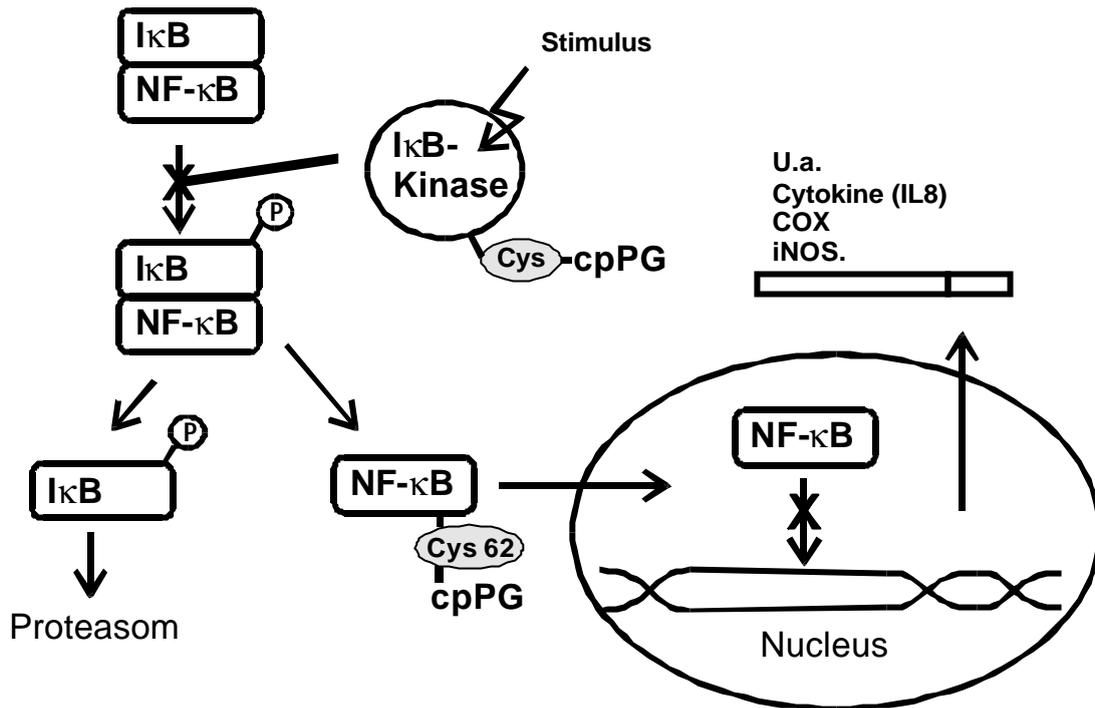


Abbildung I.9: Inhibition der NF- κ B-abhängigen Genexpression durch eine kovalente Reaktion von 15d-PGJ₂ sowohl mit NF- κ B als auch mit IKK, einer NF- κ B-aktivierenden Kinase. NF- κ B besteht aus einem Dimer zweier NF- κ B-Untereinheiten, p50 und p65.

Die Cyclooxygenase 1 (COX-1) ist konstitutiv in vielen Geweben vorhanden und bildet Prostaglandine für die Aufrechterhaltung von verschiedenen physiologischen Prozessen. COX-2, eine Isoform der COX-1, wird verstärkt bei Entzündungsreaktionen gebildet (Colville-Nash und Gilroy, 2000). In einer frühen Phase der Entzündung wird über eine COX-2-Aktivierung vermehrt PGE₂ synthetisiert, das an der Ausbildung von Entzündungssymptomen beteiligt ist. Zu einem späteren Zeitpunkt der Entzündung konnte parallel zu einer weiteren COX-2-Aktivierung eine verstärkte Bildung von PGD₂ und dessen Abbauprodukt 15d-PGJ₂ nachgewiesen werden, die möglicherweise an der Terminierung der Entzündungsreaktion beteiligt sind (Gilroy *et al.*, 1999).

I.3 Oxylipine in Pflanzen

Eicosanoide werden in höheren Pflanzen nicht gebildet, da diese im Gegensatz zu Tieren keine Arachidonsäure synthetisieren können. Die in Pflanzen gebildeten Oxylipine leiten sich vorwiegend von α -Linolensäure (18:3) bzw. Linolsäure (18:2) ab, deren Anteile ca. 40% bzw. 20% der gesamten mehrfach ungesättigten Fettsäuren ausmachen (Conconi *et al.*, 1996), und werden deshalb als Octadecanoide bezeichnet.

I.3.1 Enzymatisch gebildete Oxylipine - Jasmonate

Pflanzen können enzymatisch aus Linolensäure Prostaglandin-ähnliche Verbindungen synthetisieren, die Jasmonate. Zu dieser Gruppe zählen neben der Jasmonsäure selbst das biologisch aktive Intermediat der JA-Biosynthese, 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) (siehe Abbildung I.10) und Derivate der Jasmonsäure, wie deren flüchtiger Methylester (Turner *et al.*, 2002). Jasmonate besitzen eine hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den in Tieren gebildeten Prostaglandinen (Liechti und Farmer, 2002) und sind im Pflanzenreich weit verbreitet (Creelman und Mullet, 1997).



Abbildung I.10: Strukturen von 9(S),13(S)-12-Oxo-Phytodiensäure und 3(R)-7(S)-Jasmonsäure.

Jasmonsäure wurde als erstes cyclisches Fettsäurederivat mit regulatorischen Eigenschaften in der Pflanze identifiziert (Vick und Zimmerman, 1983). Später konnte gezeigt werden, dass nicht nur Jasmonsäure, sondern auch 12-Oxo-Phytodiensäure, eine Cyclopentenon-Zwischenstufe in der Jasmonat-Synthese, biologisch aktiv ist (Weiler *et al.*, 1993). Jasmonate sind sowohl für das Wachstum und die Entwicklung einer Pflanze als auch für die Verteidigungsantwort auf biotische und abiotische Stressoren wichtige Signalmoleküle (Creelman und Mullet, 1997).

Die Biosynthese von Jasmonsäure beginnt mit der stereo- und positionsspezifischen Einführung eines Sauerstoffmoleküls in freie α -Linolensäure durch eine Lipxygenase (siehe Abbildung I.11). Das dabei entstandene 13(S)-Hydroperoxid wird durch die Allenoxid-Synthase (AOS) in ein Allenoxid überführt, das ein Substrat für die Allenoxid-Cyclase (AOC) ist. Auf diesem Weg wird die erste cyclische Verbindung, 12-Oxo-Phytodiensäure, in der Jasmonat-Kaskade gebildet. 12-Oxo-Phytodiensäure wird anschließend enzymatisch zu 10,11-Dihydro-12-oxo-Phytodiensäure reduziert, das durch dreimalige β -Oxidation in (+)-7-iso-Jasmonsäure überführt wird (Creelman und Mullet, 1997). (+)-iso-Jasmonsäure, bei der die Seitenketten in *cis*-Stellung zum Ring stehen, epimerisiert leicht in die thermodynamisch stabilere, *trans*-orientierte (-)-7-Jasmonsäure. Das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Jasmonsäure beträgt etwa 1:9 (Mueller und Brodschelm, 1994).

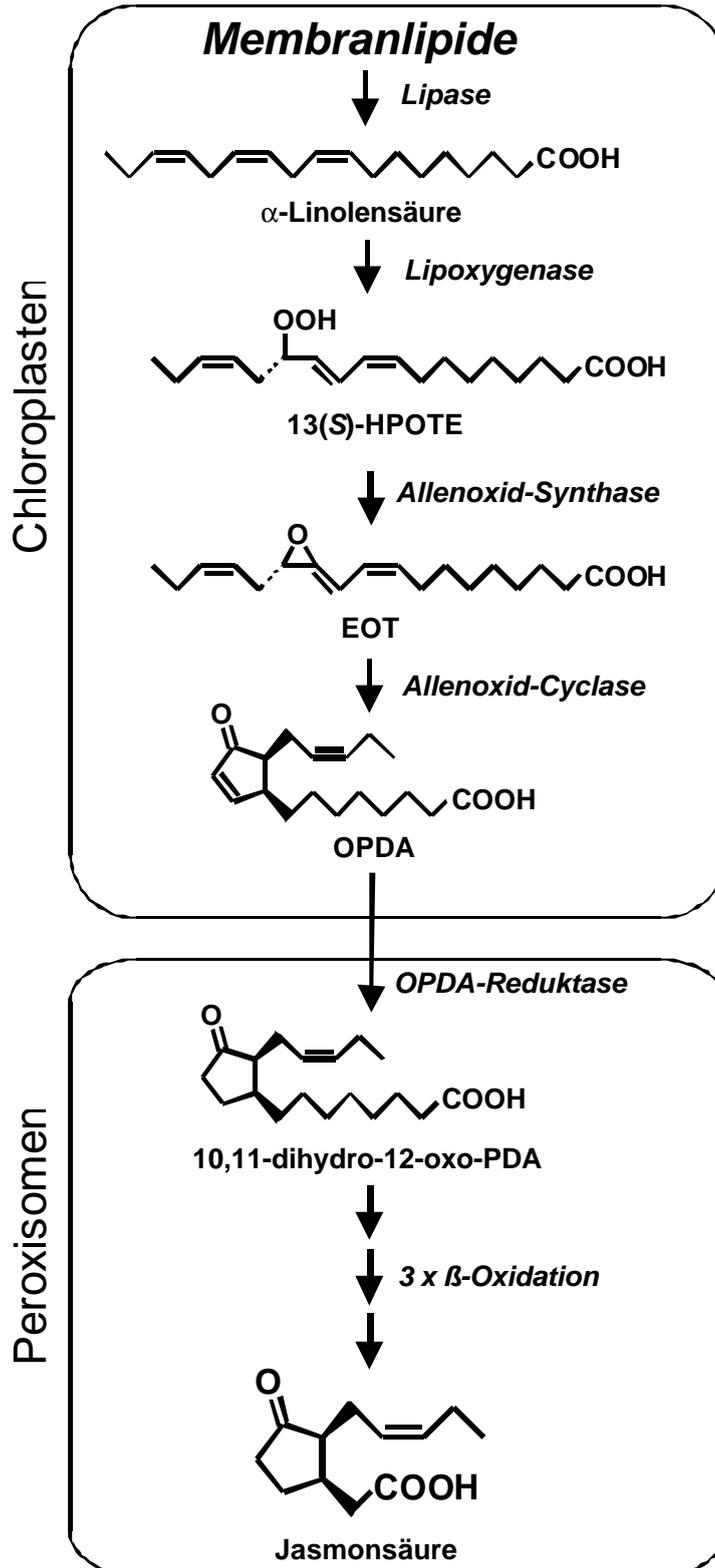


Abbildung I.11: Biosynthese von Jasmonsäure. 13(S)-HPOTE (13(S)-Hydroperoxyoctadecatriensäure), EOT (Epoxyoctadecatriensäure).

Die Jasmonat-Biosynthese bis zur Stufe von 12-Oxo-Phytodiensäure ist in Plastiden, hauptsächlich in Chloroplasten, lokalisiert, während die Reduktion und die β -Oxidation vermutlich in Peroxisomen abläuft (Stintzi und Browse, 2000; Weber, 2002).

Veresterte α -Linolensäure ist in Pflanzenmembranen, insbesondere in Chloroplasten, in großen Mengen vorhanden (Turner *et al.*, 2002). Die Verfügbarkeit bzw. die Verteilung von freier α -Linolensäure in Chloroplasten scheint der limitierende Faktor in der Jasmonat-Bildung zu sein (Creelman und Mullet, 1997; Schaller, 2001). Obwohl die Beteiligung einer spezifischen Phospholipase in Analogie zum Tier noch nicht nachgewiesen werden konnte (Creelman und Mullet, 1997), gibt es Hinweise, dass α -Linolensäure durch regulatorische Lipasen für die Jasmonat-Biosynthese bereitgestellt wird (Conconi *et al.*, 1996; Ishiguro *et al.*, 2001; Narvaéz-Vásquez *et al.*, 1999).

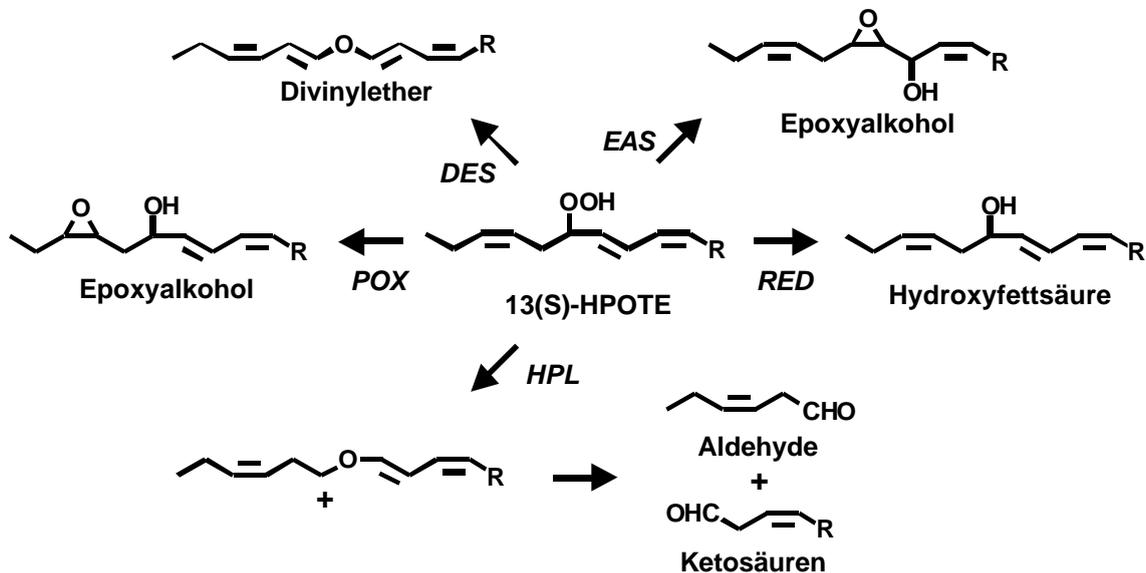


Abbildung I.12: Auswahl weiterer Oxylipin-Biosynthesewege in Pflanzen, ausgehend von 13(S)-HPOTE ($R = C_6H_{15}O_2$) nach (Blée, 2002; Feussner und Wasternack, 2002). *POX* (Peroxygenase), *DES* (Divinylether-Synthase), *EAS* (Epoxyalkohol-Synthase), *RED* (Reduktase), *HPL* (Hydroperoxid-Lyase).

Der erste Schritt der Jasmonat-Kaskade ist nicht spezifisch für die Bildung von Jasmonsäure, 13(S)-Hydroperoxyoctadecatriensäure ist zugleich Substrat für mindestens fünf weitere enzymatische Reaktionswege, wodurch ein Vielzahl unterschiedlicher Oxylipine gebildet werden können (siehe Abbildung I.12) (Blée, 2002; Feussner und Wasternack, 2002). Das durch die AOS gebildete Intermediat cyclisiert anschließend unter dem Einfluss der AOC zu 9(S),13(S)-12-Oxo-Phytodiensäure (Schaller, 2001). Aufgrund der Instabilität dieses Allenoxids sind beide Enzyme möglicherweise funktional und räumlich miteinander verknüpft (Turner *et al.*, 2002). Für die anschließende Reduktion muss 12-Oxo-Phytodiensäure von den Chloroplasten in

Peroxisomen transportiert werden (Turner *et al.*, 2002). Bislang konnten drei Isoformen der OPDA-Reduktase (OPR) in *Lycopersicon esculentum* und *Arabidopsis thaliana* charakterisiert werden, wobei nur OPR3 das natürlich vorkommende 9(S),13(S)-Isomer in der JA-Biosynthese als Substrat akzeptiert (Schaller, 2001). OPR1 reduziert unspezifisch eine Vielzahl α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen, während für OPR2 noch keine Substrate gefunden wurden (Strassner *et al.*, 2002).

Interessanterweise wurde in *Arabidopsis* nachgewiesen, dass ein Großteil der 12-Oxo-Phytodiensäure verestert in der *sn1*-Position von Monogalactosyl-Diacylglycerol-Lipiden (MGDG) vorliegt (siehe Abbildung I.13) (Stelmach *et al.*, 2001). Das Vorhandensein einer Hexadecatriensäure (16:3) in der *sn2*-Position dieser Lipide ist charakteristisch für Plastidmembranen, ein weiterer Hinweis dafür, dass die OPDA-Biosynthese in Plastiden abläuft (Stelmach *et al.*, 2001). Noch unklar ist, ob die Synthese von 12-Oxo-Phytodiensäure direkt in Monogalactosyl-Diacylglycerolen abläuft oder freie OPDA in Lipide rückverestert wird (Creelman und Rao, 2002) bzw. inwieweit veresterte OPDA bei Bedarf über eine Lipase freigesetzt werden kann (Stelmach *et al.*, 2001; Weber, 2002).

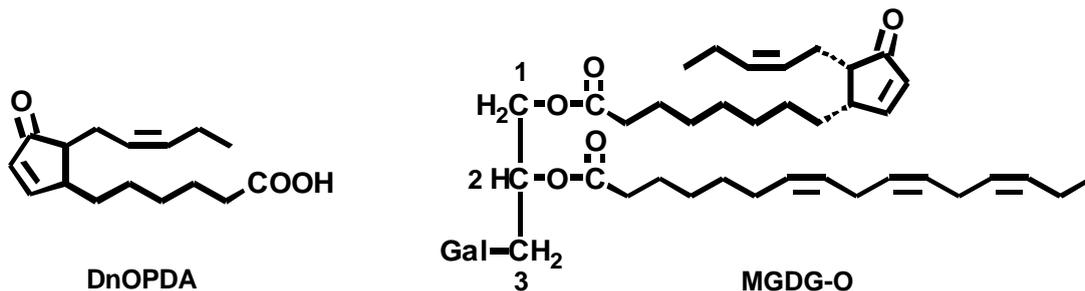


Abbildung I.13: Strukturformeln von Dinor-Oxo-Phytodiensäure und *sn1*-O-(9S,13S-12-Oxo-Phytodienoyl)-*sn2*-O-(7Z,10Z,13Z-Hexadecatrienoyl)-*sn3*-O-(β -D-Galactopyranosyl)-glycerol (MGDG-O) (Stelmach *et al.*, 2001).

Neben 12-Oxo-Phytodiensäure konnte u.a. in *Arabidopsis* eine weitere Cyclopentenon-Verbindung charakterisiert werden, die aufgrund ihrer um zwei Kohlenstoffatome kürzeren Seitenkette als Dinor-10-Oxo-Phytodiensäure (dnOPDA) bezeichnet wird (siehe Abbildung I.13) (Weber *et al.*, 1997). dnOPDA kann *in vivo* und *in vitro* aus Hexadecatriensäure gebildet werden, wobei gezeigt werden konnte, dass dnOPDA direkt aus Hexadecadiensäure und nicht über β -Oxidation aus 12-Oxo-Phytodiensäure gebildet wird (Weber *et al.*, 1997). Die Bildung dieses Oxylipins legt nahe, dass die Substratspezifität der an der OPDA-Biosynthese beteiligten Lipoxygenase und Allenoxid-Synthase nicht auf C18-Fettsäuren beschränkt ist (Weber *et al.*, 1997). Enzymatisch gebildete Allenoxide können *in vitro* neben dem enzymatischen Weg über

die AOC auch spontan zu racemischen Cyclopentenonen umgelagert werden (Grechkin und Hamberg, 2000; Hamberg, 2000).

I.3.2 Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine - Phytoprostane

Für eine Radikal-katalysierte Bildung cyclischer Verbindungen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind nur eine 1,3,7-Octatrieneinheit und molekularer Sauerstoff notwendig. Aus α -Linolensäure, der mengenmäßig häufigsten ungesättigten Fettsäure in Pflanzen, können neben der enzymatischen Bildung der Jasmonate auch nichtenzymatisch Prostaglandin-ähnliche Verbindungen entstehen. Da diese Verbindungen im Vergleich zu den Isoprostanen um zwei Kohlenstoffatome verkürzt sind, wurden sie ursprünglich als Dinor-Isoprostane bezeichnet (Mueller, 1998). Um Verwechslungen mit Dinor-Isoprostanen zu vermeiden, die durch β -Oxidation aus Isoprostanen in Tieren entstehen können, wurde die Bezeichnung Phytoprostane (PP) vorgeschlagen (Imbusch und Mueller, 2000a). In Analogie zu der Prostaglandin-Nomenklatur bezeichnet der nachgestellte Buchstabe die Substitution des Cyclopentan-Rings und der numerische Index die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten.

I.3.2.1 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentan(on)-Phytoprostanen

Die Phytoprostan-Biosynthese verläuft wie die Bildung von Isoprostanen über radikalische Zwischenstufen, wobei auch hier zwei Reaktionsmechanismen formuliert werden können, ein Endoperoxid- und ein Dioxetanweg (vgl. I.1.2.1.).

α -Linolensäure besitzt im Gegensatz zu Arachidonsäure nur eine 1,4,7-Octatrieneinheit. Entsprechend werden bei der Biosynthese lediglich zwei Regioisomere gebildet (siehe Abbildung I.14). Bei Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der bis-allylischen Methylengruppe in Position 14 und anschließender zweifacher Sauerstoffaddition entstehen beim Endoperoxidweg PPG₁-Regioisomere vom Typ I, bei Beteiligung der C11-Methylengruppe Regioisomere vom Typ II. Jedes Regioisomer besteht aus maximal acht racemischen Diastereomeren (Parchmann und Mueller, 1998).

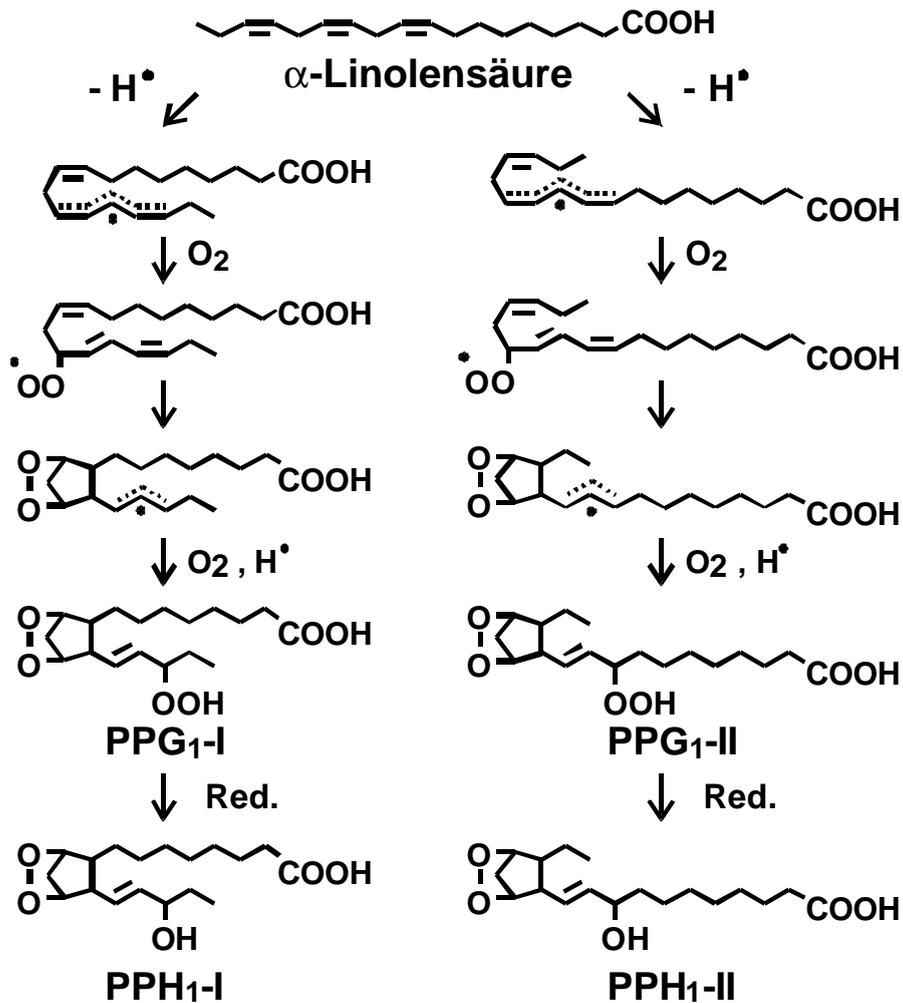


Abbildung I.14: Postulierter Syntheseweg für die Entstehung von G₁- bzw. H₁-Phytylprostanen nach dem Endoperoxid-Mechanismus.

Beim Dioxetanweg (Corey und Wang, 1994), der über ein 9- bzw. 16-Peroxyradikal verläuft, entstehen nur zwei racemische Diastereomere je Regioisomer, wobei die Seitenketten entweder *cis* oder *trans* am Cyclopentanring angeordnet sind. Ähnlich wie bei den Isoprostanen können aus G-Phytylprostanen theoretisch durch Umlagerung und/oder Reduktion die entsprechenden D-, E- und F-Ring-Verbindungen gebildet werden, wobei jede Familie aus maximal 32 Stereoisomeren besteht (siehe Abbildung I.15).

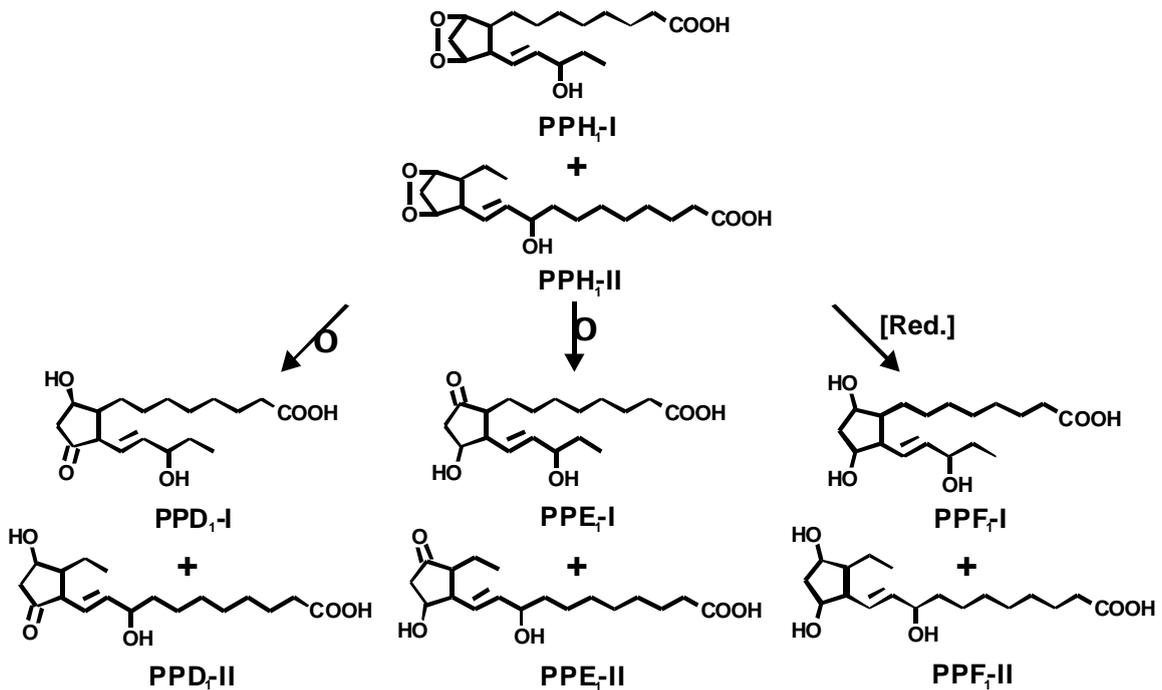


Abbildung I.15: Umlagerung bzw. Reduktion von PPH₁ in andere Phytoprostan-Klassen.

Die E₁-Phytoprostane wurden erstmals 1998 in Pflanzen identifiziert, wobei beide theoretisch möglichen Regioisomere nachgewiesen werden konnten (Parchmann und Mueller, 1998). Aufgrund der großen Anzahl an Isomeren sind diese Verbindungen einer analytischen Untersuchung nur schwer zugänglich. Durch alkalische Dehydratisierung der E₁-Phytoprostane zu B-Ring-Verbindungen (siehe Abbildung I.16), einer bekannten Reaktion aus der Prostaglandin-Chemie, ist es möglich, die Anzahl der Stereozentren von ursprünglich vier auf eines zu reduzieren.

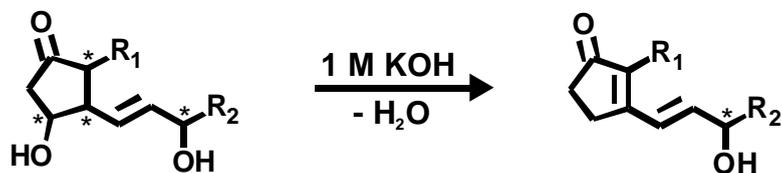


Abbildung I.16: Umsetzung von PPE₁ zu PPB₁ durch alkalische Dehydratisierung. Dadurch reduziert sich die Anzahl möglicher Isomere von 32 auf 4. (* = Chiralitätszentrum; Typ I: R₁ = C₈H₁₅O₂, R₂ = C₂H₅; Typ II: R₁ = C₂H₅, R₂ = C₈H₁₅O₂).

Die beiden verbliebenen racemischen Regioisomere vereinfachten eine analytische Charakterisierung (Parchmann und Mueller, 1998). Die E₁-Phytoprostane konnten somit erstmals eindeutig in pflanzlichen Zellkulturen und in getrocknetem

Pflanzenmaterial nachgewiesen und quantifiziert werden (Parchmann, 1999). Die erhaltenen chromatographischen Daten ermöglichten die Gewinnung einzelner PPE₁-Regioisomere aus autoxidierter α -Linolensäure. Durch Partialsynthese, ausgehend von PPE₁, konnte eine weitere Phytoprostan-Familie, die F₁-Phytoprostane, dargestellt werden (Imbusch und Mueller, 2000a). Auch diese Verbindungen wurden sowohl in frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial als auch in pflanzlichen Zellkulturen gefunden (Imbusch und Mueller, 2000a). Phytoprostane können in Pflanzen entweder durch Radikal-katalysierte Oxidation von freier oder in Membranen veresterter α -Linolensäure gebildet werden. Nur ca. 0,25% der gesamten Fettsäuren liegen frei in Pflanzen vor, während der Großteil in Form von Glyco-, Phospho- und neutralen Lipiden in pflanzlichen Zellmembranen verestert ist (Conconi *et al.*, 1996). Da die F₁-Phytoprostane im Gegensatz zu PPE₁ stabile Verbindungen sind, war es möglich, pflanzliche Zellmembranen auf das Vorkommen von Phytoprostanen hin zu untersuchen. Abhängig vom untersuchten Pflanzenmaterial wurde eine um ein bis zwei Zehnerpotenzen höhere Konzentration veresterter F₁-Phytoprostane im Vergleich zu freien PPE₁ bestimmt (Imbusch und Mueller, 2000b). Phytoprostane konnten bisher in verschiedenen, systematisch weit voneinander entfernten Pflanzenfamilien nachgewiesen werden. Sie werden durch oxidativen Stress, ausgelöst z.B. durch Peroxide und Schwermetalle, dramatisch induziert. Darüber hinaus kann auch eine Akkumulation von Phytoprostanen nach mechanischer Verwundung, bei Frostverletzung sowie nach Pathogenbefall beobachtet werden (Imbusch und Mueller, 2000b; Parchmann, 1999; Thoma *et al.*, 2003).

I.3.2.2 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Phytoprostanen

Zur vereinfachten Bestimmung der E₁-Phytoprostane in Pflanzen wurden diese durch Alkali-Behandlung in PPB₁ überführt. Eine weitere bekannte Reaktion aus der Prostaglandin-Chemie ist die Säure-katalysierte Dehydratisierung der instabilen E₁-Phytoprostane zu den A₁-Phytoprostanen *in vitro* (siehe Abbildung I.17), einer weiteren Verbindung mit einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe.

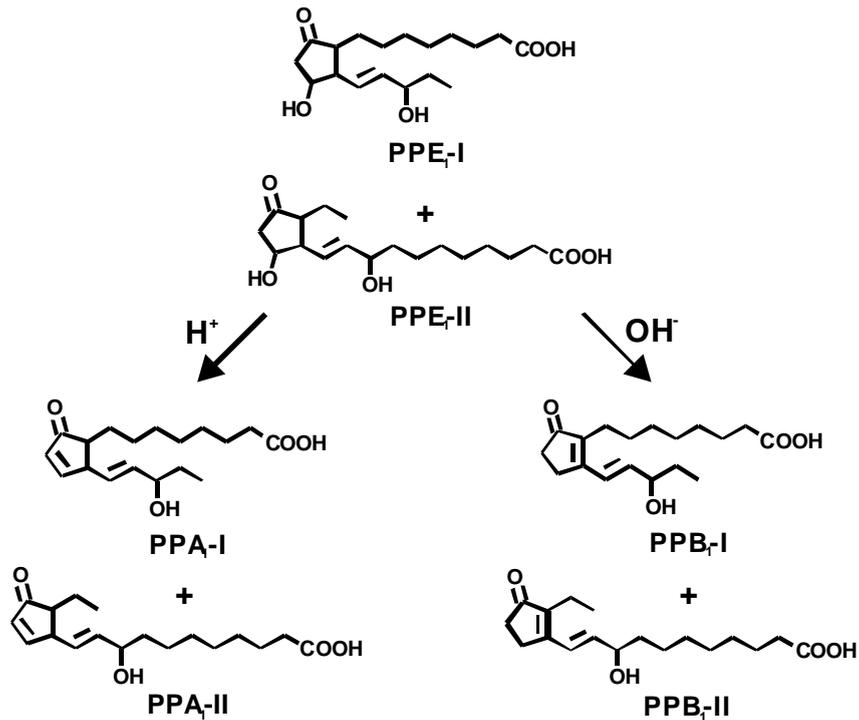


Abbildung I.17: Umwandlung von PPE₁ in die Cyclopentenone PPA₁ und PPB₁.

Thoma *et al.* (2003) konnten zeigen, dass durch Lipidperoxidation gebildete E₁-Phytprostane auch *in vivo* spontan unter Wasserabspaltung in A₁- und B₁-Phytprostane umgewandelt werden können. Die dabei entstehenden Cyclopentenone kommen in Pflanzen in vergleichbaren Basalkonzentrationen wie die enzymatisch gebildeten Jasmonate vor. Dies deutet darauf hin, dass selbst in gesunden, unbehandelten Pflanzen laufend Lipidperoxidation stattfindet (Thoma *et al.*, 2003).

Die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist eine Reaktion von Pflanzen auf eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren (Vranová *et al.*, 2002), wobei ROS eine direkte antimikrobielle Wirkung besitzen könnten (Lamb und Dixon, 1997). Zudem werden ROS, insbesondere H₂O₂, als Signalstoffe allein oder im Zusammenwirken mit anderen Signalmolekülen wie NO und Salicylaten bei der Pathogenabwehr diskutiert (Neill *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002). ROS können jedoch auch eine radikalische Lipidperoxidation initiieren, die unter anderem bei Pathogenbefall zu beobachten ist (Muckenschnabel *et al.*, 2002). Die Bildung der Cyclopentenon-Phytprostane A₁ und B₁ wird z.B. in pflanzlichen Zellkulturen durch Peroxidgabe oder nach Infektion von Pflanzen mit *Botrytis cinerea*, einem nekrotrophen Pilz, induziert (Thoma *et al.*, 2003). Inwieweit Cyclopentenon-Phytprostane Mediatoren von oxidativem Stress *in vivo* darstellen oder nur Abbauprodukte der Lipidperoxidation sind, ist noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Verbindungen biologisch aktiv sind (siehe V.2) (Thoma *et al.*, 2003).

I.3.3 Vorkommen und Biosynthese von Cyclopentenon-Oxylipinen in *Chromolaena*-Spezies

Bereits 1981 wurde eine weitere Cyclopentenon-Familie in zwei verschiedenen *Chromolaena*-Spezies charakterisiert (*C. morii*, *C. chasleae*; Asteraceae) (Bohlmann *et al.*, 1982a; Bohlmann *et al.*, 1981; Bohlmann *et al.*, 1982b), die strukturelle Ähnlichkeit zu den bereits unter I.1.1.3. beschriebenen Clavulonen aus Korallen und zu 12-Oxo-Phytodiensäure in Pflanzen besitzt. Die charakteristischen Merkmale dieser Verbindungen sind ein tertiärer Alkohol und/oder eine *exo*-Doppelbindung am Cyclopentenon-Ring. Das Grundgerüst entspricht dem von 12-Oxo-Phytodiensäure (siehe Abbildung I.18, Verbindungen 1, 2 und 3) (Grechkin, 1995).

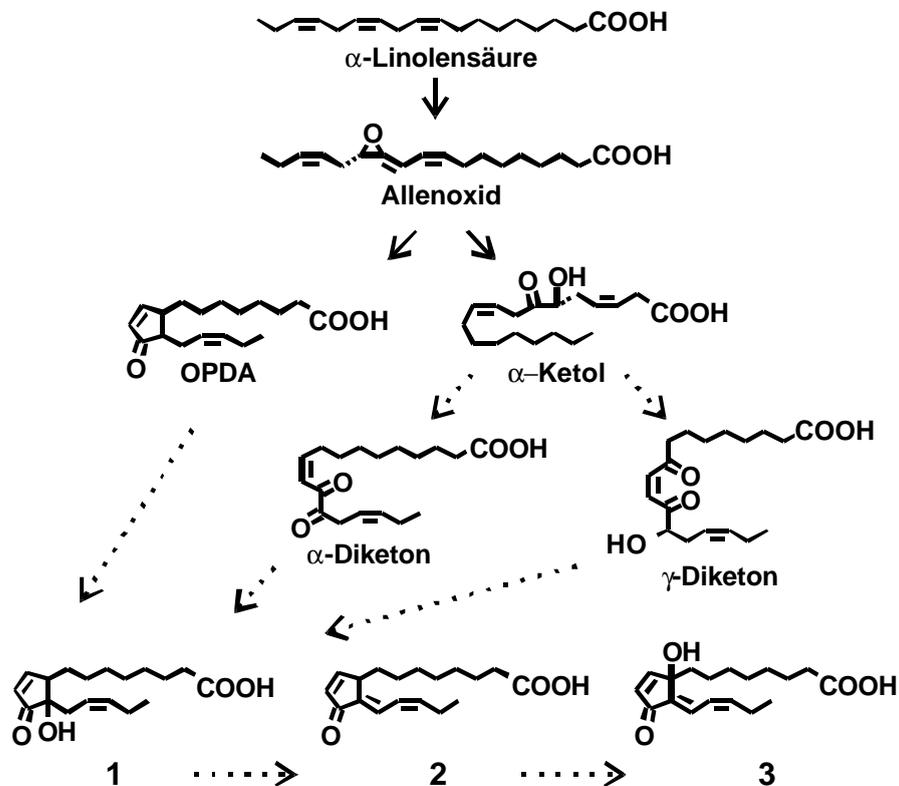


Abbildung I.18: Hypothetische Biosynthesewege für die Bildung von Cyclopentenonen in *Chromolaena*-Spezies.

Die Biosynthese dieser Strukturen ist bisher noch nicht geklärt. Ursprünglich wurde angenommen, dass sie über einen zur Prostaglandin-Biosynthese analogen Weg aus α -Linolensäure gebildet werden (Bohlmann *et al.*, 1981). Bisher konnte jedoch in Pflanzen noch keine Cyclooxygenase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Verbindung 1 unterscheidet sich lediglich durch eine Hydroxylierung an Position C-13 von 12-Oxo-Phytodiensäure, weshalb später vorgeschlagen wurde, dass sich diese Oxylipine direkt

von der enzymatisch gebildeten OPDA ableiten (siehe Abbildung 1.18). Es gelang aber nicht, OPDA in eine der oben genannten *tert*-Hydroxy-Cyclopentenone zu überführen (Grechkin, 1995). Eine weitere Hypothese geht von einem α -Ketol aus, einem weiteren Produkt des Allenoxid-Synthase-Wegs, das über α - und γ -Diketon-Zwischenstufen in die Cyclopentenone umgewandelt werden kann (siehe Abbildung 1.18) (Grechkin, 1998; Grechkin, 1995). Bis jetzt konnten allerdings weder die Diketon-Intermediate noch an der Cyclisierung beteiligte Enzyme in Pflanzen identifiziert werden.

I.4 Biologische Aktivität von Oxylipinen in Pflanzen

Jasmonate sind wichtige Signalmoleküle, die an einer Vielzahl regulatorischer Vorgänge in Pflanzen beteiligt sind. Dazu gehören sowohl physiologische Prozesse, wie Reproduktion und Stoffwechselregulation, als auch pathophysiologische Reaktionen, z.B. nach mechanischer Verwundung und bei Pathogenbefall (Liechti und Farmer, 2002).

I.4.1 Biologische Aktivität von Cyclopentanon-Oxylipinen

Jasmonsäure ist u.a. an der Kontrolle von Fruchtreifung, Knollenbildung, Samenkeimung und -entwicklung sowie an Proteinspeicherung, Wachstums- bzw. Alterungsprozessen der Pflanze und an der Photosynthese beteiligt (Creelman und Mullet, 1997; Creelman und Rao, 2002).

Die Bedeutung von Jasmonsäure für die pflanzliche Abwehrreaktion wurde erstmals 1990 von Farmer und Ryan erkannt. Sie konnten zeigen, dass flüchtiges Methyljasmonat in Tomaten eine vergleichbare Reaktion auslösen kann wie Verwundung oder Befall durch Herbivore (Farmer und Ryan, 1990). Tomaten reagieren auf Fraßfeinde mit der Akkumulation von Proteinase-Inhibitoren, die im Schädling die Protein-Verdauung unterbinden und so zur Unterernährung und dessen Tod führen können (Farmer und Ryan, 1990; Farmer und Ryan, 1992).

Inzwischen gibt es zahlreiche Beweise für eine essentielle Rolle der Jasmonate bei der pflanzlichen Defensivantwort: Die Behandlung von Pflanzen mit Jasmonsäure bzw. Methyljasmonat führt zu einer verstärkten Expression von Genen, die an der pflanzlichen Verteidigung beteiligt sind (Reymond *et al.*, 2000). Die Bildung von endogener Jasmonsäure ist durch Verwundung oder Pathogenbefall induzierbar (Schaller, 2001). Zudem zeigen Pflanzenmutanten mit Defekten in der JA-Biosynthese und JA-Reizaufnahme eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Schädlingen (Howe *et al.*, 1996; McConn *et al.*, 1997; Royo *et al.*, 1999). Noch unklar ist, durch welche Mechanismen Jasmonsäure zu einer Genaktivierung führen kann, da bisher

noch kein JA-Rezeptor identifiziert werden konnte. Es ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, inwieweit Jasmonsäure mit weiteren pflanzlichen Signalstoffen wie Ethylen und Salicylsäure interagiert (Turner *et al.*, 2002).

I.4.2 Biologische Aktivität von Cyclopentenon-Oxylipinen

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass nicht nur Jasmonsäure, sondern auch ihre biosynthetische Vorstufe, 12-Oxo-Phytodiensäure, biologische Aktivität in Pflanzen aufweist. Mehrere Jasmonsäure-vermittelte Effekte in Pflanzen werden durch OPDA ausgelöst, wobei nachgewiesen werden konnte, dass für die Rankenspiralisierung von *Bryonia dioica* 12-Oxo-Phytodiensäure und nicht Jasmonsäure das endogene Signalmolekül ist (Blechert *et al.*, 1995; Weiler *et al.*, 1993; Weiler *et al.*, 1994). Diese Versuche wurden mit Strukturanaloga von OPDA durchgeführt, die nicht mehr zu Jasmonsäure metabolisiert werden können (Blechert *et al.*, 1995). Dieser Befund legte nahe, dass 12-Oxo-Phytodiensäure und nicht Jasmonsäure den eigentlichen Signalstoff aus dem Octadecanoidweg darstellt. In anderen pflanzlichen Testsystemen war eine Differenzierung der Jasmonat-Signale jedoch nicht ohne weiteres durchführbar.

Erst die Herstellung einer *Arabidopsis thaliana*-Mutante, der die 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase 3 (OPR3) fehlt, ermöglichte weitere Untersuchungen. Männliche Pflanzen dieser Mutante, die nicht in der Lage sind, aus OPDA Jasmonsäure zu synthetisieren, sind steril (Stintzi und Browse, 2000). Die Fertilität dieser Pflanzen konnte durch die Gabe exogener Jasmonsäure, nicht aber durch OPDA, wieder hergestellt werden. Dies zeigt, dass für die Pollenreifung Jasmonsäure benötigt wird (Stintzi und Browse, 2000).

Durch Zufall wurde entdeckt, dass *opr3*-Mutanten wie der *A.thaliana*-Wildtyp resistent gegen Larven der Mücke *Bradysia impatiens* sind, im Gegensatz zu der Jasmonat-insensitiven *coi1*-Mutante und der *fad3fad7fad8*-Tripelmutante, die keine α -Linolensäure bzw. Hexadecatriensäure und damit keine Jasmonsäure mehr bilden kann (Stintzi *et al.*, 2001). Die Infektion aller vier *A.thaliana*-Linien mit *Alternaria brassicicola*, einem nekrotrophen Pilz, ergab das gleiche Ergebnis, nur die *opr3*-Mutante und der Wildtyp blieben lebensfähig (Stintzi *et al.*, 2001).

Untersuchungen von *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen und der *coi1*-Mutante (Feys *et al.*, 1994) nach mechanischer Verwundung bzw. nach Befall mit Larven des Kohlweißlings (*Pieris rapae*) zeigten eine differenzierte Genexpression (Reymond *et al.*, 2000). Das *COI1*-Gen kodiert für ein F-Box-Protein, das regulatorische Proteine ihrem Ubiquitin-vermittelten Abbau in Proteasomen zuführt (vgl. I.2.2.2.) (Turner *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 1998). Die durch Verwundung induzierbaren Gene lassen sich in zwei Gruppen

einteilen, COI1-abhängige und durch Jasmonsäure regulierbare Gene sowie COI1-unabhängige Gene, die andere Signale als Jasmonsäure benötigen (Reymond *et al.*, 2000). Interessanterweise sind viele COI1-abhängigen Gene durch Verwundung auch in der *opr3*-Mutante aktivierbar (Stintzi *et al.*, 2001). Durch die exogene Gabe von OPDA zu *opr3*-Mutante lassen sich sowohl COI1-abhängige als auch COI1-unabhängige Gene induzieren (Stintzi *et al.*, 2001). 12-Oxo-Phytodiensäure als Cyclopentenon ist anscheinend über zwei unterschiedliche Mechanismen aktiv, wobei der COI1-unabhängige Weg noch unklar ist (Weber, 2002).

Unter Umständen wird ein Teil der biologischen Aktivität in Analogie zum Tier über die elektrophilen Eigenschaften des α,β -ungesättigten Ketons vermittelt (Rossi *et al.*, 2000; Weber, 2002). Möglicherweise besitzen Cyclopentanon-Verbindungen wie Jasmonsäure und Cyclopentenone wie OPDA und dnOPDA unterschiedliche, aber zum Teil überlappende Wirkspektren (siehe Abbildung I.19) (Weber, 2002).

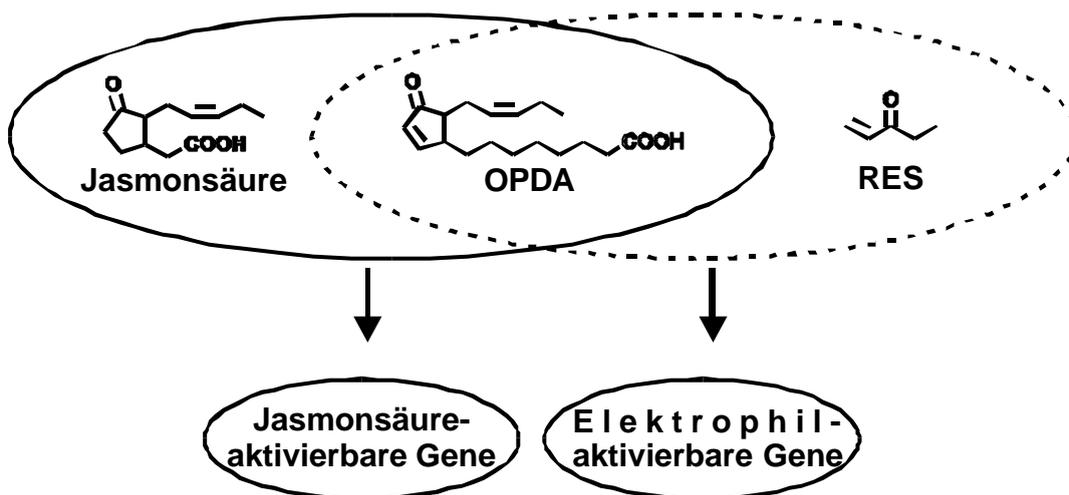


Abbildung I.19: Zwei unterschiedliche Signalfunktionen für Jasmonate. Cyclopentanone (wie Jasmonsäure) und Cyclopentenone (wie OPDA) bzw. reaktive Elektrophile (z.B. Vinylketone) regulieren in Pflanzen unterschiedliche, aber sich zum Teil überschneidende Gruppen von Genen (Farmer *et al.*, 2003). (RES = Reaktive Elektrophile Spezies).

α,β -ungesättigte Ketone sind reaktive elektrophile Spezies, die leicht z. B. mit freien Thiolgruppen von cytosolischen und membrangebundenen Proteinen eine Michael-Addition eingehen können. Zu diesen Verbindungen gehören neben enzymatisch gebildeter 12-Oxo-Phytodiensäure auch Malondialdehyd, Hydroxynonenal, Ketodiene und Cyclopentenon-Phytoprostane, Substanzen, die bei der nichtenzymatischen Lipidperoxidation von Zellmembranen gebildet werden können (Thoma, 2003;

Vollenweider *et al.*, 2000). Da diese Verbindungen eine Gefahr für die Zelle darstellen, können sie durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden. Glutathion-S-Transferasen (GST), die diesen Prozess katalysieren, können durch elektrophile Lipide induziert werden (Vollenweider *et al.*, 2000). Die Cyclopentenon-Phytoprostane A₁ und B₁ führen auch zu einer verstärkten Genexpression von GST1 (Thoma, 2003).

I.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Sowohl in Tieren als auch in Pflanzen konnten cyclische Fettsäurederivate mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Prostaglandinen nachgewiesen werden, die auf enzymatischem Weg oder durch radikal katalysierte Oxidation aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen können.

In Pflanzen gibt es mindestens zwei Wege, über die cyclische Fettsäuren gebildet werden, den bereits relativ gut charakterisierten, enzymatischen Jasmonat-Weg und den Phytoprostan-Weg. Über den zweiten, radikalischen Weg können theoretisch mehr als 156 verschiedene Verbindungen gebildet werden (Mueller, 1998). Die E₁- und F₁-Phytoprostane (Imbusch, 2001; Parchmann und Mueller, 1998) konnten bisher ebenso charakterisiert und in Pflanzen nachgewiesen werden wie die aus PPE₁ entstehenden Cyclopentenon-Phytoprostane A₁ und B₁ (Parchmann und Mueller, 1998; Thoma, 2003). Alle identifizierten Verbindungen kommen ubiquitär in Pflanzen vor und sind durch oxidativen Stress induzierbar. Neben den oben genannten Strukturen kann theoretisch noch eine weitere Phytoprostan-Klasse gebildet werden, die D₁-Phytoprostane.

Aus der Prostaglandin-Chemie ist bekannt, dass D-Ring-Verbindungen im Vergleich zu den deutlich stabileren F-Ringen leicht unter Wasserabspaltung in Cyclopentenon-Prostaglandine umgewandelt werden können. Diese Dehydratisierungsprodukte, insbesondere 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ sind biologisch hochaktive Verbindungen, die z.B. an der Terminierung der Entzündungsreaktion in Säugetieren beteiligt sind.

In Pflanzen konnten bisher zwei biologisch aktive Cyclopentenone, 12-Oxo-Phytodiensäure und Dinor-OPDA, nachgewiesen werden. Eine weitere Gruppe von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen mit auffallender Ähnlichkeit zu OPDA wurde bereits 1981 von Bohlmann *et al.* in verschiedenen *Chromolaena*-Spezies nachgewiesen, deren Biosynthese bis jetzt nicht geklärt werden konnte (siehe I.3.3). Theoretisch könnten diese Cyclopentenon-Verbindungen in Analogie zum Tier Abbauprodukte der durch Lipidperoxidation gebildeten D₁-Phytoprostane sein (siehe Abbildung I.20).

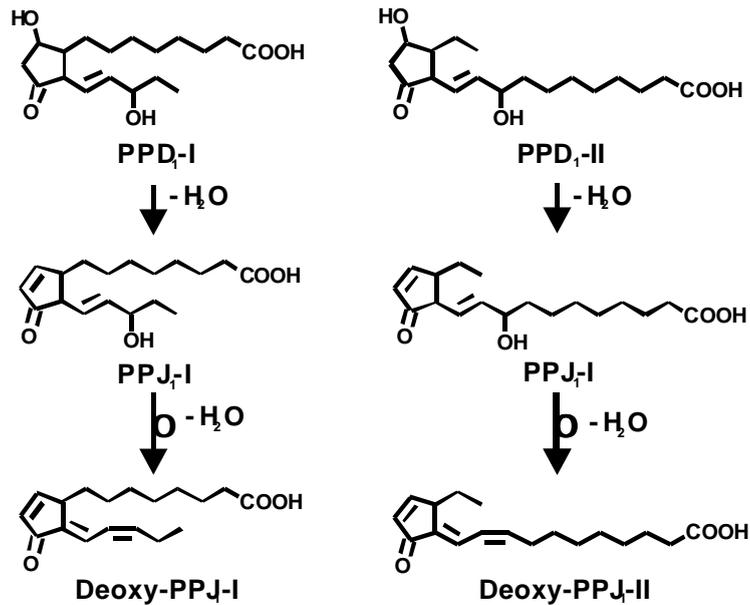


Abbildung I.20: Hypothetischer Biosyntheseweg von Cyclopentenon-Phytoprostanen mit struktureller Ähnlichkeit zu enzymatisch gebildeter OPDA und den aus *Chromolaena*-Spezies isolierten Verbindungen. Die beiden Vorstufen PPD₁ können nichtenzymatisch über den postulierten D₁-Phytoprostan-Weg entstehen.

Das Ziel der Arbeit war es, D₁-Phytoprostane und deren Cyclopentenon-Derivate, im Speziellen Deoxy-J₁-Phytoprostane, als weitere Quelle cyclischer Fettsäuren in Pflanzen zu identifizieren. Um dies zu ermöglichen, war es zunächst notwendig, authentisches Referenzmaterial für eine chromatographische und spektroskopische Charakterisierung zu gewinnen. Dazu sollte eine Partialsynthese dieser Verbindungen, ausgehend von den F₁-Phytoprostanen, durchgeführt werden und eine geeignete Methode zur Bestimmung der Zielverbindungen aus Pflanzenmaterial entwickelt werden. Eine weitere Fragestellung war, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Biosynthese und verschiedenen Stress-Situationen in Pflanzen besteht und ob diese Verbindungen eine mit 12-Oxo-Phytodiensäure vergleichbare biologische Aktivität besitzen.

II. MATERIAL

II.1 Pflanzliches Material

II.1.1 Zellsuspensionskulturen

Die verwendeten pflanzlichen Zellsuspensionskulturen stammten aus den Sammlungen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-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 und Skoog, 1965) überimpft.

Für Untersuchungen in 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 40 - 60 g Zellen in 250 ml Medium.

Eine Ausnahme stellte die Untersuchung von Scopoletin in Zellsuspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* ssp. *xanthii* dar. Hier wurden 25 ml einer 3 Tage alten Zellsuspensionskultur in 75 ml frisches Medium überführt.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. 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. 1g feuchtes Zellmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug ca. 10% des Feuchtgewichtes.

II.1.2 Frische Pflanzenorgane

Die verwendeten frischen Pflanzenorgane stammten aus den Gewächshäusern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg [*Lycopersicon esculentum* var. *MoneyMaker* (Blattgewebe), *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Columbia (Blattgewebe) und *Nicotiana tabacum* ssp. *Samson* (Blattgewebe)]. Die Tomaten- und Tabakpflanzen unterlagen im Gewächshaus einem normalen Tag-Nacht-Zyklus (16 Stunden Tag, 8 Stunden Nacht). *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in

einer Klimakammer mit einer täglichen Beleuchtung von 9 Stunden bei einer Temperatur von 22°C bzw. von 20°C in der Dunkelperiode kultiviert.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde auch hier ca. 1 g frisches Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 10 - 15% des Feuchtgewichtes.

II.2 Chemikalien

α -Linolensäure (natürliche, ca. 70%), 7-Mercapto-4-methylcumarin, N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA), Platin(IV)oxid und Pyridiniumdichromat wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen, 3,4-Dihydro-2H-pyran (97%), Diazald, Triphenylphosphin (TPP) und N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) von Aldrich (Steinheim). n-Butylboronsäure stammte von der Firma Lancaster (Frankfurt/Main), Butylhydroxytoluol (BHT), Methoxyamin (Hydrochlorid) und Trypanblau 0,4% (für die Mikroskopie) von Sigma (Deisenhofen) und Lindlar-Katalysator (5% Palladium/Calciumcarbonat) von Merck (Darmstadt).

Lösungsmittel für die HPLC hatten HPLC-gradient-grade-Qualität und wurden von der Firma Scharlau (Barcelona, ESP) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen. Für die Synthese und die spurenanalytischen Untersuchungen wurden nur Lösungsmittel mit *reinst* bzw. *p.a.*-Qualität verwendet.

Prostaglandine und 12-Oxo-Phytodiensäure wurden bei Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) erworben.

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

II.3 Verbrauchsmaterial

Zur Festphasenextraktion wurden Aminopropyl (NH₂)- und Silica (SiOH)-Phasen von Macherey-Nagel (Düren) in 500 mg-Glassäulen eingesetzt, während für die Säulenchromatographie Silicagel 60 (Partikelgröße 63 - 200 μ m) von Merck (Darmstadt) verwendet wurde. DC-Kieselgelfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄ mit Fluoreszenz-Indikator, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, stammten von Macherey-Nagel (Düren).

II.4 Geräte

Gaschromatographie-	GC-MS (Jeol, Tokyo, Japan)
Massenspektrometrie:	Agilent 6890 Series Gaschromatograph (Agilent, Waldbronn) gekoppelt mit einem JMS-GCMate II Sektorfeld- Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan)
	GC-MS (Finnigan MAT, Bremen) Varian 3400 Gaschromatograph (Varian, Darmstadt) gekoppelt mit einem SSQ 700 Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)
Analytische HPLC:	HPLC-Anlage Waters (Milford, USA) W600 Pump W717 Auto Sampler 996 Diode Array Detector W474 Fluorescence Detector W600 Controller, Millennium32 Software
	HPLC-Anlage Merck-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)
Semipräparative HPLC:	HPLC-Anlage Merck-Hitachi (Darmstadt) L-6250 Intelligent Pump L-4000A UV Detector D-2000 Chromato-Integrator
Präparative HPLC:	HPLC-Anlage Knauer (Berlin) K 1001 Pump Midas Autosampler (Spark) K 2501 UV Detector Foxy Jr. Fraction collector Eurochrom Software

II. MATERIAL

Lobar-Anlagen:	Lobar-Anlage Merck-Hitachi (Darmstadt) L-6200 Intelligent Pump L-655A UV Monitor D-2500 Chromato-Integrator
	Lobar-Anlage Knauer/Merck-Hitachi (Berlin/Darmstadt) 2 x Knauer HPLC Pump 64 HPLC Programmer 50 L-4200 UV Monitor D-2500 Chromato-Integrator
Mikroskopie:	Leitz HM-Lux (Leitz Messtechnik, Wetzlar)
Homogenisieren:	Ultra-Turrax IKA T25 basic mit Dispergierwerkzeug S 25 N-10G (Janke & Kunkel, Staufen)
Rühren/Durchmischen:	Diverse Magnetrührer, IKA RET basic mit Kontaktthermometer ETS-D4 fuzzy (Janke & Kunkel, Staufen)
	Vortex REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim)
	Überkopfschüttler GFL 3025 (Burgwedel)
Festphasenextraktion (SPE):	Vakuumbox für SPE-Säulen (Eigenbau Werkstatt Julius-von-Sachs-Institut, Würzburg) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)
Zentrifugen:	Kühlzentrifugen Heraeus Sepatech Minifuge RF und Megafuge 1.0R (Heraeus-Christ, Osterode)
	Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
Probenkonzentrierung:	Rotavapor R 110 (Büchi, Flawil, Schweiz)
	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 (Christ, Osterode) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)
	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-25 (Christ, Osterode) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)

II. MATERIAL

Rotationsschüttler:	Rotationsschüttler G53 (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
	Rotationsschüttler, Eigenbau der Universitätswerkstätten Bochum
Autoklaven:	Technomara-Autoklaven (Fedegari, Albuzzano, Italien)
	Autoklav 5075 ELV (Systec, Wetzlar)
Temperieren/ Inkubieren:	Thermostatisierbares Wasserbad Julabo U3 (Braun, Melsungen)
	-20°C-Gefrierschrank (Liebherr)
	-80°C-Gefrierschrank (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Messen/Wiegen:	Analysenwaage AT 200 (Mettler, Gießen)
	Laborwaage BP3100 (Sartorius, Göttingen)
	Eppendorf Reference Kolbenhubpipetten (Eppendorf, Hamburg)
Sonstige Geräte:	Laminar-Flow-Box (CEAG Envirco, Dortmund)
	UV-Lampe MinUVIS mit $\lambda = 254 \text{ nm}$ und 356 nm (Desaga, Heidelberg)
	Ultraschallbad Sonorex TK52 (Bandelin)
	Digital-pH-Meter 643 (Knick, Berlin)

III. METHODEN

III.1 Derivatisierung von freien Fettsäuren und deren Derivate

In der vorliegenden Arbeit wurden Fettsäure-Derivate durch Gaschromatographie (GC) getrennt und über Massenspektrometrie (MS) im Elektronenstoßionisationsmodus (engl.: electron impact, EI) sowie im positiven (CI) bzw. im negativen chemischen Ionisationsmodus (negative ion chemical ionization, NICI) bestimmt. Diese analytischen Methoden erforderten eine Überführung dieser Verbindungen in flüchtige, stabile und in dem jeweiligen Ionisationsmodus nachweisbare Derivate.

III.1.1 Herstellung von Diazomethan

Zur Methylierung freier Carboxylgruppen wurde die Umsetzung mit Diazomethan gewählt. Diazomethan ist ein leichtflüchtiges hochreaktives Gas, das durch Hydrolyse von Diazald gewonnen wird. Dazu wurden 5,3 g Diazald in einem 100 ml-Rundkolben eingewogen und mit 30 ml Ether versetzt. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol und 2 g Kaliumhydroxid, gelöst in 3,2 ml Wasser, wurde der Reaktionsansatz unter ständigem Rühren leicht erwärmt. Das entstandene etherlösliche Diazomethan wurde über eine Destillationsbrücke in einen eisgekühlten 100 ml-Spitzkolben, in dem 3 ml Ether vorgelegt waren, überführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde zu dem verbleibenden Reaktionsansatz vorsichtig Essigsäure zugesetzt, um Reste des Diazomethans zu Methylacetat umzusetzen. Die gelblich gefärbte Diazomethan-Lösung konnte bei -20°C gelagert werden.

III.1.2 Herstellung von Methylestern

Die zu methylierenden Fettsäure-Derivate wurden in 30 µl Methanol angelöst und tropfenweise bis zu einer bleibenden Gelbfärbung mit Diazomethan versetzt. Nach 10 min bei Raumtemperatur konnten überschüssiges Reagenz und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernt werden.

III.1.3 Herstellung von Pentafluorbenzylestern

Eine der empfindlichsten Nachweismethoden für Fettsäuren und ihre Derivate ist die massenspektrometrische Bestimmung im NICI-Modus. Dazu müssen die Carboxylfunktionen mit einer Verbindung derivatisiert werden, die einen hohen Elektroneneinfangquerschnitt besitzt. In der Prostaglandin-Chemie ist die Veresterung freier Säuren mit α -Brom-2,3,4,5,6-Pentafluortoluol (PFB-Br) eine etablierte

Derivatisierungsmethode (Morrow *et al.*, 1990b). Die Verbindungen wurden in 200 μ l Chloroform gelöst, mit 10 μ l *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) und 10 μ l PFB-Br versetzt und bei 40°C inkubiert. Nach 60 min wurde der Ansatz unter einem Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand über eine SiOH-SPE gereinigt, um überschüssige Reagenzien zu entfernen.

III.1.4 Herstellung von Trimethylsilylethern

Die Phytoprostane besitzen zum Teil noch freie Hydroxygruppen, die ebenfalls derivatisiert werden müssen, um eine gaschromatographische Auftrennung zu ermöglichen. Dazu wurden die Verbindungen in 200 μ l Chloroform gelöst und mit 50 μ l *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) für 45 min bei 40°C inkubiert. Die dabei entstandenen Trimethylsilylether konnten anschließend in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt werden.

III.1.5 Herstellung von Methoximen

Phytoprostane, die neben einer Hydroxygruppe eine zusätzliche ringständige Carbonylfunktion aufweisen, sind unter der im Injektor des Gaschromatographen vorherrschenden Temperatur von 300°C instabil. Um eine Isomerisierung bzw. eine Dehydratisierung dieser Verbindungen zu verhindern, wurde eine Derivatisierung der Carbonylfunktion zum Methoxim durchgeführt. Die Phytoprostane wurden mit 50 μ l einer Lösung von Methoxyamin-Hydrochlorid in Dimethylformamid (5 mg/100 μ l) versetzt und eine Stunde im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bis zur Trockene eingeeengt, in 2 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit 2 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden bis zur Trockene eingeeengt.

III.2 Katalytische Hydrierung

Die katalytische Hydrierung wurde zur Reduktion von Doppelbindungen zu Einfachbindungen verwendet. Die Probe wurde in 1 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Platin(IV)oxid (Katalysator nach Adams und Shriner) versetzt und für 10 min molekularer Wasserstoff über eine Glaskapillare durch den Reaktionsansatz geleitet. Zur Hydrierung von Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen wurde Lindlar-Katalysator (5% Palladium/Calciumcarbonat) verwendet und für 1 h molekularer Wasserstoff durch die Probe geleitet. Anschließend wurde der Katalysator über einen Glasfaserfilter von der Reaktionsmischung abgetrennt und die Lösung bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand konnte dann weiter derivatisiert bzw. aufgereinigt werden.

III.3 Isolierung von F₁-Phytosteranen

III.3.1 Reinigung von α -Linolensäure

5 g α -Linolensäure wurden in Hexan/Ether (9:1, v/v) gelöst, auf eine Silicasäule (10 g Silicagel 60, Partikelgröße 0,063 - 0,2 mm) geladen und mit 200 ml Hexan/Ether (9:1, v/v) eluiert. Damit konnten bereits vorhandene oxygenierte Fettsäuren abgetrennt werden. Das Eluat wurde anschließend an einem Rotationsverdampfer eingengt und die verbleibende α -Linolensäure zur Herstellung von Phytosteranen verwendet.

III.3.2 Autoxidation von α -Linolensäure zur Herstellung von PPF₁

5 g vorgereinigte α -Linolensäure wurden in 50 ml Chloroform gelöst und unter permanenter Luftzufuhr bei Raumtemperatur gerührt. Nach 10 Tagen wurde die Autoxidation gestoppt, dabei wurden noch vorhandene Hydroperoxide durch die Zugabe von Triphenylphosphin (1 g je Gramm eingesetzter α -Linolensäure) unter weiterem Rühren für 30 min zu Alkoholen reduziert [modifiziert nach (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b)].

III.3.3 Präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von PPF₁

Die autoxydierte α -Linolensäure wurde mittels präparativer Säulenchromatographie aufgetrennt. Dazu wurde eine Glassäule (3 cm Innendurchmesser) mit 30 g Kieselgel 60 (Partikelgröße 0,063 - 0,2 mm) gefüllt. Das Kieselgel wurde nacheinander mit 200 ml Methanol und 200 ml Ether gewaschen und mit 300 ml Chloroform equilibriert. Der zuvor konzentrierte Autoxidationsansatz wurde in Chloroform auf die Säule aufgegeben und mit 600 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) sowie 300 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen, um Reste der α -Linolensäure, des Triphenylphosphins und eventuell vorhandene Monohydroperoxide zu entfernen. F₁-Phytosterane wurden mit 500 ml Ether/Aceton/Essigsäure (70:30:1, v/v) eluiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt (Imbusch, 2001).

III.3.4 Festphasenextraktion von PPF₁

Die Phytosteran F₁-Fraktion wurde anschließend über eine Silica-SPE-Säule gereinigt. Ein Teil des vorgereinigten Autoxidationsansatzes (entsprechend einem Gramm eingesetzter α -Linolensäure) wurde auf eine Silica-SPE-Säule (500 mg) aufgegeben, die zuvor mit 6 ml Methanol gewaschen und mit 6 ml Chloroform equilibriert wurde. Die Säule wurde mit 6 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) sowie 6 ml

Chloroform/Aceton/Essigsäure (80:20:1, v/v) gewaschen und die F₁-Phytosterane mit 9 ml Ether/Methanol/Essigsäure (90:10:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde zur Trockene eingedunstet und in 1 ml Methanol aufgenommen (Imbusch, 2001).

III.3.5 Quantifizierung von PPF₁

Ein Aliquot der Phytosteran F₁-Fraktion wurde mit 500 ng einer [¹⁸O]₃PPF₁-Isomerenmischung als internem Standard versetzt. Der [¹⁸O]₃PPF₁-Standard wurde durch Autoxidation von α-Linolensäure in einer ¹⁸O₂-Atmosphäre hergestellt. Isotopenmarkierte Standards sind für die GC-MS-Analytik am besten geeignet, da sie die gleichen physikalisch-chemischen und chromatographischen Eigenschaften sowie gleiche Ionisationsraten in der Massenspektrometrie aufweisen. Der Ansatz wurde katalytisch hydriert (siehe III.2), zum PFB-Ester (siehe III.1.3) umgesetzt und über eine SiOH-SPE-Säule gereinigt (siehe III.3.6). Zum Abschluss wurden die noch verbliebenen Hydroxygruppen zu Trimethylsilylethern derivatisiert (siehe III.1.4) und über GC-NICI-MS analysiert und quantifiziert (siehe III.4.5a) (Imbusch, 2001).

III.3.6 Festphasenextraktion von PPF₁-PFB-Estern

Eine SiOH-SPE-Säule (500 mg) wurde mit 6 ml Methanol gewaschen und mit 6 ml Chloroform equilibriert. Die PFB-veresterten F₁-Phytosterane konnten, rekonstituiert in 1 ml Chloroform, auf die Säule aufgegeben und überschüssige Reagenzien mit 3 ml Ether entfernt werden. Die PPF₁-PFB-Ester wurden anschließend mit 6 ml Ether/Methanol (9:1, v/v) eluiert und das Lösungsmittel in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedunstet.

III.4 Chromatographische Methoden

III.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung bzw. präparative Isolierung von Phytosteranen und Prostaglandinen wurde auf Polygram SIL G/UV₂₅₄ Kieselgelfolien 20x20 cm mit einer Schichtdicke von 0,25 mm und Fluoreszenzindikator (Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt. Dabei kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung:

- Laufmittelsystem 1: Ethylacetat/Essigsäure 99:1 (v/v)
- Laufmittelsystem 2: Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 86:14:1:0,8 (v/v)
- Laufmittelsystem 3: Hexan/Ether/Essigsäure 50:50:1 (v/v)

Nach der Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms wurden folgende Methoden zur Detektion verwendet:

- UV-Löschung bei 254 nm

- Detektion in einer Jodkammer

Sublimiertes Jod reagiert als Lewis-Säure mit geeigneten Lewis-Basen (Elektronenpaar-Donoren), z.B. ungesättigten Kohlenwasserstoffen, und bildet intensiv braun oder rotgefärbte Charge-Transfer-Komplexe. Die Reaktion ist reversibel und wirkt nicht zerstörend auf die Verbindungen, so dass nach kurzer Zeit eine weitere Detektionsmethode angewandt werden kann. Auf diese Weise konnten Prostaglandine und Phytosterane, die durch UV-Licht nicht nachweisbar sind, detektiert werden.

- Kupferacetat-Sprühreagenz

Eine 3%-ige (w/v) Lösung von Kupferacetat in 80%iger wässriger Phosphorsäure bildet mit Prostanoiden beim Erwärmen charakteristisch gefärbte Komplexe (Hurst *et al.*, 1987).

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte, soweit verfügbar, durch Vergleich mit parallel aufgetragenen Referenzsubstanzen.

III.4.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (engl.: solid phase extraction, SPE) ist ein schneller Reinigungsschritt zur Aufarbeitung von Proben. Als Adsorptionsmaterialien kamen Aminopropyl- (NH₂) und Silica-Phasen (SiOH) zum Einsatz. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um 3 ml-Glassäulen der Fa. Macherey und Nagel (Düren), die mit jeweils 500 mg der stationären Phase befüllt waren. Die Chromatographie erfolgte unter leichtem Vakuum an einer Vakuumbbox, wodurch mehrere Proben parallel aufgearbeitet 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
NH ₂ -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 konnten die Säulen mit dem Lösungsmittel equilibriert werden, in dem anschließend die Probe aufgetragen wurde. Während der Probenaufarbeitung durften die SPE-Säulen nicht trockenlaufen, da dies das Elutionsprofil der Säule verändern konnte. Nach der Elution der Probe konnten die Säulen wie oben beschrieben regeneriert werden, wobei zur Lagerung nach der Methanolspülung nochmals mit je 1,5 ml Ether und Hexan nachgewaschen und abschließend trockengesaugt wurde. Aminopropyl-Material, das zur Aufarbeitung von pflanzlichen Blattmaterial eingesetzt wurde, konnte nicht regeneriert werden und wurde erneuert.

III.4.3 Präparative Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Auftrennung von Mischungen bzw. Autoxidationsansätzen im präparativen Maßstab erfolgte in Glassäulen mit einem Innendurchmesser von 1,5 bis 3 cm, deren untere Enden mit einer Fritte verschlossen waren bzw. mit silanisierter Glasfaserwatte geschlossen wurden. Das Säulenmaterial wurde nach dem Einwiegen mit Methanol aufgeschlämmt und portionsweise in die Glassäule überführt. Nachdem sich das Kieselgel abgesetzt hatte, wurde die Säule mit ca. 1 cm Seesand überschichtet, um ein Aufwirbeln des Säulenmaterials bei der Probenaufgabe oder beim Fließmittelwechsel zu verhindern. Anschließend wurde die Säule mit drei Säulenvolumen Methanol gespült und mit drei Säulenvolumen des Laufmittels equilibriert, in dem die Probenaufgabe erfolgte. Bei organischen Lösungsmitteln, die eine Mischungslücke mit Methanol aufweisen, wurde vor der Equilibrierung der Säule ein Säulenvolumen Ether bzw. Ethylacetat als Lösungsvermittler eingesetzt. Die Elutionsgeschwindigkeit des Lösungsmittels wurde auf ca. zwei Tropfen pro Sekunde eingestellt. War diese aufgrund des Fließwiderstandes der Säule nicht möglich, wurde der Druck am oberen Ende der Säule durch Einleiten von Druckluft oder Stickstoff erhöht (Flash-Chromatographie).

III.4.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde zur Trennung und zur Reinigung freier Fettsäuren sowie derivatisierter Fettsäuren eingesetzt. Als stationäre Phase wurde Reversed Phase-Material (C18, endcapped) eingesetzt. Die mobile Phase wurde nach den entsprechenden Analyten ausgewählt.

III.4.4.1 Analytische HPLC-Trennung von Deoxy-J₁/A₁-Phytosteranen

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: LiChrospher 100 RP18 endcapped (250 mm x 4 mm,
Partikelgröße 5 µm, Knauer)
Laufmittel: Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (42:29:29:0,1, v/v)
Gradient: isokratische Elution
Flussrate: 1,5 ml/min
Detektion: PDA-Detektor, $\lambda = 309$ nm für dPPJ₁, $\lambda = 328$ nm für dPPA₁
Retentionszeiten: dPPJ₁ Typ I: ca. 14 min
dPPJ₁ Typ II: ca. 16 min
dPPA₁ Typ I: ca. 18 min
dPPA₁ Typ II: ca. 20 min

III.4.4.2 Analytische HPLC-Trennung von 15-Deoxy-Prostaglandinen J₂/A₂

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: LiChrospher 100 RP18 endcapped (250 mm x 4 mm,
Partikelgröße 5 µm, Knauer)
Laufmittel: Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (30:35:35:0,1, v/v)
Gradient: isokratische Elution
Flussrate: 1,5 ml/min
Detektion: PDA-Detektor, $\lambda = 309$ nm für 15d-PGJ₁, $\lambda = 328$ nm für 15d-PGA₂
Retentionszeiten: 15d-PGJ₂: ca. 11 min
15d-PGA₂: ca. 13 min

III.4.4.3 HPLC-Quantifizierung von Deoxy-J₁/A₁-Phytosteranen

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: LiChrospher 100 RP18 endcapped (250 mm x 4 mm,
Partikelgröße 5 µm, Knauer)

Laufmittel A: Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (42:29:29:0,1, v/v)

Laufmittel B: Methanol/Essigsäure (100:0,1, v/v)

Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	100	0
20,0	100	0
20,1	55	45
30,0	55	45
30,1	0	100
35,0	0	100

Flussrate: 1,5 ml/min

Detektion: PDA-Detektor, $\lambda = 309$ nm

Retentionszeiten: dPPJ₁ /dPPA₁: siehe III.4.4.1

15d-PGJ₂: ca. 29 min

III.4.4.4 Semipräparative HPLC-Trennung von D₁/E₁-Phytosteranen

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Merck-Hitachi

Trennsäule: LiChrospher 100 RP18 endcapped (250 mm x 8 mm,
Partikelgröße 5 µm, Knauer)

Laufmittel: Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (57:27:16:0,1, v/v)

Gradient: isokratische Elution

Flussrate: 3,0 ml/min

Detektion: UV-Detektor, $\lambda = 204$ nm

Retentionszeiten: PPD₁/E₁: ca. 25 - 50 min

III.4.4.5 Präparative HPLC-Trennung von Deoxy-J₁-Phytosteranen

Die Auftrennung bzw. Isolierung von Deoxy-J₁-Phytosteranen im präparativen Maßstab erfolgte an zwei unterschiedlichen Systemen:

(a) Präparative HPLC:

HPLC-Anlage: Präparative HPLC Knauer

Trennsäule: LiChrosorb RP18 (Hibar 250 mm x 25 mm, Partikelgröße 7 µm, Merck)

Laufmittel: Wasser/Methanol/Acetonitril/Essigsäure (42:29:29:0,1, v/v)

Gradient: isokratische Elution

Flussrate: 17,0 ml/min

Detektion: UV-Detektor, $\lambda = 309$ nm

Retentionszeiten: dPPJ₁ Typ I: ca. 62 min

dPPJ₁ Typ II: ca. 70 min

(b) Lobar-System:

HPLC-Anlage: Lobar-Anlagen 1 und 2

Trennsäule: LiChroprep RP18 (Lobar Fertigsäule Größe A, 240 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 - 63 µm, Merck)

Laufmittel: Wasser/Methanol/Acetonitril/Tetrahydrofuran/Essigsäure (52:12:21:5:0,1, v/v)

Gradient: isokratische Elution

Flussrate: 1,6 ml/min

Detektion: UV-Detektor, $\lambda = 309$ nm

Retentionszeiten: dPPJ₁ Typ I: ca. 255 min

dPPJ₁ Typ II: ca. 284 min

III.4.4.6 Fluoreszenz-HPLC zur Bestimmung von Cyclopentenonen

Trennsystem 1:

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: LiChrospher 100 RP18 endcapped (250 mm x 2 mm, Partikelgröße 5 µm, Knauer)

III. METHODEN

Laufmittel A: Wasser/Acetonitril/Essigsäure (55:45:0,1, v/v)

Laufmittel B: Acetonitril/Essigsäure (100:0,1, v/v)

Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	100	0
20,0	90	10
40,0	0	100
55,0	0	100

Flussrate: 0,45 ml/min

Detektion: Fluoreszenz-Detektor W474, $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$

Retentionszeiten: dPPJ₁ Typ I: ca.15 min

dPPJ₁ Typ II: ca.18 min

12-OPDA: ca. 38 min

15d-PGJ₂: ca. 41 min

Trennsystem 2:

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: Superspher 100 RP18 endcapped (100 mm x 2 mm,
Partikelgröße 4 μm , Knauer)

Laufmittel A: Wasser/Acetonitril/Essigsäure (60:40:0,1, v/v)

Laufmittel B: Acetonitril/Essigsäure (100:0,1, v/v)

Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	100	0
30,0	50	50
30,1	0	100
40,0	0	100

Flussrate: 0,45 ml/min

Detektion: Fluoreszenz-Detektor W474, $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$

Retentionszeiten: dPPJ₁ Typ I: ca.11 min

dPPJ₁ Typ II: ca.16 min

12-OPDA: ca. 28 min

15d-PGJ₂: ca. 30 min

III.4.4.7 Fluoreszenz-HPLC zur Bestimmung von Scopoletin

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Waters

Trennsäule: Purospher Star RP18 endcapped (250 mm x 4 mm,
Partikelgröße 5 µm, Merck)

Laufmittel A: Wasser/Essigsäure (100:0,1, v/v)

Laufmittel B: Acetonitril/Essigsäure (100:0,1, v/v)

Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	90	10
5,0	90	10
8,0	80	20
30,0	40	60
30,1	0	100
35,0	0	100

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektion: Fluoreszenz-Detektor W474, $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$

Retentionszeiten: Scopolin: ca. 13 min

Scopoletin: ca. 20 min

4-Methylumbelliferon: ca. 23 min

III.4.5 Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographische Analyse von Proben konnte an zwei verschiedenen Systemen durchgeführt werden. Die beiden Systeme zeigten nur geringe Unterschiede bezüglich der Retentionszeit der Analyten sowie der Detektions- und Nachweisgrenzen in den verschiedenen Ionisationstechniken. Für Analysen im positiven chemischen Ionisationsmodus (CI) wurde vor allem System 1 eingesetzt.

GC-MS-System 1:

Gaschromatograph: Varian 3400
Vorsäule 1: methyldesaktivierte Säule (5 m x 0,25 mm, Machery-Nagel, Düren)
Säule 1: Optima 5 (25 m x 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm, Machery-Nagel, Düren)
Vorsäule 2: methyldesaktivierte Säule (10 m x 0,25 mm, Phenomenex, Aschaffenburg)
Säule 2: Zebron ZB 5 (30 m x 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg)
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)

GC-MS-System 2:

Gaschromatograph: Agilent 6890
Vorsäule: methyldesaktivierte Säule (10 m x 0,25 mm, Phenomenex, Aschaffenburg)
Säule: Zebron ZB 5 (30 m x 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg)
Trägergas: Helium
Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min bzw. 2 ml/min
Injektor: Insert-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
Split: splitless injection
Detektor: JMS-GCMate II (Jeol, Tokyo, Japan)

III. METHODEN

(a) Trennbedingungen für hydrierte, TMS-veretherte PPF₁-PFB-Ester:

Zur Bestimmung von hydrierten, TMS-veretherten PPF₁-PFB-Estern mit dem GC-MS-System 2 wurde der Trägergasfluss auf 1 ml/min eingestellt.

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0,0	-	175
0,5	-	175
4,2	30	285
10,2	2,5	300
15,2	-	300

(b) Trennbedingungen für Deoxy-J₁/A₁-Phytosteran- bzw. 15-Deoxy-Prostaglandin J₂-Methylester:

Zur Bestimmung der Methylester von Deoxy-J₁/A₁-Phytosteranen bzw. 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ mit dem GC-MS-System 2 wurde der Trägergasfluss auf 1 ml/min eingestellt, zur Analyse von hydrierten Methylestern bzw. von methoximierten Methylestern wurde der Trägergasfluss auf 2 ml/min eingestellt.

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0,0	-	160
1,7	29	210
19,7	5	300
24,7	-	300

(c) Trennbedingungen für hydrierte Deoxy-J₁/A₁-Phytosteran- bzw. 15-Deoxy-Prostaglandin J₂-PFB-Ester:

Zur Bestimmung der PFB-Ester von hydrierten Deoxy-J₁/A₁-Phytosteranen bzw. 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ mit dem GC-MS-System 2 wurde der Trägergasfluss auf 1 ml/min eingestellt.

III. METHODEN

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0,0	-	175
0,5	-	175
3,0	30	250
18,0	2	280
18,7	30	300
22,7	-	300

(d) Trennbedingungen für TMS-veretherte PPD₁-Methoxim-Methylester:

Die Bestimmung von TMS-veretherten PPD₁-Methoxim-Methylestern erfolgte am GC-MS-System 1.

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0,0	-	170
2,0	30	230
16,0	5	300
21,0	-	300

(e) Trennbedingungen für PFB-Ester und für hydrierte, methoximierte dPPJ₁/A₁- bzw. 15d-PGJ₁-PFB-Ester:

Zur Bestimmung der verschiedenen PFB-Ester von Deoxy-J₁/A₁-Phytosteranen bzw. 15-Deoxy-Prostaglandin J₁ mit dem GC-MS-System 2 wurde der Trägergasfluss auf 1 ml/min eingestellt.

Gesamtzeit [min]	ΔT [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0,0	-	175
0,5	-	175
4,3	30	290
12,3	0,5	294
12,9	10	300
16,9	-	300

III.5 Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden an einem SSQ 700-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) und an einem JMS GCMate II Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan) vorgenommen. Die Probenzufuhr erfolgte über die Gaschromatographen. An beiden Geräten war eine Detektion im Elektronenstoßionisationsmodus (EI) sowie im positiven bzw. negativen chemischen Ionisationsmodus (CI bzw. NICI) möglich. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) wurde am Jeol GCMate II durchgeführt.

Die Aufnahme von EI-Spektren erfolgte unter folgenden Bedingungen:

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

Die Aufnahme von positiven und negativen CI-Spektren wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	SSQ 700	JMS-GCMate II
Ionenquellentemperatur	150°C	200°C
Elektronenenergie	200eV	200eV
Reaktand-Gas	Isobutan	Methan
Quellendruck	2,0 – 2,5 x 10 ⁻⁵ Torr	2,4 x 10 ⁻² Pa

IV. ERGEBNISSE

Prostaglandine sind im Tierreich weitverbreitete Signalmoleküle, die enzymatisch aus Arachidonsäure gebildet werden. Auf einem zweiten Weg können durch Radikal-katalysierte Autoxidation von Arachidonsäure Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die Isoprostane, entstehen, die als Marker für oxidativen Stress *in vivo* angesehen werden. Höhere Pflanzen können keine Arachidonsäure, die Vorstufe für beide Bildungswege, synthetisieren. Aus der in Pflanzen weitverbreiteten α -Linolensäure können dagegen über eine enzymatische Reaktionsfolge die Jasmonate synthetisiert werden, die an der Regulation verschiedener pflanzlicher Reaktionen, z.B. an der Pathogenabwehr, beteiligt sind. In Analogie zum Tier kann auch hier aus α -Linolensäure nichtenzymatisch durch Autoxidation eine Serie von cyclischen Fettsäurederivaten, die Phytoprostane, gebildet werden. Die Strukturanaloga der Prostaglandine E_2 und F_2 in Pflanzen, die E_1 - und F_1 -Phytoprostane, konnten bereits 1998 und 2000 charakterisiert und in Pflanzen nachgewiesen werden (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998). Phytoprostane mit einer Prostaglandin D_2 -ähnlichen Ring-Struktur konnten in Pflanzen bisher noch nicht charakterisiert werden.

Von Prostaglandin D_2 ist bekannt, dass es leicht unter Wasserabspaltung in Cyclopentenon-Derivate umgewandelt werden kann, die eine biologisch hochwirksame Verbindungsklasse im Tier darstellen. Analog dazu könnten theoretisch aus D_1 -Phytoprostane α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen entstehen, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu 12-Oxo-Phytodiensäure und den in verschiedenen *Chromolaena*-Spezies gefundenen Cyclopentenonen aufweisen.

IV.1 Gewinnung von PPD_1 und $dPPJ_1$ durch Partialsynthese

Um Pflanzen auf das Vorkommen von D_1 -Phytoprostanen und deren möglichen Abbauprodukten, den Deoxy- J_1 -Phytoprostanen, zu untersuchen, mussten authentische Referenzverbindungen für eine chromatographische und massenspektrometrische Charakterisierung hergestellt werden. Die Synthese der D_1 -Phytoprostane bzw. derer Dehydratisierungsprodukte aus F_1 -Phytoprostanen wurde entsprechend einer modifizierten Vorschrift von Nishizawa zur Partialsynthese von Prostaglandin D_2 aus Prostaglandin $F_{2\alpha}$ durchgeführt (siehe Abbildung IV.1) (Nishizawa *et al.*, 1975). Die chemische Reaktionsfolge umfasste die Einführung einer Schutzgruppe für die beiden ringständigen Alkohole, gefolgt von einer stabilen Derivatisierung der Hydroxygruppe in der Seitenkette. Durch die anschließende Hydrolyse der ersten Schutzgruppe war eine selektive Oxidation des 1,3-Diols im

Cyclopentanring möglich, wobei von dem verwendeten Oxidationsmittel bevorzugt die alkoholische Funktion angegriffen wurde, die zu D-Ring-Verbindungen führte. Nach der Entfernung der verbliebenen Seitenkettenschutzgruppe erhielt man D-Ring-Verbindungen in einer Mischung mit E-Ring-Verbindungen.

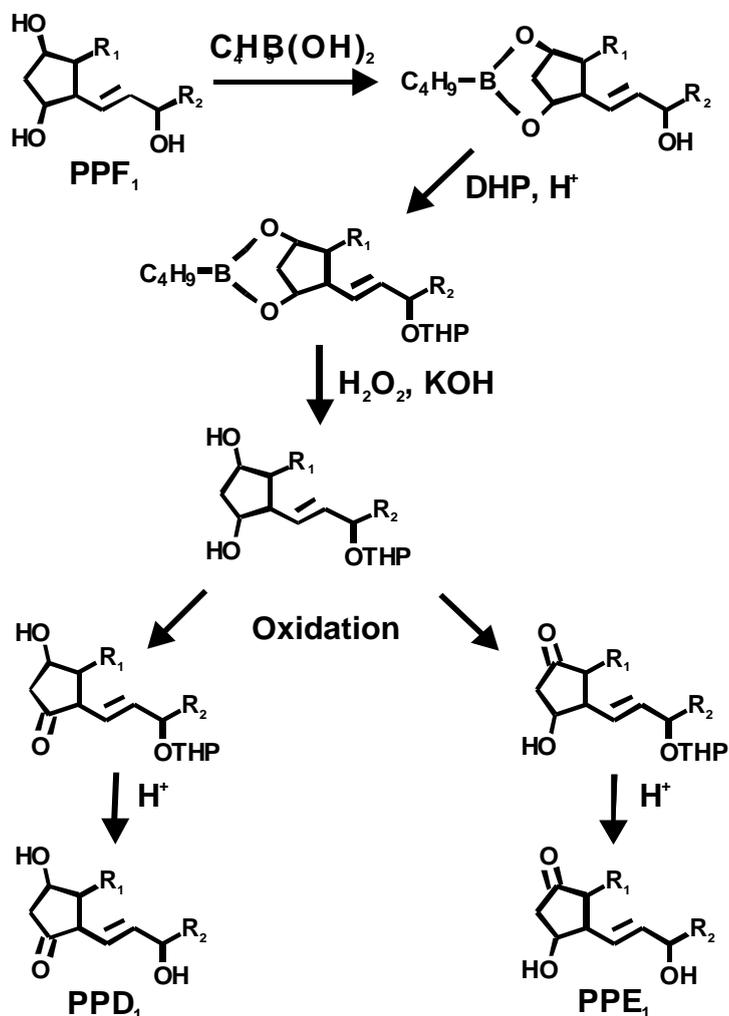


Abbildung IV.1: Schematische Darstellung der Partialsynthese von PPD₁/E₁ ausgehend von F₁-Phytosteranen. (Typ I: R₁ = C₈H₁₅O₂, R₂ = C₂H₅; Typ II: R₁ = C₂H₅, R₂ = C₈H₁₅O₂).

IV.1.1 Isolierung von F₁-Phytosteranen

Die Ausgangsverbindungen der Partialsynthese, F₁-Phytosterane, konnten durch Autoxidation von α-Linolensäure in einem aprotischen Lösungsmittel wie Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff hergestellt werden (siehe III.3) (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b).

Die Aufreinigung des Autoxidationsansatzes erfolgte durch präparative Säulenchromatographie der oxidierten Fettsäuren über Silicagel (siehe III.3.3). Die so erhaltene Mischung von Fettsäureoxidationsprodukten, die neben den F₁-Phytosteranen noch weitere Autoxidationsprodukte, unter anderem auch acyclische Trihydroxyverbindungen mit ähnlichen chromatographischen Eigenschaften, enthielt, wurde nochmals chromatographisch über eine Silica-SPE-Säule gereinigt (siehe III.3.4). Die erhaltene Isomerenmischung konnte mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer gegen [¹⁸O]₃PPF₁ als internem Standard quantifiziert werden (siehe III.4.5, System 1). Die Autoxidation von α-Linolensäure in einem aprotischen Lösungsmittel ergab PPF₁ in einer Ausbeute von 11,7 mg pro Gramm eingesetzter α-Linolensäure. Da eine weitere Isolierung reiner F₁-Phytosterane aus diesem komplexen Gemisch durch HPLC sehr aufwendig war, wurde die Partialsynthese direkt mit dieser Fraktion durchgeführt.

IV.1.2 Herstellung von PPF₁-n-Butylboronsäure-Estern

Um eine Schutzgruppe für die leicht zu oxidierenden Hydroxygruppe in der Seitenkette einführen zu können, musste zuerst das 1,3-Diol im Cyclopentanring maskiert werden. Da die beiden ringständigen Alkohole aufgrund ihrer Synthese über ein Bicyclo-Endoperoxid in *cis*-Stellung angeordnet waren, bot sich die Bildung eines cyclischen n-Butylboronsäure-Esters an.

Dazu wurden 10 mg einer Isomerenmischung von F₁-Phytosteranen (30,5 μmol) in 4 ml Dichlormethan (seccosolv, < 0,005% H₂O, Merck, Darmstadt) gelöst und 50 mg n-Butylboronsäure zugesetzt. Die Mischung wurde unter ständigem Rühren im Wasserbad bei 45°C zum Sieden erhitzt und verflüchtigtes Lösungsmittel regelmäßig ersetzt. Da die entstandenen Verbindungen hydrolyse-empfindlich waren, war es notwendig, das durch die Kondensationsreaktion freigesetzte Wasser kontinuierlich mit dem Lösungsmitteldampf aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Die Entwicklung der DC-Platte wurde in Ethylacetat/Essigsäure (99:1, v/v, Laufmittelsystem 1, siehe III.4.1) durchgeführt. Als Standard wurden die PPF₁-Isomerenmischung und Prostaglandin F_{2α}, das ebenfalls zum n-Butylboronsäure-Ester umgesetzt wurde, verwendet. Die n-Butylboronsäure-Ester von PGF_{2α} und PPF₁ (R_f = 0,8 - 0,9) unterschieden sich deutlich von den underivatisierten Referenzsubstanzen PGF_{2α} und PPF₁ (R_f = 0,1 - 0,2). Nach 30 bis 45 min war kein PPF₁ mehr nachweisbar. Aufgrund der Solvolyse-Empfindlichkeit der Verbindung war die darauffolgende Aufreinigung über eine Silica-Festphasenextraktion mit großen Verlusten verbunden.

IV.1.3 Festphasenextraktion von PPF₁-n-Butylboronsäure-Estern

Eine Derivatisierung mit n-Butylboronsäure gelingt vor allem mit 1,2- bzw. 1,3-Diolen, so dass weitere im Autoxidationsansatz enthaltene, nicht derivatisierte Fettsäureoxidationsprodukte aufgrund ihrer höheren Polarität über Silica-Material abgetrennt werden konnten. Dazu wurde eine Silica-SPE-Säule (500 mg) mit 6 ml Methanol gewaschen und mit 6 ml Dichlormethan equilibriert. Der Ansatz konnte in Dichlormethan auf die Säule aufgegeben werden und die PPF₁-n-Butylboronsäure-Ester mit 9 ml Ether/Essigsäure (99:1, v/v) eluiert werden. Das Eluat wurde bei Raumtemperatur in einem Stickstoffstrom eingeblasen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen.

IV.1.4 Herstellung von Tetrahydropyranylethern

Die Seitenketten-Hydroxygruppe des PPF₁-n-Butylboronsäureester wurde im darauffolgenden Schritt zum Tetrahydropyranylether (THP) umgesetzt. Alkohole bilden mit überschüssigem Dihydropyran unter Säurekatalyse Acetale, die alkalistabil, jedoch nur wenig säurestabil sind. Dazu wurden dem Reaktionsansatz 2 ml 3,4-Dihydro-2H-pyran und 10 mg p-Toluolsulfonsäure (Merck, Darmstadt) als saurer Katalysator zugesetzt und die Mischung unter ständigem Rühren im Wasserbad auf 40°C erwärmt. Nach 20 Stunden waren die Verbindungen quantitativ umgesetzt und die Reaktion wurde abgebrochen. Nachdem überschüssiges Reagenz unter Vakuum entfernt worden war, wurde ohne weitere Aufreinigung weitergearbeitet.

IV.1.5 Hydrolyse von PPF₁-n-Butylboronsäure-Estern

Zur Oxidation der ringständigen Hydroxy-Gruppen musste die zu Beginn der Reaktionsfolge eingeführte Schutzgruppe, der n-Butylboronsäure-Ester, wieder abgespalten werden. Boronsäureester sind schonender zu entfernen, wenn diese zuvor zu den leichter hydrolysierbaren Borsäureestern oxidiert werden. Der Rückstand wurde hierfür in 2 ml Methanol gelöst, 850 µl 3 N wässrige Kaliumhydroxid-Lösung sowie 330 µl Wasserstoffperoxid (30%) wurden zugesetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Methanol unter Vakuum entfernt und der verbleibende Reaktionsansatz mit 7 ml Wasser verdünnt. Durch zweimaliges Ausschütteln des Ansatzes mit 3 ml Ether konnten überschüssige Reagenzien entfernt werden. Der wässrige Rest wurde auf 0°C gekühlt, mit eiskalter 2 N Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und dreimal mit je 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt, zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung

gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die Umsetzung zum F₁-Phytoprostan-THP-Ether wurde über DC kontrolliert. Die DC-Platte wurde im Laufmittelsystem 1 entwickelt. Der THP-Ether der F₁-Phytoprostane (R_f = 0,3 - 0,5) hatte ein deutlich anderes Laufverhalten als die eingesetzte Vorstufe, der n-Butylboronsäure-Ester (R_f = 0,8 - 0,9). Die Ausgangsverbindungen der Partialsynthese, die F₁-Phytoprostane, konnten nur noch in Spuren nachgewiesen werden.

IV.1.6 Festphasenextraktion von F₁-Phytoprostan-THP-Ethern

Die zum THP-Ether umgesetzten F₁-Phytoprostane wurden über eine weitere Silica-SPE-Säule gereinigt, um noch vorhandene Reagenzien weitgehend zu entfernen. Dazu wurde eine Silica-SPE-Säule (500 mg) mit 6 ml Ethylacetat gewaschen und mit 6 ml Hexan/Ethylacetat (50:50, v/v) equilibriert. Die Probe wurde in 6 ml Hexan/Ethylacetat (50:50, v/v) auf die Säule aufgegeben und mit 6 ml Hexan/Ethylacetat (50:50, v/v) gewaschen. Die F₁-Phytoprostan-THP-Ether konnten mit 9 ml Ethylacetat eluiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt werden. Ein Aliquot der Probe wurde mittels DC auf vollständige Elution und Reinheit überprüft (siehe IV.1.5).

IV.1.7 Oxidation von PPF₁-Tetrahydropyranylethern

Zur selektiven Oxidation der ringständigen Hydroxygruppen wurde eine Lösung von Pyridiniumdichromat in Acetonitril (50 mg/10 ml) eingesetzt. Das Pyridiniumdichromat wurde mit Acetonitril versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die nicht vollständig gelösten Anteile des Oxidationsmittels abzentrifugiert. Die PPF₁-Tetrahydropyranylether wurden mit 1 ml des Überstands versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren inkubiert.

Die Oxidationsreaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml Wasser beendet und der Ansatz dreimal gegen 2 ml Ethylacetat/Essigsäure (99:1, v/v) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur vollständigen Entfernung des überschüssigen Oxidationsmittels auf eine mit Ethylacetat/Essigsäure (99:1, v/v) equilibrierte Silica-SPE-Säule aufgegeben und mit 3 ml Ethylacetat/Essigsäure (99:1, v/v) nacheluiert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Ein Aliquot der Lösung wurde zuvor über DC auf vollständigen Umsatz im Laufmittelsystem 1 überprüft. Die oxidierten PPD₁/E₁-THP-Ether ergaben einen breiten gelben Bereich (R_f = 0,6 - 0,9) oberhalb des Ausgangsprodukts, den PPF₁-THP-Ethern (R_f = 0,3 - 0,5), die nur noch in Spuren zu erkennen waren.

IV.1.8 Hydrolyse von D₁/E₁-Phytoprostan-THP-Ethern

Zum Abschluss der Reaktionssequenz musste die noch verbliebene Schutzgruppe des Alkohols in der Seitenkette, der Tetrahydropyranylether, wieder entfernt werden. Dazu wurde der Rückstand in 2 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Wasser und 1 M Citronensäure (1:3:1, v/v) gelöst und bei 40°C inkubiert.

Nach einer Stunde wurde der Ansatz mit 5 ml Wasser verdünnt und dreimal gegen 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in einer definierten Menge über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknetem Ethylacetat aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde über DC im Laufmittelsystem 2 analysiert. Der Oxidationsansatz zeigte nach Detektion mit dem Kupferacetat-Sprühreagenz eine breite gelbliche Verfärbung mit einem R_f-Wert von 0,45 - 0,6. Diese Bande lag im Bereich der als Referenzen aufgetragenen Prostaglandine D₂ (R_f = 0,56, gelbe-orange Färbung) und PGE₂ (R_f = 0,52, gelb-grüne Färbung). Die als Standard mitaufgetragene, polarere Phytoprostan-F₁-Isomerenmischung und Prostaglandin F_{2α} zeigten eine blau-violette Färbung im R_f-Bereich von 0,34 - 0,4. Aufgrund der großen Anzahl an Isomeren - für die D₁- und E₁-Phytoprostane sind theoretisch jeweils 32 Isomere denkbar - und des sehr ähnlichen chromatographischen Verhaltens der D- und E-Ring-Verbindungen, die sich nur in der entgegengesetzten Stellung der ringständigen Carbonyl- und Hydroxygruppe unterschieden, war eine weitere Auftrennung des komplexen Reaktionsansatzes bzw. eine Isolierung der D₁-Phytoprostane nicht möglich. Eine Quantifizierung des Reaktionsansatzes war ebenfalls nicht direkt möglich. Eine Gehaltsbestimmung konnte erst nach saurer Dehydratisierung zu Deoxy-J₁- und Deoxy-A₁-Verbindungen durchgeführt werden (siehe IV.3).

IV.1.9 Herstellung von Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostanen

Zur weiteren analytischen Untersuchung wurde die Phytoprostan D₁/E₁-Isomerenmischung durch säurekatalysierte Dehydratisierung in die entsprechenden Deoxy-J₁-Phytoprostane (dPPJ₁) und Deoxy-A₁-Phytoprostane (dPPA₁) überführt. Prostaglandin D₂ und E₂ wurden als Referenzverbindungen ebenfalls durch Säurekatalyse dehydratisiert. Dadurch konnte die Anzahl der Isomeren auf jeweils zwei Regioisomere je Verbindungsklasse reduziert werden, wobei jeder Typ aufgrund der *cis-trans*-Isomerie der Doppelbindungen in der Seitenkette theoretisch aus vier geometrischen Isomeren bestehen kann (siehe Abbildung V.1). Dazu wurde ein Aliquot der PPD₁/E₁-Isomerenmischung in einem Stickstoffstrom zur Trockene eingeblasen, mit 500 µl

Trifluoressigsäure versetzt und 15 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die flüchtige Trifluoressigsäure in einem Stickstoffstrom abblasen und der Rückstand in 1 ml Chloroform aufgenommen.

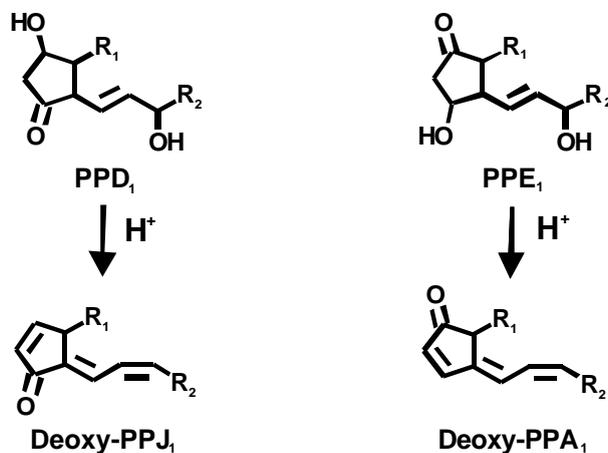


Abbildung IV.2: Sauer katalysierte Dehydratisierung von PPD₁ und PPE₁ zu den Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostanen. (Typ I: R₁ = C₈H₁₅O₂, R₂ = C₂H₅; Typ II: R₁ = C₂H₅, R₂ = C₈H₁₅O₂).

Zur vollständigen Dehydratisierung von E₁-Phytoprostanen bzw. von Prostaglandin E₂ reichte die Säurestärke der Trifluoressigsäure nicht aus. Hierfür wurde der Ansatz mit 200 µl konzentrierter Salzsäure (37%) versetzt und 15 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 ml Wasser verdünnt und dreimal gegen 3 ml Ether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

IV.1.10 Festphasenextraktion von dPPJ₁ und dPPA₁

Zur Entfernung polarerer Verunreinigungen wurde der Dehydratisierungsansatz über eine weitere Silica-Festphasenextraktion aufgereinigt. Dazu wurde eine Silica-SPE-Säule mit 6 ml Methanol gewaschen, mit 6 ml Chloroform equilibriert und die Probe in Chloroform auf die Säule aufgegeben. Unpolare Verbindungen wie dPPJ₁ und dPPA₁ konnten mit 9 ml Hexan/Ether/Essigsäure (50:50:1, v/v) eluiert werden. Das Eluat wurde in einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und bei -20°C gelagert.

IV.1.11 Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Isolierung von Cyclopentenonen

Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Aliquots des Dehydratisierungsansatzes im Laufmittelsystem 3 ergab zwei UV-löschende Banden mit Rf-Werten von 0,41 bzw. 0,52 mit gelber bzw. gelb-brauner Färbung nach Kupferacetat-Detektion, die sich in ihrem DC-Laufverhalten sehr ähnlich zu den als Referenzen aufgetragenen, ebenfalls sauer dehydratisierten Prostaglandin D₂- (Rf = 0,43, gelbbraune Färbung) und Prostaglandin E₂-Derivaten (Rf = 0,55, gelb-braune Färbung) verhielten. Zur weiteren Charakterisierung dieser Verbindungen wurde eine entsprechende Menge des Dehydratisierungsansatzes sowie der eingesetzten Standardverbindungen präparativ über Dünnschichtchromatographie vorgereinigt. Dazu wurde jeder einzelne Ansatz quantitativ auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen und im Laufmittelsystem 3 entwickelt. Die unter UV-Licht bei 254 nm sichtbaren Bereiche wurden großzügig ausgekratzt und der Kieselgelrückstand für 15 min in 3 ml Methanol geschüttelt. Das Eluat wurde zur Abtrennung von Kieselgelresten über einen Glasfaserfilter gegeben und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

IV.1.12 HPLC-Nachweis und -Isolierung von Cyclopentenon-Phytosteranen bzw. -Prostaglandinen

Der Rückstand jeder DC-Isolierung wurde in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Davon wurden 50 µl über RP-HPLC analysiert. Die Auftrennung Phytosteran-haltiger Proben erfolgte wie unter III.4.4.1 beschrieben. Für Prostaglandin-haltige Proben wurde die mobile Phase entsprechend modifiziert (siehe III.4.4.2). Zum Nachweis der Verbindungen wurde ein Photodiodenarray-Detektor verwendet. Abbildung IV.3 zeigt ein Chromatogramm von Deoxy-J₁-Phytosteranen, der unteren DC-Bande des Dehydratisierungsansatzes, bei 309 nm. Es konnten zwei Hauptverbindungen, Typ I mit einer Retentionszeit von ca. 14 min und Typ II mit einer Retentionszeit von ca. 15,5 min, detektiert werden, die beide Absorptionsmaxima bei 227,6 nm und 309,0 nm aufwiesen. Die so erhaltenen UV-Spektren dieser Verbindungen sind identisch mit aus Prostaglandin D₂ hergestelltem 15d-PGJ₂ sowie authentischem 15-Deoxy-Δ^{12,14}-Prostaglandin J₂ (siehe Abbildung IV.3), was auf die Anwesenheit eines kreuzkonjugierten Trienon-Systems in den Molekülen hindeutet. Eine weitere Auftrennung der in jedem Peak enthaltenen, theoretisch möglichen geometrischen Isomere war aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit nicht möglich.

IV. ERGEBNISSE

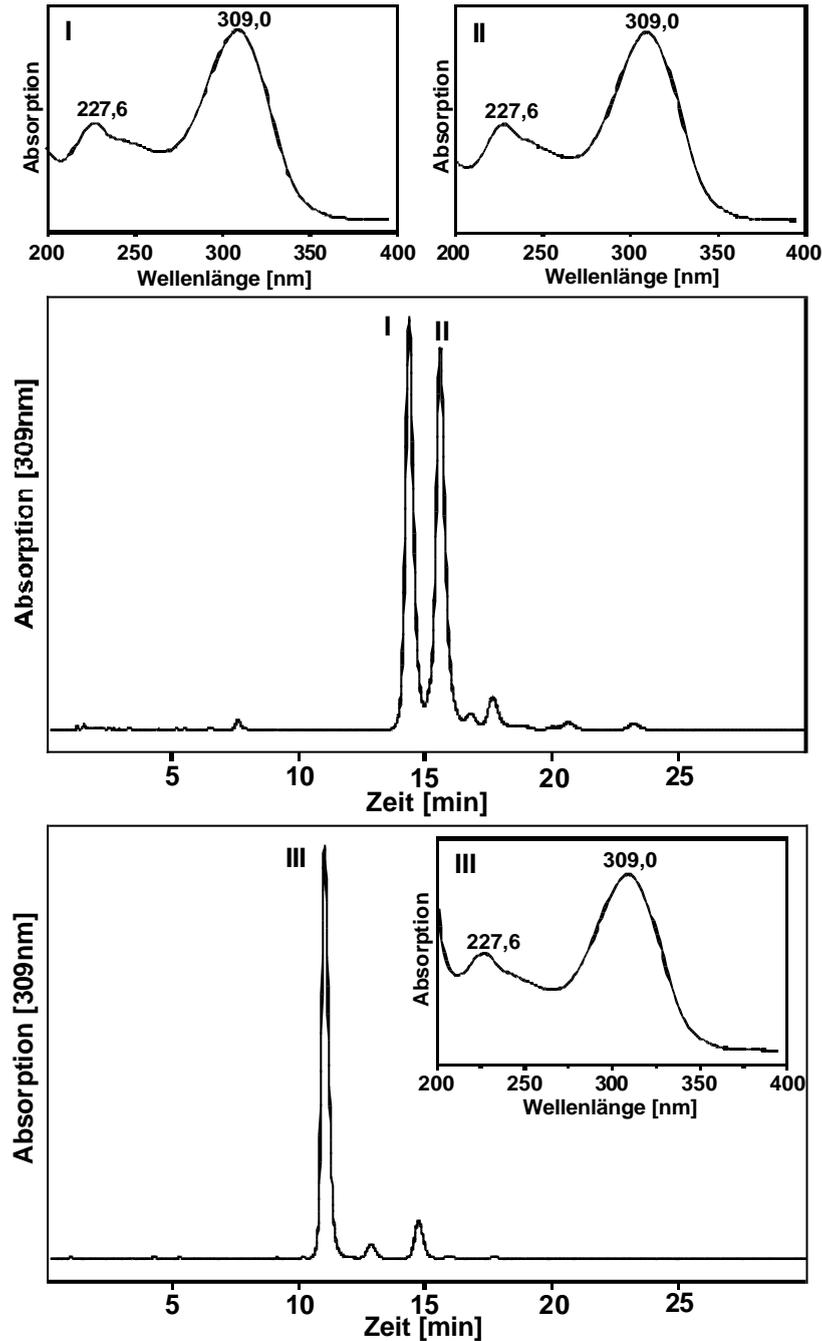


Abbildung IV.3: HPLC-Chromatogramme mit UV-Spektren von dPPJ₁ Typ I (I) und Typ II (II) sowie der Referenz 15d-PGJ₂ (III). Trennbedingungen siehe III.4.4.1 bzw. III.4.4.2.

Die HPLC-Auftrennung der zweiten, oberen Bande ergab mehrere Peaks bei einer Detektion bei 328 nm, wovon zwei Peaks, entsprechend dPPA₁ Typ I mit einer Retentionszeit von ca. 17,8 min und Typ II mit einer Retentionszeit von ca. 20,0 min, in ihrem UV-Spektrum und den Absorptionsmaxima mit dem ebenfalls durch saure Dehydratisierung aus PGE₂ hergestellten 15d-PGA₂ vergleichbar waren (siehe Abbildung IV.4).

IV. ERGEBNISSE

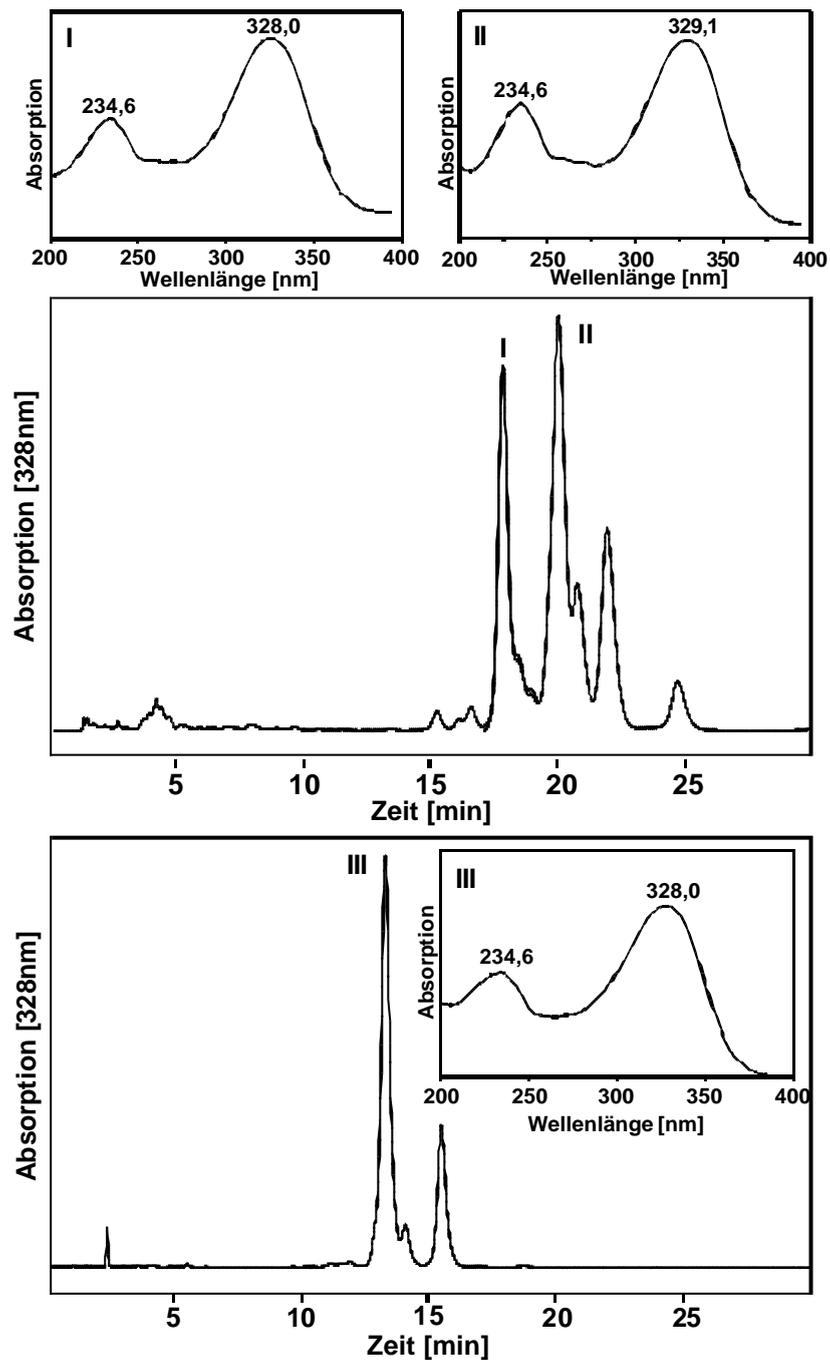


Abbildung IV.4: HPLC-Chromatogramme mit UV-Spektren von dPPA₁ Typ I (I) und Typ II (II) sowie der Referenz 15d-PGA₂ (III). Trennbedingungen siehe III.4.4.1 bzw. III.4.4.2.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die von der HPLC eluierten Peaks aufgefangen und der organische Lösungsmittelanteil unter Vakuum reduziert. Der Rückstand wurde mit 3 ml Wasser verdünnt und dreimal gegen Ether/Essigsäure (99:1, v/v) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

IV.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Cyclopentenon-Phytosteranen

IV.2.1 GC-MS-Analytik von dPPJ₁/A₁-Methylestern

Aufgrund der UV-Spektren konnte bereits eine vorläufige Identifizierung der Peaks als dPPJ₁ und dPPA₁ vorgenommen werden. In weiteren Versuchen sollte nun eine Zuordnung der Regioisomere erfolgen. Dazu wurden die über HPLC isolierten vier Hauptverbindungen der Partialsynthese, jeweils Typ I und II der Deoxy-J₁-Phytosterane und der Deoxy-A₁-Phytosterane, sowie die Referenzverbindung 15d-PGJ₂ zum Methylester umgesetzt (siehe III.1.2) und zuerst über GC-MS im positiven CI-Modus analysiert (GC-Trennbedingungen und MS-Bedingungen siehe III.4.5b bzw. III.5). Die Derivatisierung zum Methylester diente dazu, die Phytosterane bzw. die Prostaglandine in leichter flüchtige und damit über Gaschromatographie auftrennbare Verbindungen zu überführen. Alle untersuchten Phytosteran-Verbindungen ergaben im Chromatogramm eine Serie von Peaks mit einem Molekülion (M+H)⁺ von *m/z* 305, was der Masse der gesuchten Verbindungen entspricht (nicht abgebildet). Der Standard 15d-PGJ₂ ergab ebenso eine Serie von mehreren Peaks mit einem Molekülion mit der Masse *m/z* 331 (M+H)⁺, entsprechend der Molekülmasse des eingesetzten 15d-PGJ₂-Methylesters (nicht abgebildet). Kreuzkonjugierte Cyclopentenone isomerisieren offensichtlich bereits im Injektor des Gaschromatographen, was zu der relativ großen Anzahl an Peaks in den Chromatogrammen führt.

Neben der CI-Ionisation, die vor allem Aussagen über die Molekülmasse zulässt, wurden die Verbindungen im EI-Modus analysiert, um weitere Aussagen bezüglich der Regioisomerie treffen zu können. Bei der Elektronenstoßionisation einer Verbindung entstehen meist charakteristische Fragmente, über die Rückschlüsse auf die Molekülstruktur gezogen werden können. In Abbildung I.5 sind die erhaltenen Chromatogramme und die dazugehörigen Massenspektren von dPPJ₁ und dPPA₁, jeweils Typ I und II, und der Standardverbindung 15d-PGJ₂ dargestellt.

IV. ERGEBNISSE

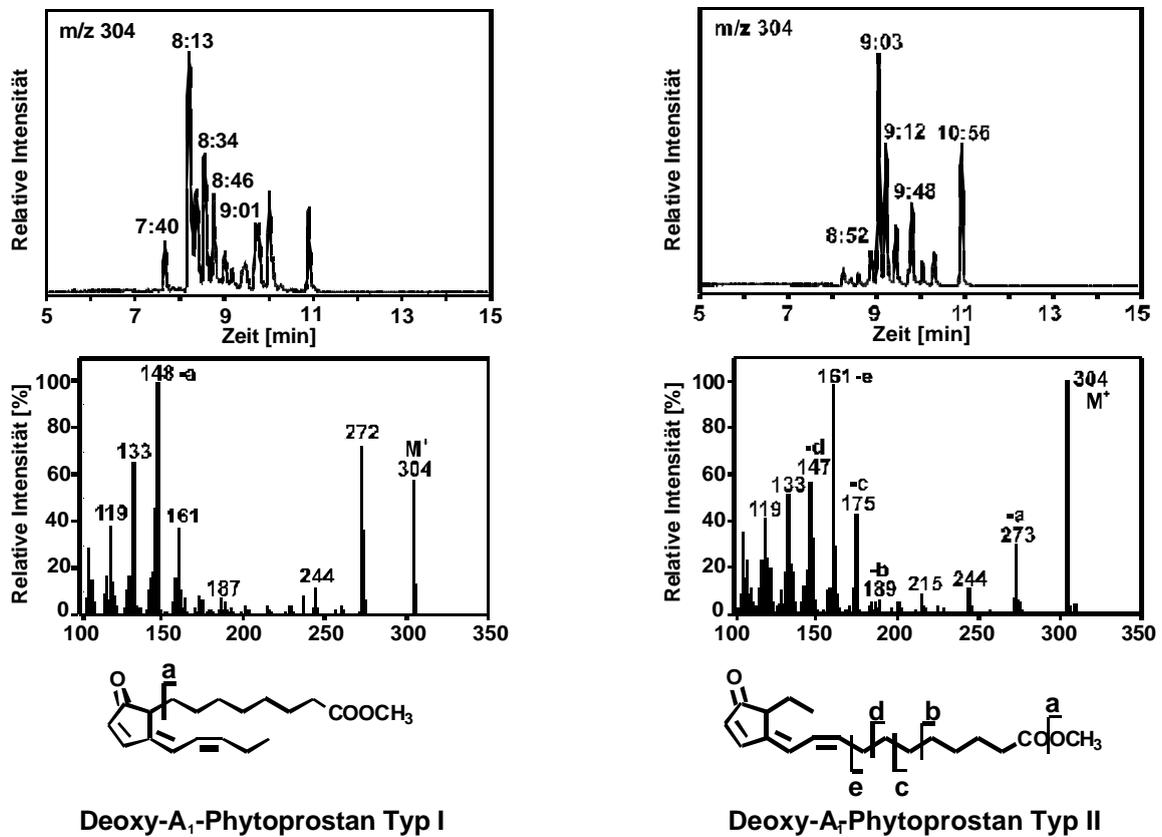
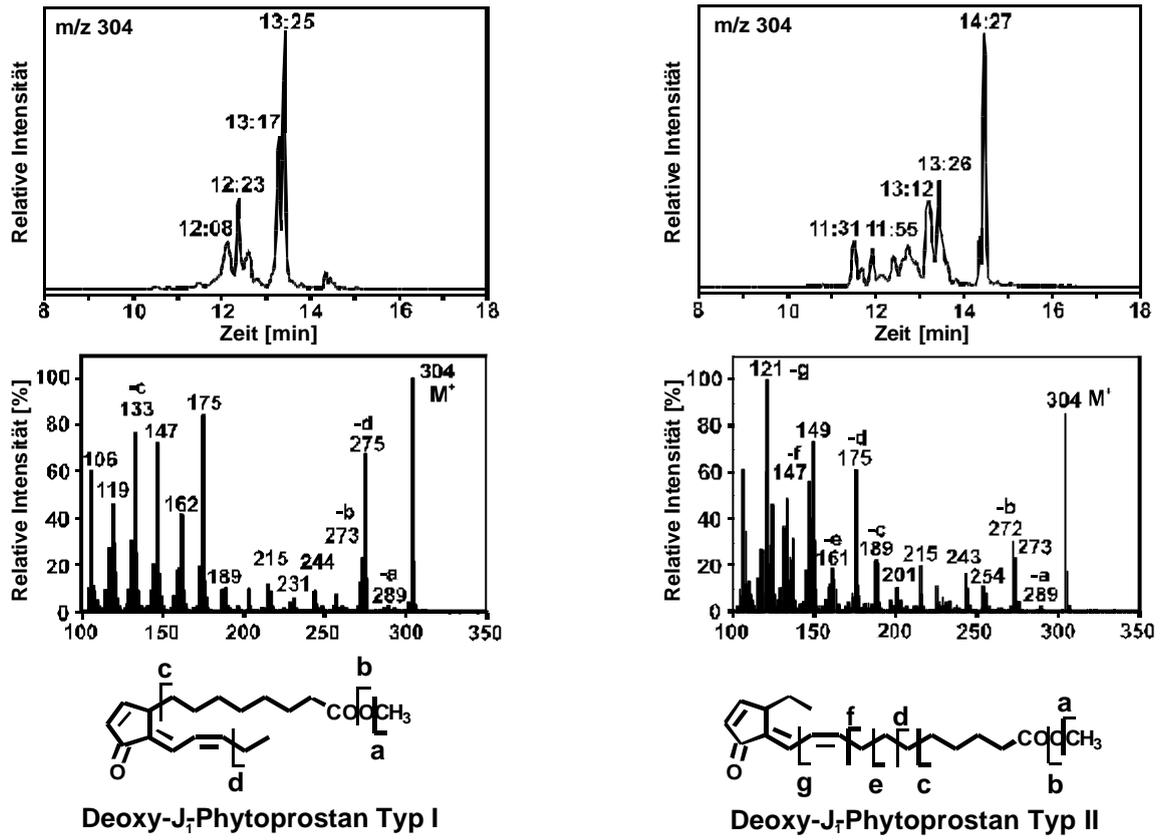


Abbildung IV.5: Erläuterung siehe nächste Seite.

IV. ERGEBNISSE

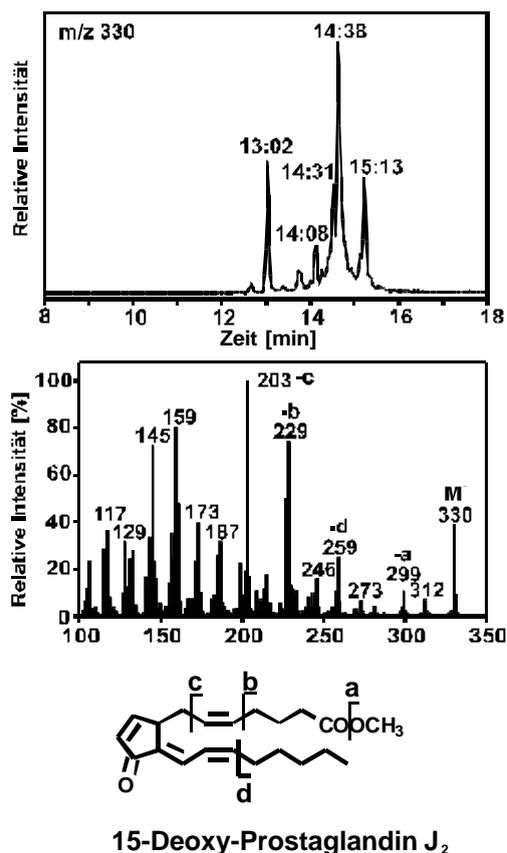


Abbildung IV.5: EI-MS-Chromatogramme mit Massenspektren der Methylester von dPPJ₁/A₁ Typ I und II und 15d-PGJ₂. In den Strukturformeln sind die jeweiligen Fragmente, soweit zuzuordnen, angegeben.

Bei allen Deoxy-J₁/A₁-Verbindungen war das Molekülion mit der Masse m/z 304 bzw. für den Standard 15d-PGJ₂ mit der Masse m/z 330 nachweisbar. Die erhaltenen Fragmente der untersuchten Verbindungen lieferten jedoch keine Hinweise bezüglich der Position der Carbonylfunktion am Cyclopentenonring, da vor allem unspezifische Fragmente, z.B. der Verlust einer Methylgruppe ($M^+ - 15$) oder einer Methoxygruppe ($M^+ - 31$) des Methylesters, generiert wurden. Eine interessante Fragmentierung ergab die Abspaltung der carboxylständigen Seitenkette von Typ I der Deoxy-A₁-Phytoprostane. Entgegen der erwarteten Abspaltung der Seitenkette mit der Masse 157 (C₉H₁₇O₂) unmittelbar am Cyclopentenonring, was ein verbleibendes Fragment mit m/z 147 ergeben müsste, konnte ein Fragment mit einer um eine Einheit erhöhten Masse nachgewiesen werden (m/z 148). Die Ursache hierfür ist eine sogenannte McLafferty-Umlagerung (siehe auch IV.2.3). Dabei handelt es sich um eine in der Massenspektrometrie charakteristische Umlagerung, bei der ein γ -ständiges Wasserstoffatom auf die ungesättigte Carbonylfunktion übertragen wird und anschließend ein Bindungsbruch in β -Stellung eintritt. Das Ergebnis dieser Umlagerung

ist die Abspaltung einer einfach ungesättigten Verbindung, die um eine Masse erniedrigt ist. Der daraus resultierende Rest ist entsprechend um eine Masseneinheit erhöht, d.h. das Fragment besitzt die Masse m/z 148 anstelle der berechneten Masse m/z 147. Die so erhaltenen Fragmentierungsmuster ergaben zwar Hinweise auf diese Moleküle, waren aber noch kein eindeutiger Beweis für die Strukturen der postulierten Verbindungen.

Da aufgrund der Mesomeriestabilisierung der Moleküle das Molekülion $(M)^+$ deutlich nachweisbar war, konnten unter diesen Bedingungen auch hochauflösende Massenspektren von diesen Verbindungen erhalten werden (MS-Bedingungen siehe III.5), durch die eine exakte Aussage über die Elementarkomposition dieser Moleküle gemacht werden konnte. Die Bestimmung der exakten Masse von Molekülen und die dadurch durchführbare Berechnung ihrer Elementarkomposition ist möglich, da die Atomgewichte der Isotopen nicht ganzzahlig sind und sich somit für jedes Molekül die exakte Masse berechnen lässt. Die untersuchten Verbindungen ergaben eine Molekülmasse von $304,2039 \pm 5$ ppm, die mit der Elementarkomposition ($C_{19}H_{28}O_3$) der Methylester von dPPJ₁ und dPPA₁, jeweils Typ I und II, übereinstimmen.

IV.2.2 GC-MS-Analytik von dPPJ₁-Methoxim-Methylestern

Ein Aliquot der über HPLC aufgereinigten Verbindungen wurde zum Methoxim umgesetzt (siehe III.1.5), der Reaktionsansatz anschließend methyliert und durch Massenspektrometrie im EI-Modus analysiert (GC-Trennbedingungen siehe III.4.5b). In Abbildung IV.6 sind die Chromatogramme und die entsprechenden Massenspektren von dPPJ₁, Typ I und II, sowie des Dehydratisierungsproduktes von PGD₁ dargestellt.

IV. ERGEBNISSE

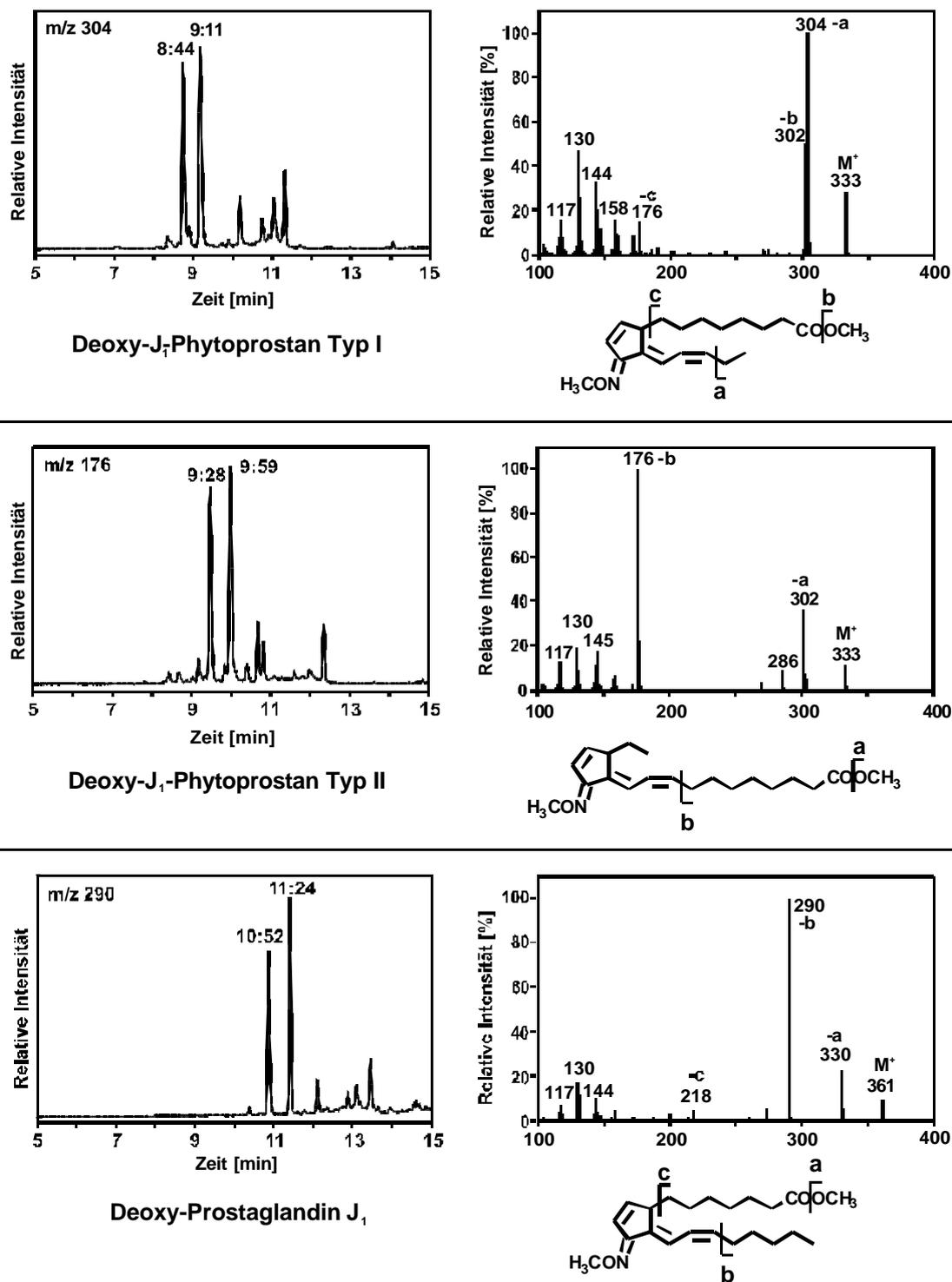


Abbildung IV.6: EI-MS-Chromatogramme mit Massenspektren der methoximierten Methylester von dPPJ₁ Typ I und II und 15d-PGJ₁. In den Strukturformeln sind die jeweiligen Fragmente, soweit zuzuordnen, angegeben.

Für jede Verbindung konnte ein charakteristisches Fragmentmuster erhalten werden, wobei die Molekülonen mit m/z 333 bzw. m/z 361 nachweisbar waren. Anhand dieser Derivatisierung konnte die in den Molekülen enthaltene funktionelle Gruppe, das Keton,

bestätigt werden. Die Umsetzung zum Methoxim führte zu einer Stabilisierung der Moleküle und somit zu einer verringerten Isomerisierung. Je Verbindung konnten nur noch zwei charakteristische Peaks nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die *syn*- und *anti*-Isomere des Methoxims, die bei der Derivatisierung gebildet werden können. Die Umsetzung zum Methoxim war nicht quantitativ, da auch noch nicht-derivatisierte Methylester detektiert werden konnten. Auch mit dieser Derivatisierung konnte die Position der Seitenketten bezüglich der Carbonylfunktion im Ringsystem der Verbindungen nicht endgültig geklärt werden.

IV.2.3 GC-MS-Analytik von hydrierten dPPJ₁/A₁-Methylestern

Zur eindeutigen Unterscheidung der Regioisomere sowie zur Bestimmung der Anzahl der in den Verbindungen enthaltenen Doppelbindungen wurden diese katalytisch hydriert (siehe III.2), zum Methylester umgesetzt und über GC-MS im positiven CI- bzw. EI-Modus analysiert (GC-Trennbedingungen siehe III.4.5b). Unter CI-Bedingungen ergab jedes Regioisomer der hydrierten Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostan-Methylester zwei Peaks mit einer Masse von m/z 311 (M+H)⁺ (nicht abgebildet), was die Anwesenheit von drei Doppelbindungen in den nicht-hydrierten Molekülen zeigt. Der Standard, 15d-PGJ₂, ergab ebenso zwei Peaks (m/z 339) mit einer Massenzunahme um acht Einheiten, entsprechend den im nicht-derivatisierten Molekül enthaltenen drei konjugierten Doppelbindungen sowie der isolierten Doppelbindung in der Carboxyl-Seitenkette.

Die carbonylständige Seitenkette von Cyclopentanon-Verbindungen kann während der Probenaufarbeitung und im Injektor des Gaschromatographen über Enol-Intermediate isomerisieren. Bei Jasmonsäure entsteht so bevorzugt das thermodynamisch stabilere *trans*-Isomer mit einem *cis-trans*-Verhältnis von 1 : 9 bezüglich der Stellung der beiden Seitenketten (Mueller und Brodschelm, 1994). Auch hier wurden zwei Peaks je Verbindung identifiziert, die ebenfalls ein Verhältnis von ca. 9 : 1 aufweisen, was darauf schließen lässt, dass der erste, größere Peak das *trans*- und der zweite, kleinere Peak das *cis*-Isomer des Cyclopentanons repräsentiert. Über die erhaltenen EI-Massenspektren der hydrierten Methylester von Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostanen und von 15d-PGJ₂ konnte zudem die Orientierung der Seitenketten bezüglich des Cyclopentanon-Ring-Systems eindeutig aufgeklärt werden. Jede Verbindung ergab zwei Peaks mit charakteristischen Fragmentierungsmustern (siehe Abbildung IV.7). Das Molekülion (M)⁺ war bei allen untersuchten Verbindungen nur noch mit geringer relativer Intensität nachweisbar.

IV. ERGEBNISSE

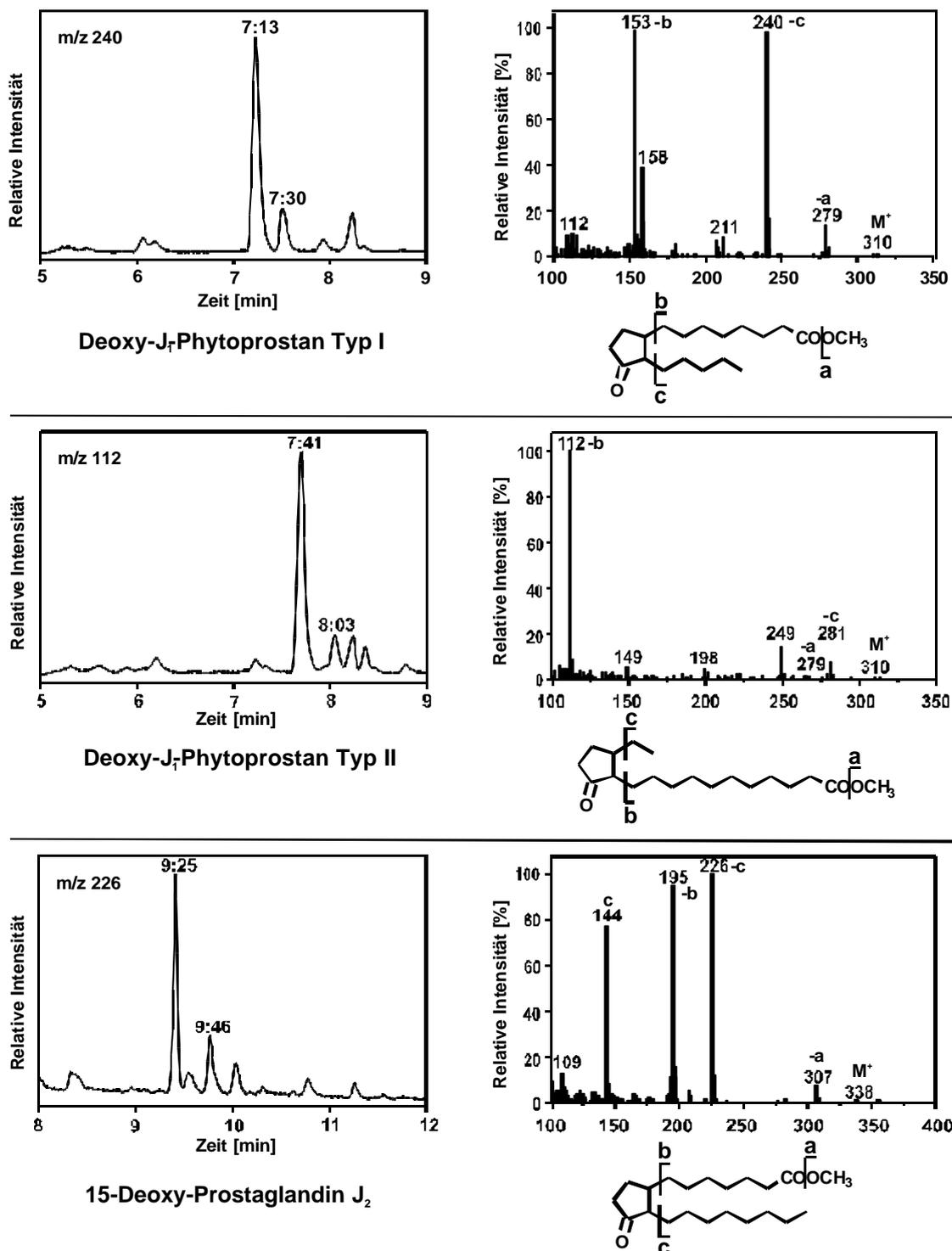


Abbildung IV.7: EI-MS-Chromatogramme mit Massenspektren der hydrierten Methylester von Deoxy-J₁-Phytoprostan Typ I und II sowie der Referenz 15-Deoxy-Prostaglandin J₂. In den Strukturformeln sind die jeweiligen Fragmente, soweit zuzuordnen, angegeben.

Das Typ I-Regioisomer von dPPJ₁ ergab drei Hauptfragmente: Das erste, weniger spezifische Fragment mit der Masse m/z 279 entsteht durch die Abspaltung der Methoxygruppe des Methylesters. Die beiden anderen Fragmente mit den Massen m/z

IV. ERGEBNISSE

240 und m/z 153 sind charakteristisch für dieses Regioisomer. Die Masse m/z 153 wird durch einen Bindungsbruch der oberen Seitenkette am Cyclopentanonring gebildet. Das Fragment mit der Masse m/z 240 ergibt sich aus der Abspaltung der carbonylständigen Seitenkette. Das erhaltene Fragment weicht um eine Masseneinheit von dem berechneten Fragment (m/z 239) ab, die Ursache hierfür ist wiederum die bereits oben erwähnte McLafferty-Umlagerung.

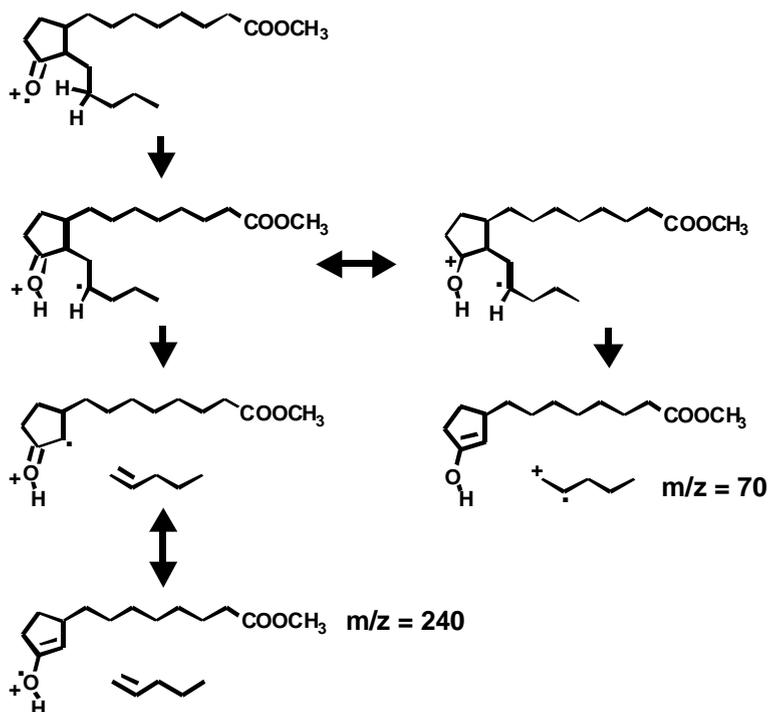


Abbildung IV.8: Schematische Darstellung der McLafferty-Umlagerung am Beispiel des hydrierten Methylesters von dPPJ₁-I. Dabei handelt es sich um die Wanderung eines g-ständigen Wasserstoffs zu einer ungesättigten Gruppe mit einer anschließenden b-Spaltung des Molekülions (M)⁺.

Dabei wird aufgrund der Umlagerung anstelle der aliphatischen Seitenkette (C₅H₁₁) mit der Masse m/z 71 eine einfach ungesättigte Seitenkette (C₅H₁₀) mit der Masse m/z 70 abgespalten (Abbildung IV.8). Ein Vorteil dieser Derivatisierungsmethode liegt darin, dass 12-Oxo-Phytodiensäure nach katalytischer Hydrierung der beiden Doppelbindungen und anschließender Methylierung identisch mit dem dPPJ₁-Regioisomer Typ I ist und somit eine ideale Referenzverbindung für die Strukturaufklärung der Deoxy-Phytoprostane darstellt (siehe Abbildung IV.9). Die GC-MS-Analyse so derivatisierter 12-OPDA liefert ebenfalls zwei Peaks mit identischen Retentionszeiten und dem gleichen Fragmentierungsmuster wie das Regioisomer Typ I (nicht abgebildet).

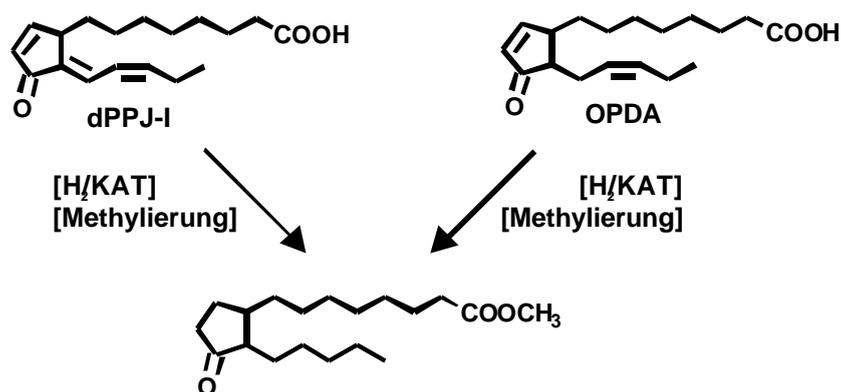


Abbildung IV.9: dPPJ₁ Typ I und 12-OPDA ergeben nach katalytischer Hydrierung und anschließender Methylierung identische Moleküle.

Das Typ II-Regioisomer von dPPJ₁ ergab neben dem unpezifischen Fragment mit der Masse m/z 279 (M^+-OCH_3) ebenfalls zwei für dieses Regioisomer charakteristische Fragmente mit den Massen m/z 112 und m/z 281. Die Bindungsspaltung der aliphatischen Seitenkette (C_2H_5) am Cyclopentanonring führt zu der Masse m/z 281. Die Abspaltung der carbonylständigen Seitenkette ergibt aufgrund der McLafferty-Umlagerung ein Fragment mit der Masse m/z 112, das wiederum um eine Masseneinheit von dem berechneten Fragment abweicht (m/z 111) (vergleiche Abbildung IV.8).

IV. ERGEBNISSE

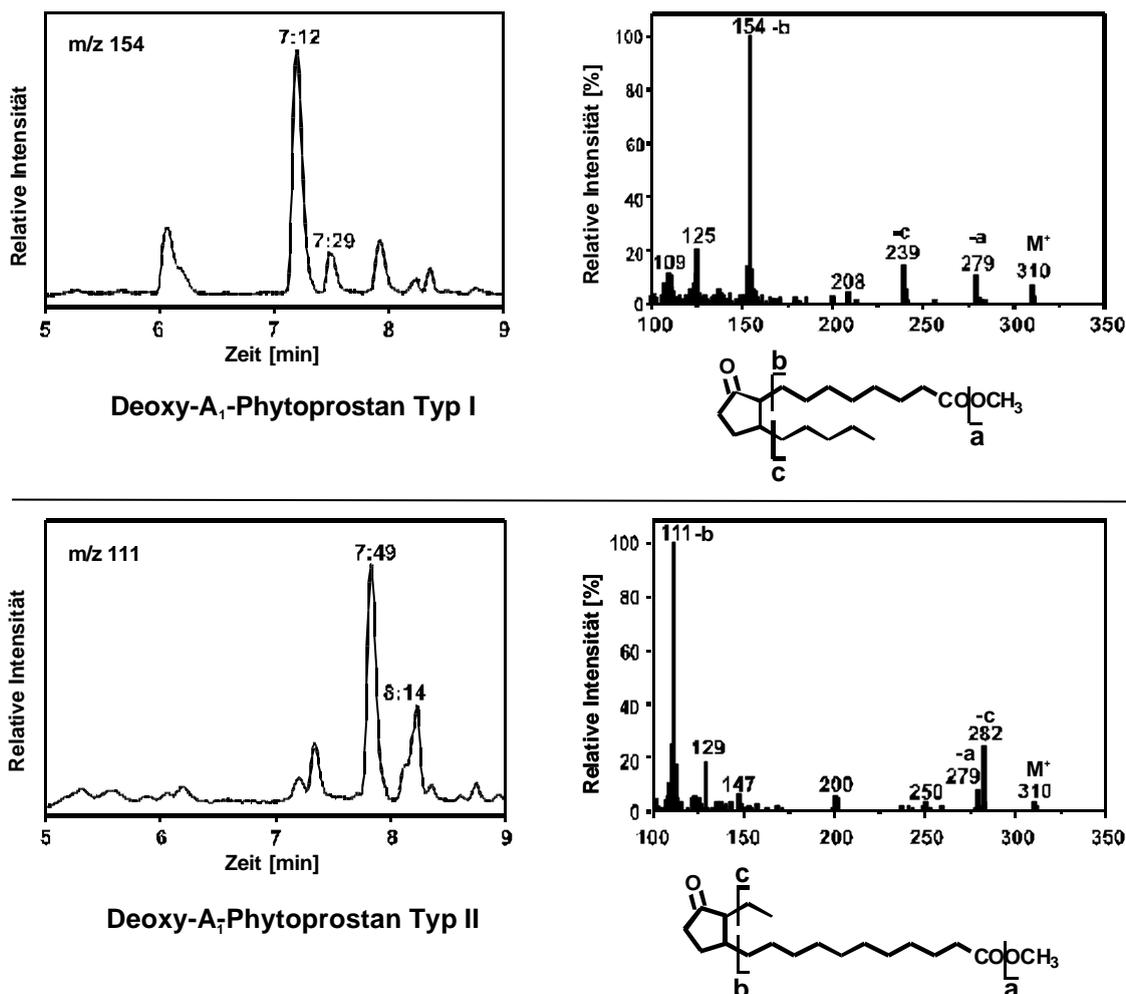


Abbildung IV.10: EI-MS-Chromatogramme mit Massenspektren der hydrierten Methyl-ester von Deoxy-A₁-Phytosterin Typ I und II. In den Strukturformeln sind die entsprechenden Fragmente, soweit zuzuordnen, angegeben.

Die McLafferty-Umlagerung und die damit verbundenen Fragmentierungsmuster lassen sich auch bei den ebenfalls analysierten dPPA₁-Regioisomeren sowie dem verwendeten Standard, 15d-PGJ₂ (siehe Abbildung IV.7), nachweisen. Die durch die Abspaltung der carbonylständigen Seitenkette generierten Fragmente weisen bei allen drei Verbindungen eine Zunahme um eine Masseneinheit auf. Das dPPA₁-Regioisomer vom Typ I zeigt charakteristische Fragmente mit m/z 239 ($M^+ - C_5H_{11}$) und m/z 154 ($M^+ - C_9H_{16}O_2$) anstelle von m/z 153 ($M^+ - C_9H_{17}O_2$) (siehe Abbildung IV.10). Eine um 1 Da erhöhte Fragmentmasse zeigt an, dass dieses Fragment durch Abspaltung der Seitenkette in C2-Position am Cyclopentanon-Ring entsteht. Wird die exakte Fragmentmasse bestimmt, erfolgte ein Bindungsbruch der Seitenkette in C3-Stellung. Das dPPA₁-Regioisomer Typ II zerfällt charakteristisch in Fragmente mit den Massen m/z 111 ($M^+ - C_{12}H_{23}O_2$) und m/z 282 ($M^+ - C_2H_4$) statt der berechneten Masse m/z 281 ($M^+ - C_2H_5$). Das als Standardverbindung eingesetzte 15d-PGJ₂ lieferte charak-

teristische Fragmente mit den Massen m/z 195 und m/z 226 ($M^+ - C_8H_{16}$) anstatt der Masse m/z 225 ($M^+ - C_8H_{17}$) (siehe Abbildung IV.7). Die McLafferty-Umlagerung konnte zudem durch die parallel aufgearbeitete Analyse von 15d-PGA₂ bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Durch die hochauflösende Massenspektrometrie und die erhaltenen Massenspektren, insbesondere durch die charakteristischen Fragmentierungsmuster der hydrierten Verbindungen, die auch den direkten Vergleich mit 12-Oxo-Phytodiensäure als Referenzverbindung ermöglichten, konnten alle Verbindungen eindeutig identifiziert werden. Eine zusätzliche Bestätigung der Strukturen und eine Aufklärung der relativen Konfiguration der Verbindungen durch Kernresonanzspektroskopie (NMR) scheiterte aufgrund der in jedem einzelnen HPLC-aufgereinigten Peak enthaltenen Isomerenmischung, die eine eindeutige Bestimmung verhinderte. Eine weitere Auftrennung der *cis-trans*-Isomere über RP-HPLC konnte aufgrund der Komplexität der Mischung nicht durchgeführt werden.

IV.2.4 GC-MS-Analytik von hydrierten dPPJ₁/A₁-PFB-Estern

Eine der empfindlichsten Methoden zum Nachweis von Fettsäuren und deren Derivaten ist die massenspektrometrische Detektion im negativen chemischen Ionisationsmodus (NICI). Negative Ionen werden in der Massenspektrometrie nur von Verbindungen generiert, die einen hohen Elektroneneinfangquerschnitt besitzen. Da dies für die hier zu vermessenden Verbindungen nicht zutrifft, wurden sie mit α -Brom-2,3,4,5-Pentafluortoluol (PFB-Br) verestert, eine Derivatisierungsmethode, die in der Prostaglandin-Chemie etabliert ist (Morrow *et al.*, 1990b). Der PFB-Ester wird nach der Aufnahme eines Elektrons in ein mesomeriestabilisiertes Pentafluorbenzylradikal und ein Carboxylat-Anion ($M-PFB$)⁻ gespalten (siehe Abbildung IV.11), das massenspektrometrisch nachgewiesen werden kann.

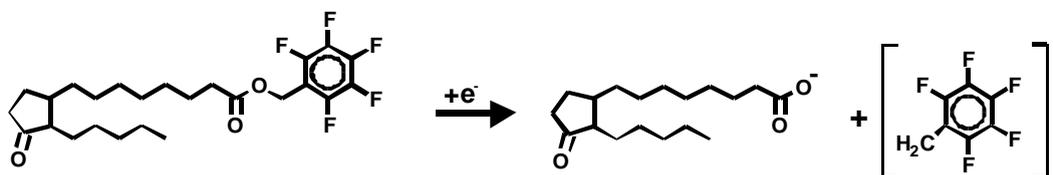


Abbildung IV.11: Spaltung eines PFB-Esters während der Ionisation im Massenspektrometer am Beispiel des hydrierten Methylesters von dPPJ₁-I.

In der Massenspektrometrie werden nur aus wenigen Molekülen negative Ionen generiert. Daraus ergibt sich eine höhere Nachweisempfindlichkeit und ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur Detektion positiver Ionen. Andererseits ist bei dieser Derivatisierungs- und Ionisationstechnik eine geringere Fragmentierung der entstandenen Säureanionen zu beobachten, was mit einem Verlust von Strukturinformationen verbunden ist.

Zum Nachweis der Cyclopentenon-Phytostane wurden die HPLC-gereinigten Verbindungen zuerst katalytisch hydriert (siehe III.2), um eine Isomerisierung zu verhindern, und anschließend zum PFB-Ester umgesetzt (siehe III.1.3). Vor der Aufarbeitung wurde zu jedem Ansatz 1 µg 15d-PGJ₂ als Retentionszeitstandard für die Gaschromatographie zugesetzt. Die katalytische Hydrierung der Verbindungen hatte zudem den Vorteil, dass 12-Oxo-Phytodiensäure wieder als authentische Referenzverbindung für dPPJ₁-I eingesetzt werden konnte. Nach der Umsetzung zum PFB-Ester musste der Reaktionsansatz zur Entfernung überschüssiger Reagenzien über eine Silica-SPE gereinigt werden. Dazu wurde das Lösungsmittel in einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 3 ml Hexan rekonstituiert. Eine SiOH-SPE-Säule (500 mg) wurde mit 6 ml Methanol und 6 ml Ether gewaschen und mit 6 ml Hexan equilibriert. Die Probe wurde auf die SPE-Säule aufgegeben und mit 6 ml Hexan/Ether (1:1, v/v) eluiert. Das überschüssige Lösungsmittel wurde mit einem Stickstoffstrom trockengeblasen und in Hexan aufgenommen. Ein Aliquot jeder Lösung wurde mittels GC-MS analysiert (Trennbedingungen siehe III.4.5c). Jede Verbindung lieferte wiederum zwei Peaks in einem Verhältnis von ca. 9 : 1 für die *trans*- bzw. *cis*-Isomere bei einer Masse (M-PFB)⁻ von *m/z* 295 bzw. *m/z* 323 für den eingesetzten Standard (siehe Abbildung IV.12).

IV. ERGEBNISSE

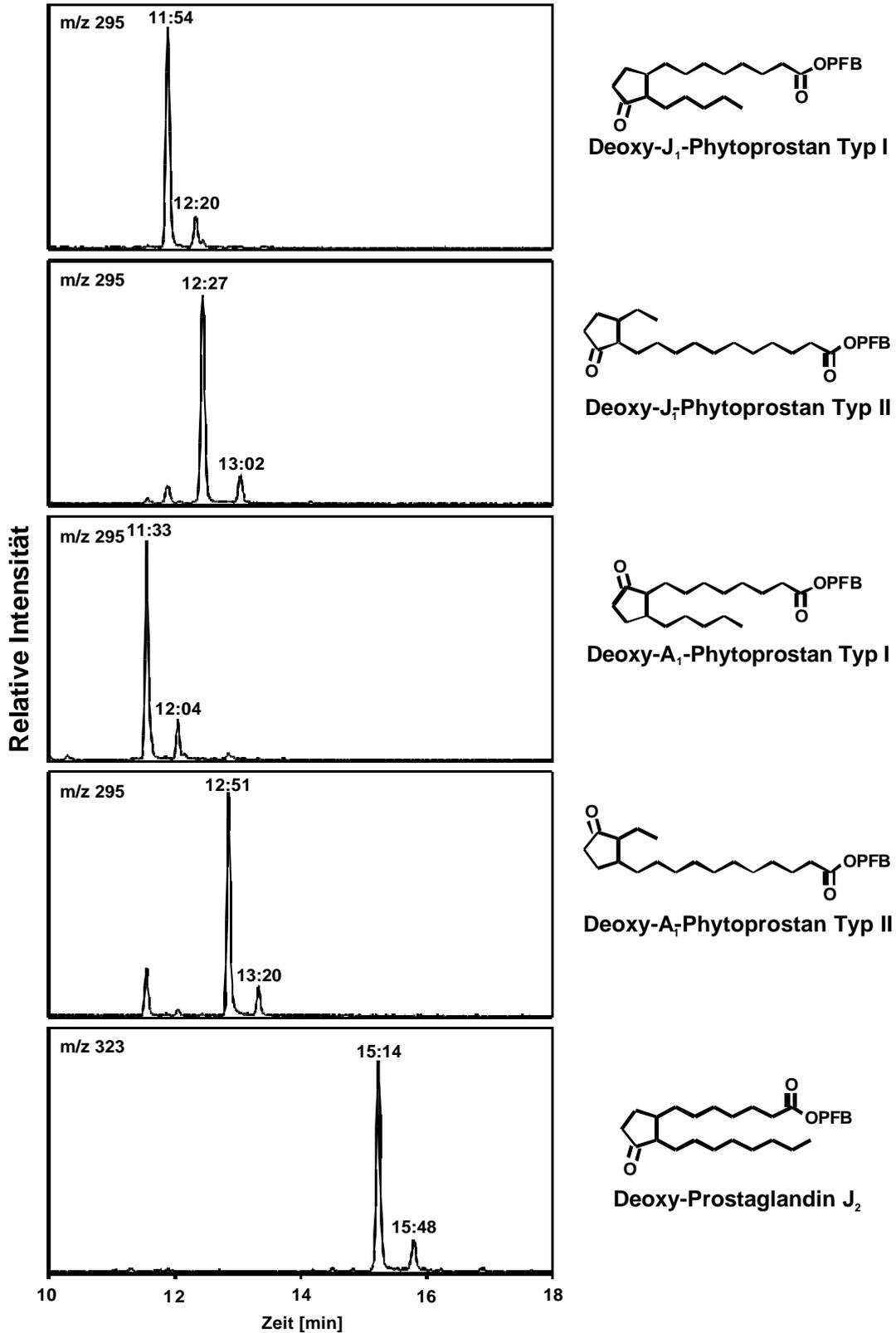


Abbildung IV.12: NICI-MS-Chromatogramme von katalytisch hydrierten dPPJ₁- und dPPA₁-PFB-Estern, jeweils Typ I und II, sowie des hydrierten 15d-PGJ₂-PFB-Ester. Es wurden nur die Molekülanionen detektiert, eine Fragmentierung konnte nicht beobachtet werden.

Eine weitere Fragmentierung der Molekülanionen konnte nicht beobachtet werden. Die parallel zu diesen Proben als Referenz aufgearbeitete 12-Oxo-Phytodiensäure lieferte ein im Vergleich zu dPPJ₁ Typ I identisches Chromatogramm und Massenspektrum (nicht abgebildet).

IV.3 Quantifizierung von Deoxy-J₁-Phytoprostanen

Zur Quantifizierung der durch die Partialsynthese und die anschließende vollständige Dehydratisierung hergestellten Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostane konnte 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ als käuflich erwerbbarer Standard eingesetzt werden. Ein Aliquot des über Silica-Festphasenextraktion gereinigten Ansatzes (siehe IV.1.10) wurde mit 5 µg 15d-PGJ₂ als internem Standard versetzt. Das organische Lösungsmittel wurde in einem Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 100 µl Acetonitril aufgenommen und über Reversed-Phase-HPLC analysiert. Die HPLC-Auftrennung in die einzelnen Regioisomere der Deoxy-Phytoprostane wurde unter den in III.4.4.3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mit einem Photo-Dioden-Array-Detektor anhand ihres UV-Spektrums (siehe Abbildung IV.13).

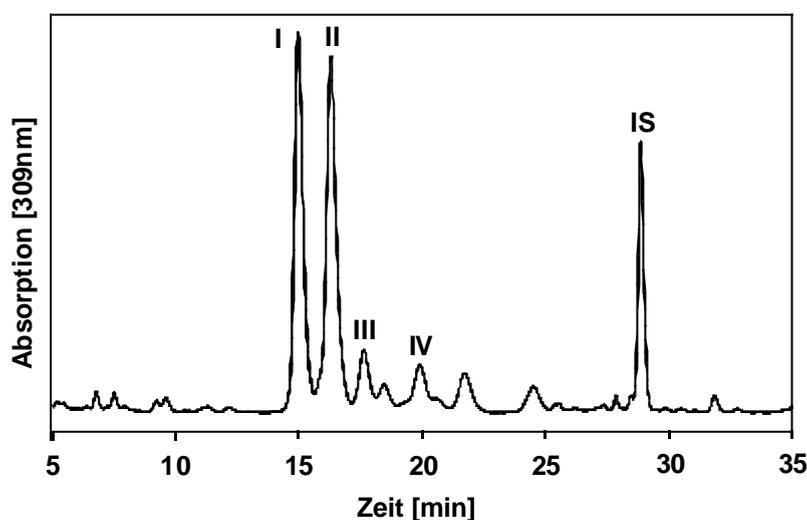


Abbildung IV.13: HPLC-Quantifizierung von dPPJ₁-I (I), dPPJ₁-II (II), dPPA₁-I (III) und dPPA₁-II (IV) gegen 15d-PGJ₂ (IS) als internem Standard bei 309 nm.

Zur Quantifizierung wurden die entsprechenden Peaks in ihrem Absorptionsmaximum bei 309 nm integriert. Da die Deoxy-J₁-Phytoprostane das gleiche chromophore System aufweisen wie der verwendete Standard, wurde der Berechnung des Gehaltes der molare Extinktionskoeffizient von 15d-PGJ₂ ($\epsilon = 12000$) zugrunde gelegt. Die Bestimmung der Deoxy-A₁-Phytoprostane, die als Nebenprodukt bei der Synthese

gebildet wurden, erfolgte nur näherungsweise, da diese Verbindungen abweichende UV-Spektren mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima besitzen. Die Analyse ergab eine Isomerenmischung von dPPJ₁ zu dPPA₁ in einem Verhältnis von ca. 5 : 1, die gesamte Ausbeute der Partialsynthese nach Aufarbeitung lag bei 1,18 mg (4,1 µmol) der Isomerenmischung von dPPJ₁, entsprechend 13,4% bezogen auf das Ausgangsmaterial der Partialsynthese, den F₁-Phytosteranen.

IV.4 Gewinnung von PPD₁ und dPPJ₁ durch Autoxidation von α -Linolensäure

Eine präparative Gewinnung größerer Mengen an D₁-Phytosteranen bzw. deren Dehydratisierungsprodukten, Deoxy-J₁-Phytosterane, über die oben dargestellte Partialsynthese war aufgrund der sehr aufwendigen Durchführung und der geringen Ausbeute der Reaktionsfolge nur schwer durchführbar. Zudem ist die Gewinnung gereinigter F₁-Phytosterane, die die Ausgangsverbindungen der Partialsynthese darstellen, langwierig. Durch die partialsynthetisch hergestellten Deoxy-J₁-Phytosterane konnten aber ausreichende analytische Daten zum Nachweis dieser Verbindungen erhalten werden, um eine *in vitro*-Herstellung und Isolierung dieser Verbindungen durch Autoxidation von α -Linolensäure zu untersuchen.

IV.4.1 Autoxidation von α -Linolensäure zur Herstellung von PPD₁

F₁-Phytosterane werden bei der Autoxidation von α -Linolensäure bevorzugt in aprotischen Lösungsmitteln, wie Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff, gebildet (Imbusch, 2001), während die Ausbeute an E₁-Phytosteranen, die sich von PPD₁ nur in der entgegengesetzten Position der ringständigen Carbonyl- und Hydroxy-Gruppe unterscheiden, bei der *in vitro*-Autoxidation in protischen Lösungsmitteln, z.B. Methanol-Wasser-Mischungen, deutlich höher war (Parchmann, 1999). Die Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Stabilität der gemeinsamen Vorstufe aller Phytosterane, den Bicyclo-Endoperoxid-Phytosteranen G₁, in verschiedenen Lösungsmitteln. In wässrigem Milieu kann sich PPG₁ leicht in D- und E-Ring-Verbindungen umlagern, für die analoge Prostaglandin-Verbindung PGG₂ konnte in wässriger Umgebung eine Halbwertszeit von weniger als 5 min nachgewiesen werden (Hamberg *et al.*, 1974). In aprotischen Lösungsmitteln scheint PPG₁ stabiler zu sein, so dass eine längere Zeit für die Bildung von F₁-Phytosteranen durch Reduktion der Bicyclo-Endoperoxide zur Verfügung steht.

Zur *in vitro*-Herstellung von Phytosteranen wurden 10 g α -Linolensäure mit 40 ml Methanol/Wasser (1:1, v/v) versetzt und unter permanenter Luftzufuhr bei

Raumtemperatur gerührt. Nach 7 Tagen wurde die Autoxidation durch die Zugabe von 10 g Triphenylphosphin (TPP) und 1 g Butylhydroxytoluol (BHT, als Radikalfänger) in 50 ml Chloroform gestoppt. Der Ansatz wurde zur vollständigen Reduktion noch vorhandener Hydroperoxide bzw. Endoperoxide durch TPP 15 min lang gerührt und anschließend in einen Scheidetrichter überführt. Die Mischung, die neben zahlreichen weiteren Oxidationsprodukten auch die durch Endoperoxid-Umlagerung gebildeten D- und E-Ringverbindungen sowie die durch die Endoperoxid-Reduktion entstandenen F-Ring-Verbindungen enthielt, wurde mit 200 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung versetzt, mit 1 M Citronensäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und dreimal gegen 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das überschüssige Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

IV.4.2 Präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von PPD₁

Die Aufreinigung des Autoxidationsansatzes erfolgte durch präparative Säulenchromatographie (siehe III.4.3). Dazu wurden 10 g Silicagel 60 (0,062 - 0,2 mm, Merck) mit Methanol in eine Glassäule mit 1,5 cm Innendurchmesser überführt. Das Kieselgel wurde nacheinander mit 100 ml Methanol sowie 100 ml Ethylacetat gewaschen und anschließend mit 100 ml Chloroform equilibriert. Ein Teil des Autoxidationsansatzes, entsprechend 2 g α -Linolensäure, wurde in einem Gesamtvolumen von 4 ml Chloroform auf die Säule aufgegeben und mit 50 ml Chloroform/Essigsäure (100:0,1, v/v) gewaschen. Die weitere Elution erfolgte mit 100 ml-Fractionen eines Lösungsmittelgemisches von Hexan/Ethylacetat/Essigsäure, beginnend bei einem Mischungsverhältnis von 90:10:0,1, wobei in jeder darauffolgenden Fraktion der Ethylacetat-Anteil um 10 Teile bis zu einem Mischungsverhältnis von 10:90:0,1 erhöht wurde. Jede einzelne Fraktion wurde zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt, in Ethylacetat aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Ein Aliquot jeder Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf die Anwesenheit von D₁-Phytosteranen überprüft, als Referenz wurden parallel Prostaglandin D₂ und E₂ aufgetragen. Die DC-Platte wurde im Laufmittelsystem 2 entwickelt und mit Kupferacetat-Sprühreagenz unter Erwärmung detektiert (siehe III.4.1). Die Chloroform/Essigsäure-Waschphase sowie die ersten drei Elutionsphasen zeigten keine Färbung im Bereich der Referenzen. In den folgenden Fraktion ab einem Lösungsmittelverhältnis von Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (60:40:0,1, v/v) bis zu Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (20:80:0,1, v/v) war eine gelb-braune Verfärbung im Bereich der Prostaglandine D₂ und E₂ nachweisbar, wobei keine scharfen Banden zu erkennen waren.

Zur Überprüfung auf D₁-Phytoprostane wurde ein Aliquot aller Fraktionen durch die Zugabe von Trifluoressigsäure dehydratisiert (siehe IV.1.9) und anschließend über HPLC analysiert (Trennbedingungen und Detektion siehe III.4.4.1). Die ersten drei Fraktionen enthielten keine Cyclopentenon-Derivate, in der Fraktion mit Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (60:40:0,1, v/v) wurden nur Spuren an dPPJ₁ nachgewiesen, während der Großteil der Deoxy-J₁-Phytoprostane in den darauffolgenden drei Fraktionen enthalten war. Eine Quantifizierung der erhaltenen Deoxy-J₁-Phytoprostane aus der Rohpräparation war nicht möglich. In allen Phytoprostan D₁-haltigen Fraktionen waren auch die von ihrem chromatographischen Verhalten her sehr ähnlichen E₁-Phytoprostane nachweisbar.

Zur Vereinfachung der Aufarbeitung wurden die Elutionsbedingungen der Silicasäule später modifiziert. Nach der Probenaufgabe konnten lipophilere Verbindungen, z.B. nicht oxidierte Fettsäuren mit 50 ml Chloroform/Essigsäure (100:0,1, v/v) und 50 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (70:30:0,1, v/v) von der Säule gewaschen werden und darauf die Phytoprostan D₁/E₁-Isomerenmischung mit 150 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (30:70:0,1, v/v) eluiert werden. Die so erhaltene Präparation wurde an einem Rotationsverdampfer eingengt, in Ethylacetat aufgenommen und bei -20°C gelagert.

IV.4.3 HPLC-Isolierung von D₁-Phytoprostanen

Ein Teil der durch präparative Säulenchromatographie vorgereinigten Phytoprostan D₁/E₁-Isomerenmischung wurde vor der HPLC-Auftrennung nochmals über eine SPE-Säule gereinigt. Dazu wurde eine Silica-SPE-Säule mit 6 ml Methanol sowie 6 ml Ether gewaschen und mit 6 ml Chloroform equilibriert. Die zuvor trockengeblasene Probe wurde in 500 µl Chloroform aufgenommen und auf die Säule aufgegeben. Anschließend wurde die SPE-Säule mit 6 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (90:10:1, v/v) und 6 ml Hexan/Ether/Essigsäure (50:50:1, v/v) zur Entfernung apolarer Verunreinigungen gewaschen und die PPD₁/E₁-Isomerenmischung mit 9 ml Ether/Aceton/Essigsäure (70:30:1, v/v) von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde in einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde über semipräparative RP-HPLC bei 204 nm analysiert (siehe Abbildung IV.14, Trennbedingungen siehe III.4.4.4).

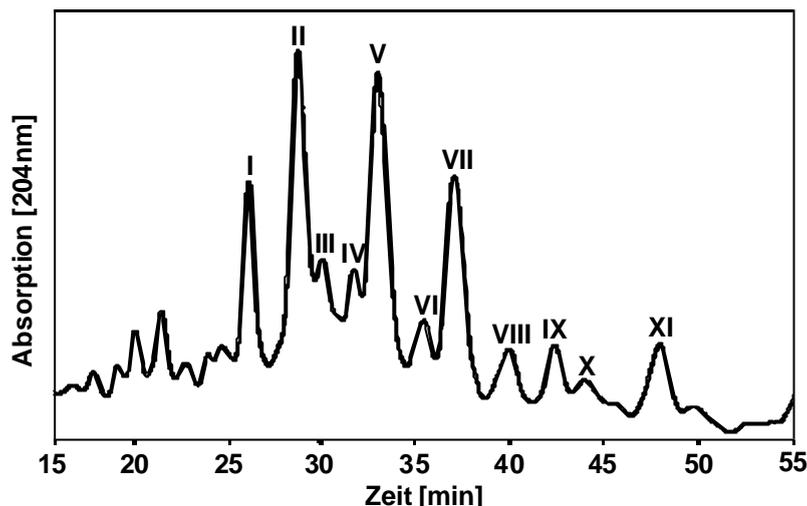


Abbildung IV.14: HPLC-Chromatogramm der durch Autoxidation gewonnenen, vorgereinigten PPD₁/E₁-Isomerenmischung. Die Detektion erfolgte bei 204 nm.

Die im Chromatogramm markierten Peaks wurden aufgefangen, mit Wasser verdünnt und dreimal gegen 3 ml Ether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel in einem Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und bei -20°C gelagert.

Da keine Referenzverbindung zur Identifizierung der D₁-Phytosterane verfügbar war, wurde ein Aliquot jedes isolierten Peaks durch sauer katalysierte Dehydratisierung in die Deoxy-J₁/A₁-Phytosterane überführt (siehe IV.1.9), für die ausreichende chromatographische und massenspektrometrische Daten verfügbar waren. Die Proben wurden anschließend katalytisch hydriert (siehe III.2) und zum PFB-Ester umgesetzt (siehe III.1.3). Nach der Abtrennung überschüssiger Reagenzien über Festphasenextraktion (siehe IV.2.4) wurde jede Probe mittels NICI-GC-MS analysiert (siehe III.4.5c).

Mit Ausnahme von Peak VII enthielten alle untersuchten Proben Mischungen von Deoxy-J₁/A₁-Phytosteran-Regioisomeren bzw. nur die aus E₁-Phytosteranen entstandenen dPPA₁ (siehe Tabelle IV.1). Lediglich in Peak VII waren ausschließlich die aus PPD₁ gebildeten Deoxy-J₁-Phytosteran-Regioisomere nachweisbar.

IV. ERGEBNISSE

Peak	Retentionszeit [min]	PPD ₁ -I	PPD ₁ -II	PPE ₁ -I	PPE ₁ -II
		- dPPJ ₁ -I	- dPPJ ₁ -II	- dPPA ₁ -I	- dPPA ₁ -II
I	25,4			x	
II	28,0	x	x	x	x
III	29,4	x	(x)	x	
IV	31,1	(x)	(x)	x	
V	32,3			x	x
VI	34,8				x
VII	36,4	x	x		
VIII	39,4	(x)		(x)	
IX	41,9			x	
X	43,5				
XI	47,6			x	x

Tabelle IV.1: Nachgewiesene Abbauprodukte der isolierten PPD₁/E₁-Fraktionen nach sauer katalysierter Dehydratisierung und GC-NICI-MS-Bestimmung. (x = Hauptbestandteile; (x) = nur in Spuren enthalten).

Eine weitere Auftrennung der Mischung war unter den gewählten Bedingungen und aufgrund der hohen Anzahl an Stereoisomeren, theoretisch je 32 Isomere für die D₁- und E₁-Phytosterane, nicht durchführbar. Über Peak VII, der beide Regioisomere von PPD₁ enthielt, war jedoch eine weitere massenspektrometrische Charakterisierung der D₁-Phytosterane möglich.

IV.4.4 GC-MS-Analytik von D₁-Phytosteranen

Zur Bestimmung der Phytosteran D₁-Regioisomere mittels EI-GC-MS wurde ein Aliquot der HPLC-Isolierung von Peak VII zur Stabilisierung der Verbindungen bzw. zur Vermeidung einer Dehydratisierung während der Aufarbeitung bzw. der GC-MS-Analyse zum Methoxim umgesetzt (siehe III.1.5). Der Ansatz wurde anschließend mit Diazomethan methyliert (siehe III.1.2) und die noch vorhandenen Hydroxygruppen mit BSTFA zum Trimethylsilylether derivatisiert (siehe III.1.4). Ein Teil dieses Ansatzes wurde über GC-MS im EI-Modus analysiert (Trennbedingungen siehe III.4.5d).

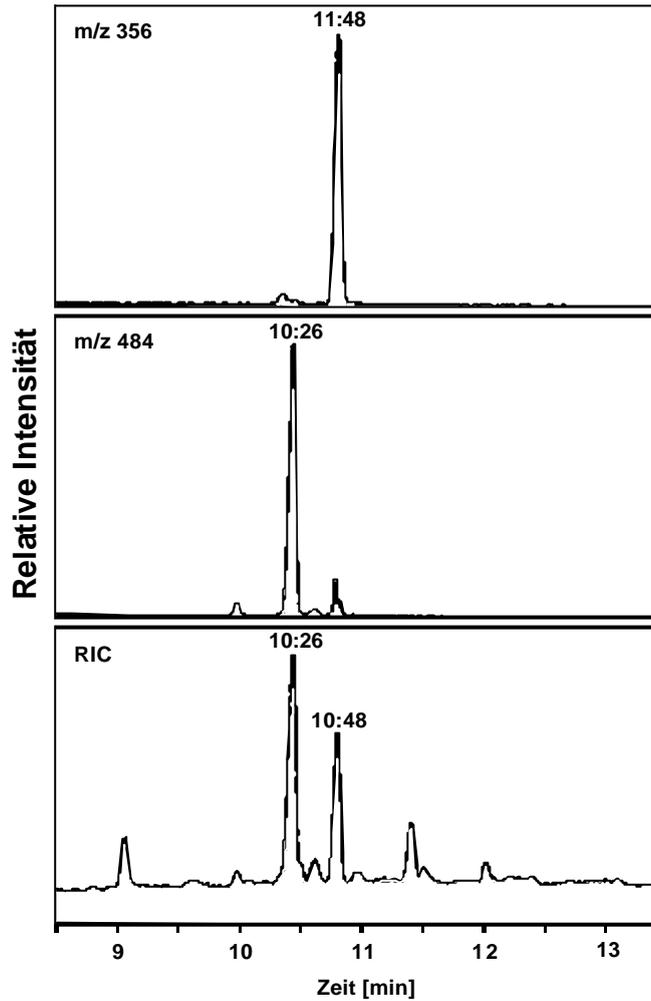


Abbildung IV.15: EI-MS-Chromatogramme der silylierten und zum Methoxim umgesetzten PPD₁-Methylester. Die obere Massenspur entspricht dem Hauptfragment des Regioisomers Typ I, die untere dem Typ II-Regioisomer.

Im RIC-Chromatogramm waren zwei Peaks nachweisbar, die beide das für die methoximierten O-TMS-Methylester berechnete Molekülion mit der Masse m/z 513 enthielten (siehe Abbildung IV.15). Die dazugehörigen Massenspektren konnten den beiden Regioisomeren von PPD₁ zugeordnet werden (siehe Abbildung IV.16) und unterschieden sich eindeutig von den bereits bekannten Massenspektren der Phytoprostan E₁-Regioisomere (Parchmann, 1999), die die gleiche Molekülmasse wie die untersuchten D₁-Phytoprostane aufweisen.

IV. ERGEBNISSE

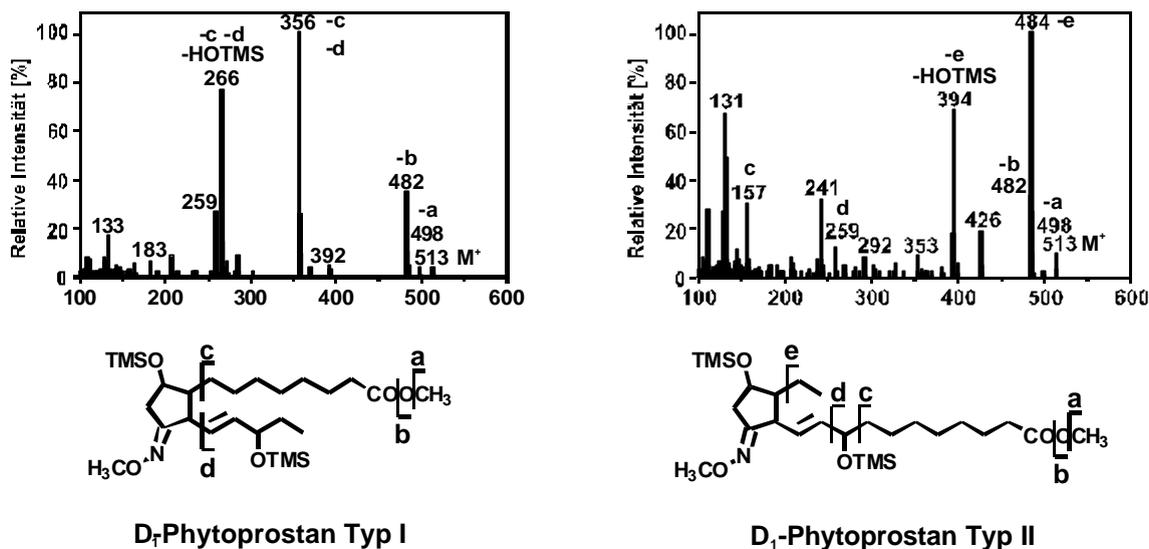


Abbildung IV.16: EI-Massenspektren der zum Methoxim umgesetzten, silylierten Methylester von PPD₁. In den Strukturformeln sind die entsprechenden Fragmente, soweit zuzuordnen, angegeben.

Die über semipräparative RP-HPLC gereinigten D₁-Phytoprostane reichten für eine massenspektrometrische Charakterisierung aus. Eine präparative Gewinnung dieser Verbindungen bzw. die Isolierung einzelner Isomere im mg-Maßstab, die für Untersuchungen einer möglichen biologischen Aktivität von D₁-Phytoprostanen notwendig gewesen wären, war aufgrund der komplexen Mischung und der Instabilität dieser Verbindungen nicht durchführbar. Die Deoxy-J₁-Phytoprostane, die durch Abspaltung von zwei Molekülen Wasser aus den D-Ring-Verbindungen entstehen können, bestehen theoretisch aus vier geometrischen Isomeren je Regioisomer, so dass eine präparative Isolierung einzelner Regioisomere im mg-Maßstab möglich war.

IV.4.5 Herstellung und präparative Säulenchromatographie zur Reinigung von dPPJ₁

Die säulenchromatographisch vorgereinigte D₁/E₁-Phytoprostan-Mischung wurde durch sauer katalysierte Dehydratisierung in die Deoxy-J₁-Phytoprostane überführt. Dazu wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt (siehe IV.1.9). Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 40°C im Wasserbad wurde die Säure in einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 2 ml Chloroform aufgenommen.

Die Aufreinigung des Dehydratisierungsansatzes erfolgte über präparative Säulenchromatographie (siehe III.4.3). Dazu wurden 10 g Silicagel 60 (0,062 - 0,2 mm, Merck) mit Methanol in eine Glassäule mit 1,5 cm Innendurchmesser überführt. Das Kieselgel

wurde nacheinander mit 100 ml Methanol sowie 100 ml Ethylacetat gewaschen und anschließend mit 100 ml Chloroform equilibriert. Der Reaktionsansatz wurde auf die Säule aufgegeben, mit 50 ml Hexan und 50 ml einer Mischung von Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (90:10:0,1, v/v) zur Entfernung apolarer Reaktionsprodukte gewaschen. Die Deoxy-J₁-Phytoprostane konnten anschließend mit 75 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (70:30:0,1, v/v) von der Säule eluiert werden. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und bis zur weiteren HPLC-Auftrennung bei -20°C gelagert.

IV.4.6 Präparative HPLC-Isolierung von Deoxy-J₁-Phytoprostanen

Die Auftrennung von dPPJ₁ in die beiden Regioisomeren erfolgte durch präparative HPLC. Dazu wurde ein Teil des gereinigten Dehydratisierungsansatz, entsprechend einem Gramm α -Linolensäure, in 1 ml Methanol aufgenommen. Der Ansatz wurde über HPLC unter den in III.4.4.5 angegebenen Bedingungen aufgetrennt (siehe Abbildung IV.17).

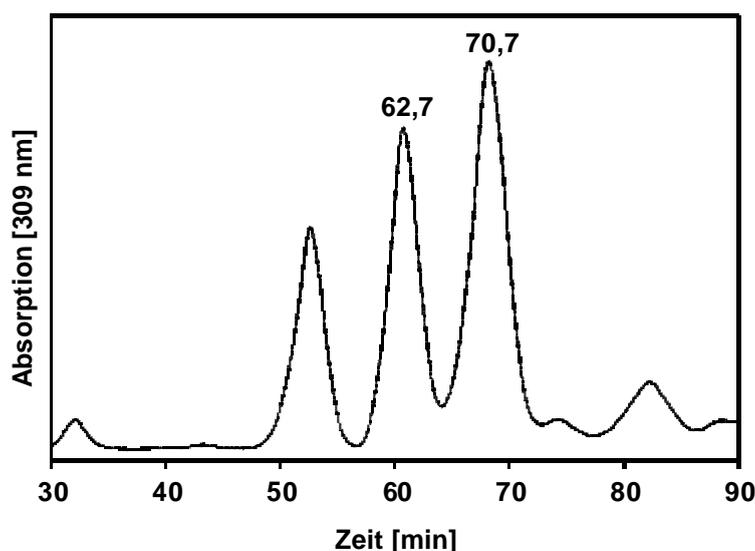


Abbildung IV.17: Präparativer HPLC-Lauf zur Isolierung von dPPJ₁. Der Peak mit einer Retentionszeit von 62,7 min entspricht dem Typ I Regioisomer, der Peak mit der Retentionszeit von 70,7 min dem Typ II.

Das HPLC-Chromatogramm zeigt drei Peaks bei einer Absorption von 309 nm, wobei der erste Peak keine Deoxy-J₁-Phytoprostane enthielt. Die beiden dPPJ₁-Regioisomere, Typ I mit einer Retentionszeit von 62,7 min und Typ II mit einer Retentionszeit von 70,7 min, konnten voneinander getrennt und aufgefangen werden. Nach einer Reduzierung des organischen Lösungsmittelanteils mit einem

Rotationsvakuumkonzentrator wurde die verbliebene Lösung mit Wasser verdünnt und dreimal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Eine direkte Quantifizierung des Dehydratisierungsansatzes (siehe IV.4.5) durch analytische HPLC war nicht möglich, da im Bereich der Retentionszeit des verwendeten Standards 15d-PGJ₂ eine große Menge lipophiler Verunreinigungen von der HPLC-Säule eluierte. Ein Aliquot der im präparativen Maßstab gereinigten Deoxy-J₁-Phytprostane konnte jedoch zur Überprüfung der Reinheit und zur Quantifizierung der in dem Ansatz enthaltenen Menge gegen 5 µg 15-Deoxy-Prostaglandin J₂-Standard über HPLC analysiert werden (Trennbedingungen siehe III.4.4.3). Über die erhaltenen Chromatogramme konnte näherungsweise auf die in den Autoxidationsansätzen gebildete dPPJ₁-Menge geschlossen werden. Die Berechnung ergab eine Gesamtausbeute von bis zu 210 µg/g eingesetzter α-Linolensäure (entsprechend 0,021%) für das Typ I-Regioisomer und bis zu 290 µg für Typ II (entsprechend 0,029%).

Die präparative HPLC-Auftrennung erwies sich als effektiv, war aufgrund der hohen Flussrate und dem damit verbundenen Lösungsmittelverbrauch aber sehr kostenintensiv, so dass eine andere Methode zur Auftrennung der Deoxy-J₁-Phytprostane über ein Lobar-Mitteldruckchromatographie-System entwickelt wurde, das mit deutlich geringeren Flussraten eine vergleichbare Auftrennung und Isolierung der Verbindungen erlaubte (siehe III.4.4.5).

Über dieses System war es möglich, dPPJ₁-Regioisomere im mg-Maßstab zu isolieren, um diese Verbindungen auf eine mögliche biologische Aktivität zu testen bzw. Methoden zum Nachweis dieser Phytprostane in pflanzlichen Geweben zu entwickeln. Zuerst wurde untersucht, ob und in welchen Mengen D₁-Phytprostane bzw. deren Abbauprodukte, die Deoxy-J₁-Phytprostane, in pflanzlichen Geweben durch Autoxidation von α-Linolensäure gebildet werden können.

IV.5 Nachweis von PPD₁ und dPPJ₁ in pflanzlichem Material

V.5.1 Nachweis von PPD₁ und dPPJ₁ mittels GC-MS

Die empfindlichsten Nachweismethoden zur Quantifizierung von Prostanoiden in biologischen Systemen basieren auf der Detektion dieser Verbindungen im negativen chemischen Ionisationsmodus nach ihrer Derivatisierung zum Methoxim, Trimethylsilyl-Veretherung und Überführung in die entsprechenden Pentafluorbenzylester. Auch alle

bisher bekannten Phytoprostane, z.B. PPF₁ oder PPE₁, wurden mit dieser Methode analysiert. 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ konnte jedoch noch nicht über GC-MS in Tieren nachgewiesen werden, da es vermutlich aufgrund der hohen Temperaturbelastung im GC leicht isomerisiert. Der bisher einzige Nachweis von 15d-PGJ₂ in tierischen Geweben gelang mit Hilfe von einem ELISA unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (Shibata *et al.*, 2002). Andere Ansätze zur Untersuchung von Cyclopentenon-Isoprostanen (A₂- und J₂-Isoprostane) mittels GC-MS ergaben bei verschiedenen Derivatisierungsansätzen aufgrund der großen Anzahl an Isomeren und ihrer geringen Temperaturstabilität zumeist eine Vielzahl schlecht aufgelöster, überlappender Peaks (Chen *et al.*, 1999), die eine Quantifizierung einzelner Isomere nur schwer ermöglichte.

Die zur Charakterisierung der Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostane verwendete GC-MS-Nachweismethode im negativen chemischen Ionisationsmodus nach katalytischer Hydrierung und PFB-Veresterung, die für jedes untersuchte Regioisomer im Chromatogramm zwei Peaks ergab (siehe IV.2.4), war für eine spurenanalytische Untersuchung in Pflanzenmaterial nicht geeignet, da aufgrund der Hydrierung eine Unterscheidung von dPPJ₁ Typ I und der enzymatisch in Pflanzen gebildeten 12-Oxo-Phytodiensäure nicht mehr möglich war. Zudem ergaben Analysen von pflanzlichem Material nach Aufarbeitung (siehe IV.5.4) eine große Menge an Verunreinigungen mit dem gleichen Masse/Ladungs-Verhältnis und mit vergleichbaren GC-Retentionszeiten, so dass die Cyclopentenon-Phytoprostane nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten.

Durch die Umsetzung der hydrierten Phytoprostane zum Methoxim mit einer Zunahme um 29 Masseneinheiten wurde versucht, die gesuchten Verbindungen in eine höhere Massenspur zu verschieben und damit selektiv von den Verunreinigungen zu trennen. Die Derivatisierung der Carbonylfunktion ergab jedoch zwei zusätzliche Peaks je Regioisomer bzw. des Standards, entsprechend den *syn*- und *anti*-Isomeren des gebildeten Methoxims (siehe Abbildung IV.18, Trennbedingungen siehe IV.4.5e).

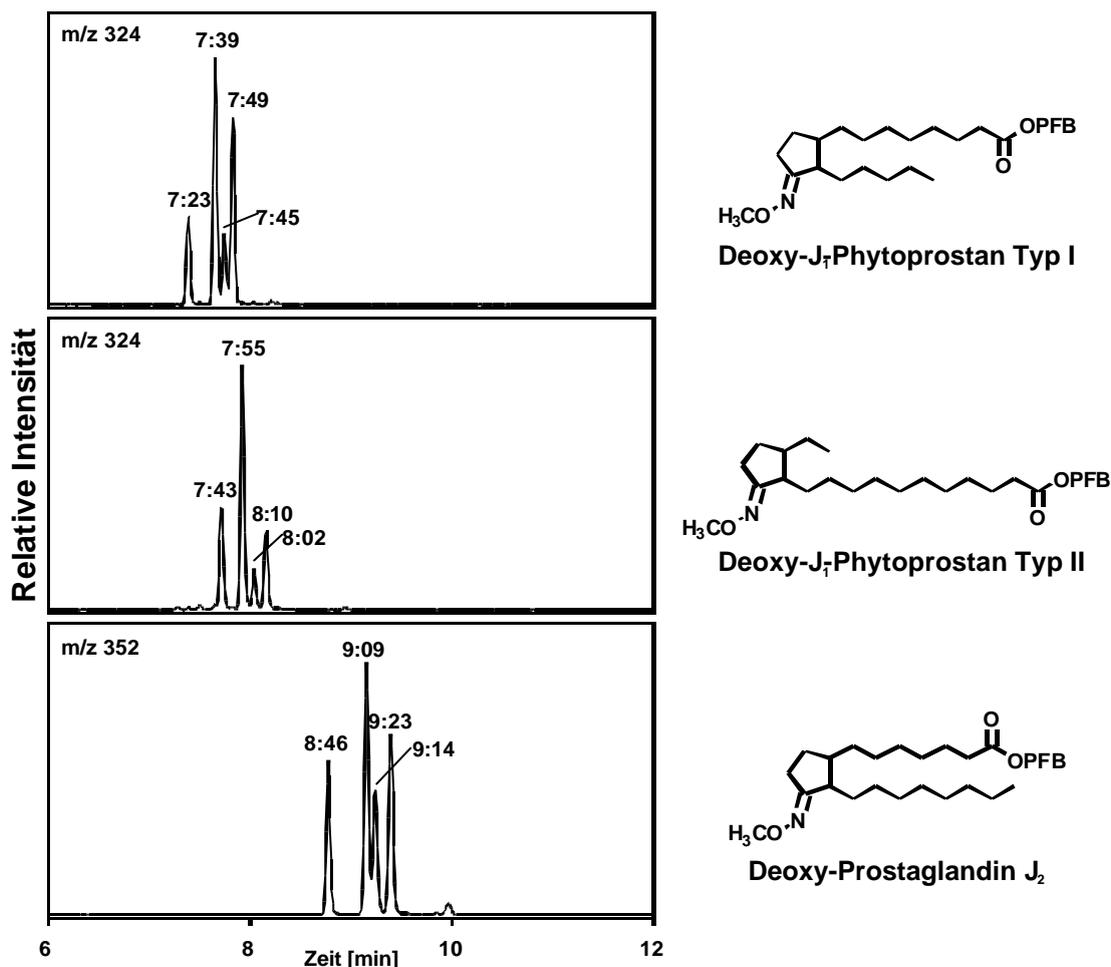


Abbildung IV.18: GC-MS-Chromatogramme im NICI-Ionisationsmodus der zum Methoxim derivatisierten und hydrierten PFB-Ester von dPPJ₁ Typ I und Typ II und des Standards 15d-PGJ₂. Eine Fragmentierung der Molekülanionen (M⁻) wurde nicht beobachtet.

Eine Unterscheidung zwischen dem Regioisomer Typ I und 12-OPDA war auch mit dieser Derivatisierungstechnik nicht möglich. Bei Aufarbeitungen von verschiedenen Pflanzenproben konnten keine dPPJ₁ nachgewiesen werden.

Eine Untersuchung der Cyclopentenone als Pentafluorbenzyl-Ester ohne eine vorausgegangene katalytische Hydrierung, wodurch eine Unterscheidung zwischen Typ I und 12-OPDA realisierbar gewesen wäre, ergab aufgrund der thermischen Isomerisierung der α,β -ungesättigten Ketone während der GC-Analyse mehrere Peaks mit einer nur ungenügenden Auftrennung der einzelnen Verbindungen (siehe Abbildung IV.19, Trennbedingungen siehe IV.4.5e).

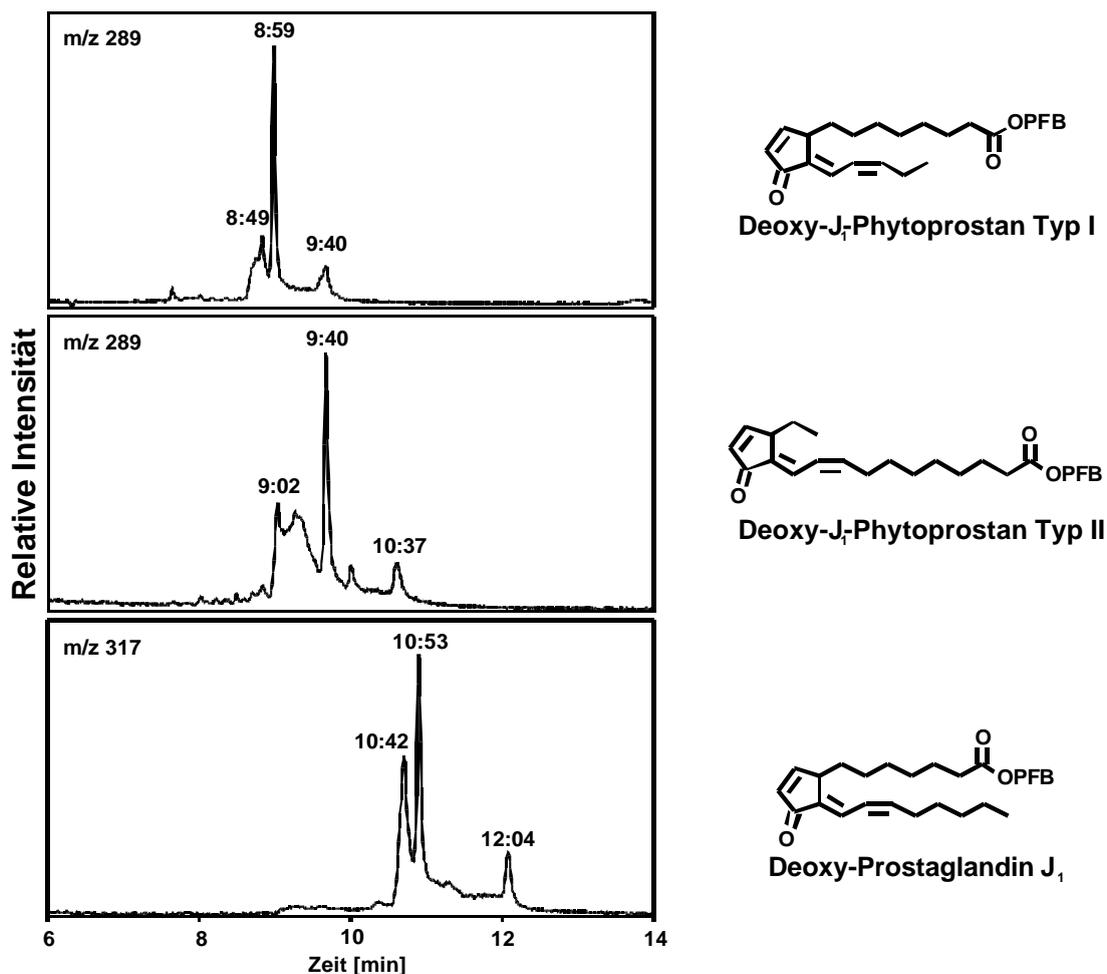


Abbildung IV.19: GC-MS-Chromatogramme im NICI-Ionisationsmodus der PFB-Ester von dPPJ₁ Typ I und Typ II und des Standards 15d-PGJ₁. Eine Fragmentierung der Molekülanionen (M⁻) wurde nicht beobachtet.

Ein weiteres Problem dieser Untersuchung war die sehr geringe massenspektrometrische Nachweisempfindlichkeit der nicht hydrierten PFB-Ester, so dass eine spurenanalytische Untersuchung von Pflanzenmaterial auch in diesem Fall keinen Erfolg hatte.

Zur Stabilisierung und zur Verhinderung einer Isomerisierung der Cyclopentenone wurde als nächstes die Umsetzung der nicht hydrierten Verbindungen zum Methoxim mit anschließender PFB-Veresterung versucht. Auch diese Derivatisierung führte wieder zu einer Vielzahl von nicht ausreichend trennbaren Peaks (nicht abgebildet), die eine Detektion der Cyclopentenon-Phytoprostane in pflanzlichem Gewebe verhinderte. Neben der ebenfalls geringen Nachweisempfindlichkeit dieser Verbindungen im Massenspektrometer war zudem eine quantitative Umsetzung der Carbonylfunktion zum Methoxim problematisch.

Insgesamt konnte trotz mehrerer Versuche keine GC-MS-Methode zum spurenanalytischen Nachweis der Deoxy-J₁-Phytoprostane entwickelt werden. Ein gravierender Nachteil aller oben genannten Methoden war allgemein die - neben der Extraktion und der weiteren Aufreinigung der pflanzlicher Proben - zeitlich sehr langwierige und aufwendige Derivatisierung der Verbindungen, die in der täglichen Routineanalytik kaum durchführbar gewesen wäre.

IV.5.2 Nucleophile Addition von Glutathion an α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen

α,β -ungesättigte Ketone sind aufgrund ihres elektrophilen Charakters reaktive Verbindungen, die leicht von Nucleophilen angegriffen werden können. Der β -Kohlenstoff von Cyclopentenon-Prostaglandinen kann kovalent mit freien Thiolen reagieren (Michael-Addition). Prostaglandin A₂ und ein A₂-Isoprostan (15-A_{2t}-iP) binden innerhalb weniger Minuten in Anwesenheit von Glutathion-S-Transferase (GST) fast quantitativ an Glutathion (GSH), während ohne enzymatische Katalyse (allerdings bei einem pH-Wert von 6,5) keine merkbare Umsetzung nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 1999). Bereits 1990 wurde von Atsmon *et al.* gezeigt, dass Δ^{12} -PGD₂ und 9-Deoxy- Δ^9 - Δ^{12} -PGD₂ mit freien Thiolen wie in Cystein und GSH reagieren können, wobei die Konjugationsreaktion mit 9-Deoxy- Δ^9 - Δ^{12} -PGD₂ bei einem pH-Wert von 7,5 bereits in Abwesenheit von Glutathion-S-Transferase fast quantitativ abläuft (Atsmon *et al.*, 1990).

Die Deoxy-J₁-Phytoprostane sollten als kreuzkonjugierte α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen ebenfalls mit freien Thiolen reagieren. Dazu wurden 25 μ g jedes dPJP₁-Regioisomers (86 nmol) in 1 ml einer Lösung von Glutathion (1 mg/ml, 3,25 mM) in PBS-Puffer pH 7,4 gelöst und bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz zur Überprüfung der Stabilität der Verbindungen unter den gewählten Bedingungen in 1 ml PBS-Puffer pH 7,4 ohne GSH inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Ansätze mit 4 ml Wasser verdünnt, mit 1 M Citronensäure auf pH 3 eingestellt und dreimal gegen 2 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das überschüssige Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Anschließend wurde ein Aliquot jedes Ansatzes über HPLC analysiert (siehe III.4.4.3).

Nach der einstündigen Inkubation mit Glutathion konnten im Gegensatz zum Kontrollansatz nur noch ca. 20% der Ausgangsverbindungen in die organische Phase extrahiert werden. Der Großteil der Cyclopentenon-Phytoprostane (83,4% Typ I und 79,08% Typ II) wurde an Glutathion gebunden.

IV.5.3 Nachweis von Deoxy-J₁-Phytosteranen mittels Fluoreszenz-HPLC

Eine Analyse der Deoxy-J₁-Phytosterane in Pflanzen mit in der Prostaglandin-Chemie etablierten GC-MS-Methoden war, auch unter Verwendung verschiedener Derivatisierungsmethoden, nicht durchführbar. Ein Nachweis der Verbindungen gelang schließlich mit der Entwicklung einer empfindlichen HPLC-Methode mit Fluoreszenz-Detektion. Da die chemisch reaktiven, elektrophilen Cyclopentenone durch Michael-Addition kovalent an freie Thiole binden können, war es möglich, dPPJ₁, 12-OPDA und das als Standard verwendete 15d-PGJ₂ selektiv an 7-Mercapto-4-methylcumarin, einer fluoreszierenden Verbindung mit freier Thiol-Gruppe, zu binden (siehe Abbildung IV.20). Die dabei gebildeten Konjugate konnten anschließend hochempfindlich und selektiv mittels Fluoreszenz-HPLC bestimmt werden.

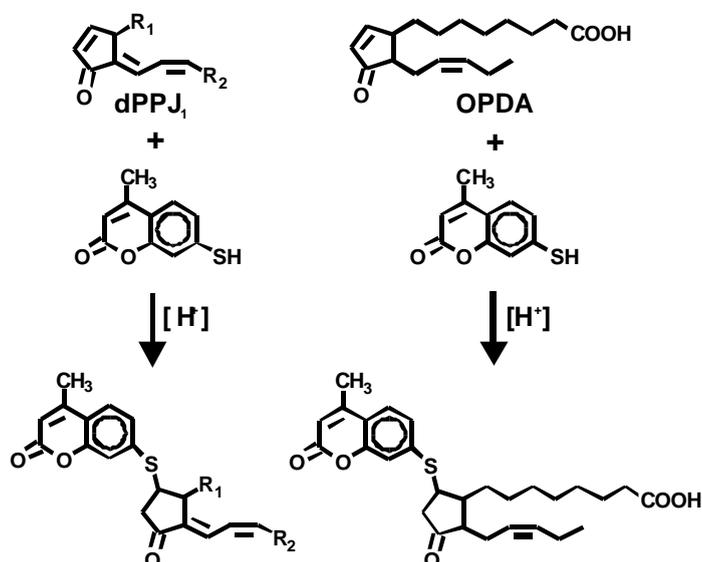


Abbildung IV.20: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion mit 7-Mercapto-4-methylcumarin. a,b-ungesättigte Carbonylverbindungen wie dPPJ₁ und OPDA reagieren in Anwesenheit eines sauren Katalysators mit Thiolen (Michael-Addition). (Typ I: R₁ = C₈H₁₅O₂; R₂ = C₂H₅; Typ II: R₁ = C₂H₅, R₂ = C₈H₁₅O₂).

Nucleophile Michael-Additionen laufen im allgemeinen basenkatalysiert ab, die zu bestimmenden Cyclopentenone sind unter diesen Bedingungen, insbesondere in wässrigem Milieu, allerdings nicht stabil und können möglicherweise polymerisieren. Deshalb wurde eine Kopplung unter sauren Reaktionsbedingungen in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt.

25 µg des dPPJ₁-Regioisomers Typ II wurden in 50 µl einer Lösung von 7-Mercapto-4-methylcumarin in Ethylacetat (1 mg/ml) unter Zugabe von 25 µl Trifluoressigsäure für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Mischung anschließend über HPLC

unter Verwendung eines Photodiodenarray- und eines Fluoreszenzdetektors analysiert (LiChrospher 100 RP18 endcapped, 250 mm x 4 mm, Fluss 1,5 ml/min, linearer Gradient von 30% bis 85% Acetonitril in Wasser mit 0,1% Essigsäure). Im Vergleich zu einem parallelen Ansatz, der nur die Derivatisierungsreagenzien enthielt, konnte im UV-Chromatogramm ein weiterer Peak bei einer Wellenlänge von 326 nm detektiert werden, während das Edukt dPPJ₁-II nur mehr in Spuren nachgewiesen wurde. Im Fluoreszenzchromatogramm wurde bei der gleichen Retentionzeit und einer für vergleichbare Cumarine charakteristischen Anregungs- und Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{ex}} = 330$, $\lambda_{\text{em}} = 450$) ebenfalls ein Peak detektiert. Dieser Peak wurde aufgefangen und über den auch im Scan-Modus betreibbaren Fluoreszenzdetektor die für das Konjugat optimale Anregungs- und Emissionswellenlänge bestimmt (siehe Abbildung IV.21).

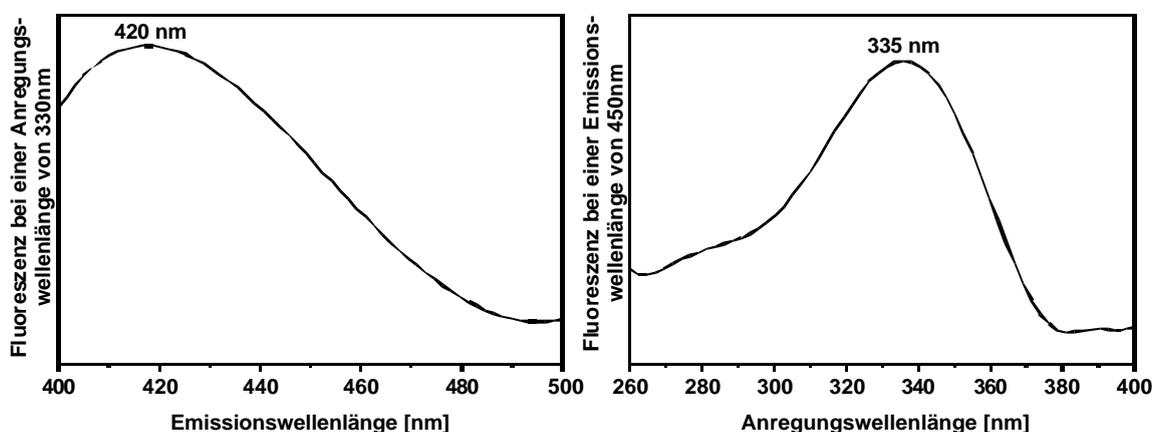


Abbildung IV.21: Bestimmung der optimalen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen für das Kopplungsprodukt von 7-Mercapto-4-methylcumarin über einen Wellenlängen-Scan.

Nach der Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge des Konjugats bei 335 nm und der Emissionswellenlänge von 420 nm konnten sowohl die optimalen Reaktionsbedingungen und Lösungsmittel für die nucleophile Addition ermittelt als auch eine HPLC-Methode zur Auftrennung von dPPJ₁, 12-OPDA und des als Standard verwendeten 15d-PGJ₂ entwickelt werden.

Zur Konjugation wurden die Verbindungen mit 50 μl einer Lösung von 7-Mercapto-4-methylcumarin in Ethylacetat (1 mg/ml) sowie 25 μl Trifluoressigsäure versetzt und bei 0°C im Eisbad inkubiert. Nach einer Stunde konnten die überschüssigen Reagenzien in einem Stickstoffstrom entfernt werden. Der Rückstand wurde in Acetonitril aufgenommen und über HPLC analysiert (siehe Abbildung IV.22; HPLC-Bedingungen siehe III.4.4.6, Trennsystem 2).

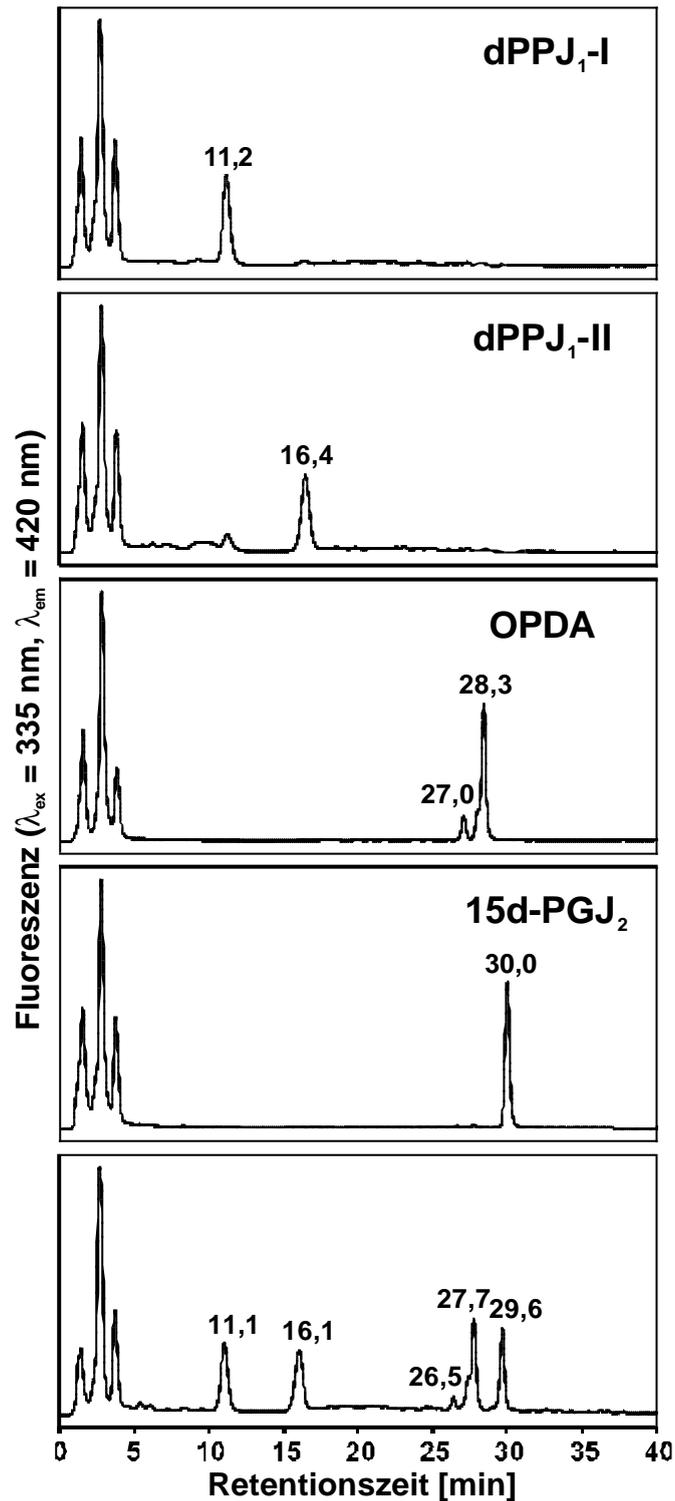


Abbildung IV.22: HPLC-Chromatogramme der fluoreszenzmarkierten Verbindungen dPPJ₁, Typ I und II, OPDA und des Standards 15-dPGJ₂. Im untersten Chromatogramm ist eine Mischung aller vier Verbindungen nach Aufarbeitung und Derivatisierung abgebildet. Die Peaks im Bereich bis 5 min stammen von den Derivatisierungsreagenzien.

Für die beiden Regioisomere der Cyclopentenon-Phytoprostane und 15d-PGJ₂ wurde jeweils ein Peak detektiert, 12-Oxo-Phytodiensäure isomerisierte während der Konjugationsreaktion und ergab 2 Peaks im HPLC-Chromatogramm. Eine weitere Charakterisierung der gebildeten Konjugate über GC-MS gelang nicht. Die Nachweisgrenze der Verbindungen über diese Derivatisierungsmethode lag bei 10 ng.

IV.5.4 Extraktion und Reinigung von dPPJ₁ aus Pflanzenmaterial

Mit der Entwicklung der Fluoreszenz-HPLC-Methode war es möglich, dPPJ₁ und 12-Oxo-Phytodiensäure in pflanzlichem Material zu bestimmen. Die Isolierung der freien Fettsäuren und Lipide wurde aus Zellgewebe durchgeführt, das unmittelbar vor der Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gemörsert oder bei -80°C gelagert wurde. Bei Zellsuspensionskulturen wurde das Medium über einen Büchnertrichter abgesaugt und das Zellmaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um ein schnelles Auftauen der Proben während der Extraktion zu vermeiden, wurden alle dabei verwendeten Lösungsmittel auf 4°C gekühlt und die Pflanzenextrakte während der einzelnen Aufarbeitungsschritte auf Eis gelagert. Dadurch sollte eine weitere Autoxidation und damit eine mögliche *ex-vivo*-Entstehung von Phytoprostanen aus α -Linolensäure während der Probenaufarbeitung verhindert werden.

Zur Extraktion wurden 2 - 10 g frisches Pflanzengewebe bzw. Zellsuspensionskultur, entsprechend einem Trockengewicht von 0,1 - 1 g, mit 10 ml gesättigter Kochsalzlösung und 10 ml Ethylacetat versetzt. Zu der Mischung wurden zudem 200 μ l einer 5%-igen Lösung (w/v) von Butylhydroxytoluol (BHT) in Ethylacetat als Radikalfänger, eine Spatelspitze (ca. 20 mg) Triphenylphosphin zur Reduktion von Hydroperoxiden und 500 ng 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ als interner Standard zugegeben. Zum Einstellen der Proben auf einen pH von 2 - 3 waren je nach der eingesetzten Pflanzenmenge zwischen 100 und 250 μ l 1 M Citronensäure notwendig.

Die Zellen wurden durch eine dreiminütige Dispersion mit einem Ultra-Turrax bei 24000 rpm homogenisiert und zur Trennung der Phasen für 10 min bei 2900 x g und 4°C zentrifugiert. Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen, wobei keine Bestandteile der Interphase oder der Wasserphase miterfasst werden durften.

Der Ethylacetat-Extrakt wurde anschließend über eine Aminopropyl-Festphasenextraktion gereinigt. Die Aminopropyl-SPE (500 mg) wurde nacheinander mit 6 ml 5 % Triethylamin in Methanol (v/v) und 6 ml Methanol gespült und anschließend mit 6 ml Ethylacetat equilibriert. Der Pflanzenextrakt wurde quantitativ aufgegeben und die Säule mit 9 ml Chloroform/Isopropanol (2:1, v/v) zur Entfernung der in Ethylacetat löslichen Kontaminanten wie Chlorophyll oder Fettsäureestern gewaschen. Die Deoxy-J₁-Phytoprostane konnten mit 6 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (75:25:2) eluiert

werden. Das Eluat wurde in einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und in 1 ml Chloroform rekonstituiert.

Der so erhaltene Extrakt wurde über eine weitere Festphasenextraktion aufgereinigt. Dazu wurde eine Silica-SPE (500 mg) mit 6 ml Methanol sowie 6 ml Ethylacetat gewaschen und mit 9 ml Chloroform equilibriert. Die Probe wurde auf die Säule appliziert und mit 6 ml Chloroform gespült. Die Elution von dPPJ₁ erfolgte mit 9 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (75:25:1), überschüssiges Lösungsmittel wurde in einem Stickstoffstrom entfernt.

Der Rückstand der Aufreinigung wurde zur Fluoreszenzmarkierung in 50 µl einer Lösung von 7-Mercapto-4-methylcumarin in Ethylacetat (1 mg/ml) sowie 25 µl Trifluoressigsäure als Katalysator versetzt und eine Stunde bei 0°C inkubiert. Abschließend wurden die im Überschuss zugegebenen Reagenzien unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde mittels Fluoreszenz-HPLC analysiert (HPLC-Bedingungen siehe III.4.4.6). Jeder einzelne Aufarbeitungsschritt wurde unter der Verwendung von Standardverbindungen entwickelt und überprüft. Um unterschiedliche physikochemische Eigenschaften der Verbindungen in den Analysen auszugleichen, die sowohl die Ausbeute bei der chromatographischen Aufarbeitung als auch bei der Derivatisierungsreaktion beeinflussen können, musste für die Berechnung der dPPJ₁- und OPDA-Konzentrationen mit 15d-PGJ₂ als internem Standard (IS) ein Korrekturfaktor bestimmt werden. Zur Ermittlung des Korrekturfaktors wurden je 500 ng dPPJ₁ Typ I und II, 100 ng OPDA sowie 500 ng 15d-PGJ₂ nach der oben genannten Extraktion und Aufreinigung aufgearbeitet, derivatisiert und über HPLC analysiert. Die Peakflächen wurden bestimmt und ein Korrekturfaktor wie folgt berechnet:

$$f = \frac{c(\text{Analyt})}{c(\text{IS})} \cdot \frac{\text{Fläche}(\text{IS})}{\text{Fläche}(\text{Analyt})}$$

Aus der Tabelle IV.2 ist ersichtlich, dass gleiche Mengen eingesetzter Deoxy-J₁-Phytoprostane und 15d-PGJ₂ (interner Standard) in etwa gleichen Peakflächen resultieren. Im Fall von 12-Oxo-Phytodiensäure ist die zugehörige Peakfläche mehr als doppelt so groß wie die Fläche des internen Standards.

IV. ERGEBNISSE

	Eingesetzte Menge in ng:	Berechnete Menge in ng (ohne Korrekturfaktor): (Mittelwert \pm S.D., n = 3)	Korrektur- Faktor f:
dPPJ ₁ -I	500	511,45 \pm 38,88	0,9776
dPPJ ₁ -II	500	507,62 \pm 14,73	0,9850
OPDA	100	249,52 \pm 66,49	0,4008

Tabelle IV.2: Ermittelte Korrekturfaktoren für die Bestimmung von Cyclopentenonen mit 15d-PGJ₂ als internem Standard.

IV.5.5 Extraktion und Reinigung von PPD₁ aus Pflanzenmaterial

Ein direkter Nachweis der D₁-Phytprostane in pflanzlichem Material war aufgrund der Instabilität dieser Verbindungen und der grossen Anzahl an Isomeren sowie deren Ähnlichkeit zu den E₁-Phytprostane nicht möglich. Zudem standen für die Entwicklung einer Extraktions- und Aufreinigungsmethode keine gereinigten Referenzverbindungen zur Verfügung. D₁-Phytprostane können jedoch nach der Überführung in die Deoxy-J₁-Phytprostane und darauffolgender Kopplung mit 7-Mercapto-4-methylcumarin über die Fluoreszenz-HPLC-Methode nachgewiesen werden.

Die Extraktion von 2 - 10 g Pflanzengewebe bzw. Suspensionszellkultur wurde wie unter IV.5.4 beschrieben durchgeführt, als interner Standard diente Prostaglandin D₂, das während der Aufarbeitung wie die D₁-Phytprostane in die Deoxy-Verbindung überführt wurde. Der so erhaltene Ethylacetat-Extrakt wurde anschließend in einem Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt und in 1 ml Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wurde zur Aufreinigung auf eine zuvor mit 6 ml Methanol und 6 ml Ethylacetat gewaschene sowie mit 6 ml Chloroform equilibrierte Silica-Festphasenextraktionssäule aufgegeben. Die Säule wurde mit 6 ml Chloroform/Aceton/Essigsäure (90:10:0,1, v/v) zur Entfernung apolarer Kontaminanten und anschließend zur Entfernung eventuell vorhandener Deoxy-J₁-Phytprostane mit 6 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (70:30:0,1, v/v) gespült. PPD₁ wurden mit 9 ml Hexan/Ethylacetat/Essigsäure (30:70:1, v/v) von der Säule eluiert und das Lösungsmittel in einem Stickstoffstrom entfernt.

Zur Überführung von D₁-Phytprostane und des Standards PGD₂ in die entsprechenden Deoxy-Verbindungen wurde der Rückstand mit 400 μ l Trifluoressigsäure versetzt und 15 min bei 40°C inkubiert. Die überschüssige Säure wurde in einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml Ethylacetat aufgenommen. Der Dehydratisierungsansatz wurde, wie unter IV.5.4 beschrieben, zuerst über eine Aminopropyl-Festphasenextraktion und anschließend über eine weitere Silica-SPE

aufgereinigt. Die so erhaltenen Deoxy-J₁-Phytoprostane und 15d-PGJ₂ konnten mit 7-Mercapto-4-methylcumarin zum fluoreszierenden Konjugat derivatisiert und mittels Fluoreszenz-HPLC analysiert werden (HPLC-Bedingungen siehe III.4.4.6).

IV.6 Vorkommen von dPPJ₁ und PPD₁ in Pflanzen

Mit der oben genannten Fluoreszenz-HPLC-Methode konnte pflanzliches Gewebe sowohl auf das Vorkommen von freien Deoxy-J₁-Phytoprostanen als auch auf deren biosynthetischen Vorstufen PPD₁ untersucht werden. Von Interesse war dabei, ob diese Verbindungen bereits in gesunden, unbehandelten Pflanzen nachzuweisen sind und insbesondere, ob eine verstärkte Bildung von Deoxy-J₁-Phytoprostanen infolge von oxidativem Stress in behandelten Pflanzen und Zellsuspensionskulturen zu beobachten ist.

IV.6.1 Basale Konzentrationen von dPPJ₁ und PPD₁ in Pflanzenmaterial

Die Bestimmung von Deoxy-J₁-Phytoprostanen bzw. von PPD₁ erfolgte in drei verschiedenen Pflanzenspezies, *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, *Lycopersicon esculentum* var. Moneymaker und *Nicotiana tabacum* ssp. Samson, die oft als Modellpflanzen für biochemische Studien verwendet werden. Dazu wurde frisches Blattmaterial von unbehandelten Pflanzen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, zerkleinert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Ca. 2 - 3 g jeder Pflanzenprobe wurden nach den oben angegebenen Methoden (siehe IV.5.4 und IV.5.5) in einer Dreifachbestimmung auf dPPJ₁, 12-Oxo-Phytodiensäure und PPD₁ hin untersucht. Für jede Pflanzenart wurde in einer Dreifachbestimmung das Trockengewicht bestimmt. Parallel zu den Pflanzenproben wurden eine Positivkontrolle mit allen nachzuweisenden Verbindungen sowie eine Pflanzenaufarbeitung als Negativkontrolle aufgearbeitet (ohne die Zugabe von 7-Mercapto-4-methylcumarin bei der Derivatisierung) (siehe Abbildung IV.23; HPLC-Bedingungen siehe III.4.4.6, Trennsystem 1). In den Pflanzenaufarbeitungen sind neben den im Überschuss zugesetzten Reagenzien vier Peaks deutlich detektierbar, die in ihren Retentionszeiten mit den ebenfalls analysierten Referenzverbindungen übereinstimmen. Die als Negativkontrolle aufgearbeitete Pflanzenprobe ergab keine detektierbaren Peaks.

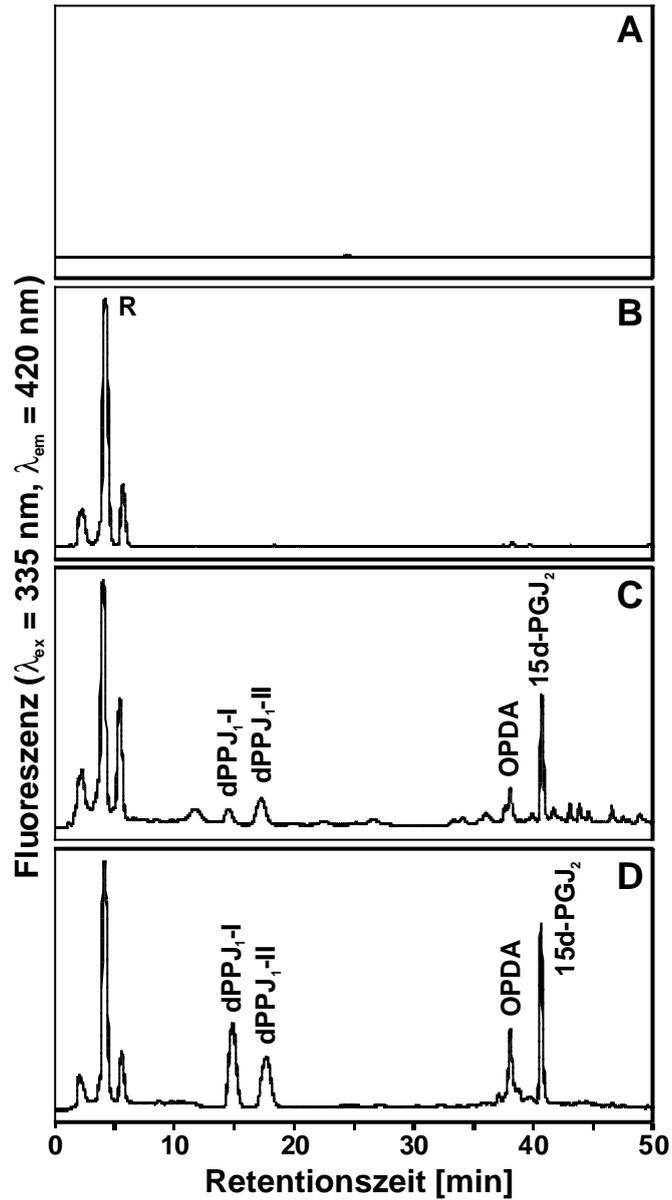


Abbildung IV.23: Chromatogramm A zeigt eine Aufarbeitung von *A. thaliana*-Blättern, die ohne 7-Mercapto-4-methylcumarin derivatisiert wurde (Negativkontrolle). B ist eine aufgearbeitete Blindprobe ohne Zusatz von Cyclopentenonen, es sind nur die Reagenzienpeaks (R) erkennbar. Chromatogramm C ist eine Pflanzenaufarbeitung von *A. thaliana* mit vollständiger Derivatisierung. Die drei gesuchten Verbindungen und der Standard sind eindeutig detektierbar. Aufarbeitung D wurde als Positivkontrolle mit allen vier Verbindungen dPPJ₁ Typ I (Rt = ~14 min) und Typ II (Rt = ~17 min, OPDA (Rt = ~38 min) und 15d-PGJ₂ (Rt = ~40 min) durchgeführt.

Die in der Tabelle IV.3 angegebenen Basalkonzentrationen von dPPJ₁, 12-OPDA und PPD₁ in unbehandelten Pflanzen stellen die Mittelwerte mit Standardabweichungen, berechnet auf Gramm Trockengewicht (TG), dar.

	Phytoprostane [ng/g TG] (Mittelwerte ± S.D., n = 3)				
	PPD ₁ Typ I	PPD ₁ Typ II	dPPJ ₁ Typ I	dPPJ ₁ Typ II	OPDA
<i>L. esculentum</i> var. MoneyMaker	459 ± 130	698 ± 161	294 ± 20	1668 ± 202	212 ± 51
<i>N. tabacum</i> ssp. Samson	348 ± 83	492 ± 139	576 ± 181	1074 ± 345	67 ± 13
<i>A. thaliana</i> cv. Columbia	2239 ± 606	3995 ± 258	932 ± 202	2413 ± 194	549 ± 331

Tabelle IV.3: Basalkonzentrationen von PPD₁, dPPJ₁ und OPDA in Blättern von drei unterschiedlichen Pflanzen.

Das dPPJ₁-Regioisomer I wurde in allen drei Pflanzenarten in Konzentrationen von 294 bis 932 ng/g Trockengewicht nachgewiesen, einer Menge, die deutlich höher war als die der enzymatisch gebildeten, strukturell ähnlichen 12-OPDA (67 bis 549 ng/g TG). Das Typ II-Regioisomer von dPPJ₁ konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Konzentration dieser Verbindungen mit 1074 bis 2413 ng/g Trockengewicht die von 12-OPDA und des Typ I-Regioisomers nochmals um ein Vielfaches überstieg.

Neben diesen α,β -ungesättigten Verbindungen konnten in einer weiteren Messreihe auch D₁-Phytoprostane nachgewiesen werden, wobei auch hier das Regioisomere Typ II mit einer Konzentration von 492 bis 3995 ng/g Trockengewicht über der Konzentration der Typ I-Regioisomere (348 bis 2239 ng/g TG) lag. Die basalen Konzentrationen von dPPJ₁ und PPD₁ variierten je nach Pflanze deutlich, dPPJ₁ und PPD₁ waren aber in allen untersuchten Pflanzen in höheren Konzentrationen nachzuweisen als 12-Oxo-Phytodiensäure.

IV.6.2 Induzierte Akkumulation von dPPJ₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Nachdem Deoxy-J₁-Phytoprostane und D₁-Phytoprostane bereits in nicht behandelten, gesunden Pflanzen nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob eine Akkumulation dieser Verbindungen durch oxidativen Stress in Pflanzen induziert werden kann. Phytoprostane werden *in vitro* nichtenzymatisch gebildet, die hierfür

notwendige Voraussetzung ist die Anwesenheit von α -Linolensäure, molekularem Sauerstoff und freien Radikalen, durch die eine Radikalkettenreaktion initiiert werden kann. Redox-aktive Schwermetalle, wie zum Beispiel Kupferacetat, können in Pflanzen die Bildung von Hydroxylradikalen aus endogenen Hydroperoxiden katalysieren und damit zu einer verstärkten Lipidperoxidation und oxidativen Schädigung der Pflanzenzellen führen.

Vor einer Behandlung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen mit Kupferacetat musste zuerst die höchstmögliche Dosierung des Schwermetalls ermittelt werden, die noch zu keiner letalen Schädigung der Zellen führte. Dazu wurden zu jeweils 10 ml der verwendeten Zellsuspensionskulturen von *N. tabacum* und *L. esculentum* steigende Mengen einer zuvor sterilfiltrierten Kupferacetat-Lösung in einer finalen Konzentration von 100 μ M bis 1 mM zugesetzt und über einen Zeitraum von 12 h auf einem Rotationsschüttler bei 24°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde den Suspensionskulturen ein Tropfen unter sterilen Bedingungen entnommen, auf einem Objektträger mit einem Tropfen einer 0,4%-igen Trypanblau-Lösung versetzt und unter dem Mikroskop der Anteil toter Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Zellkultur bestimmt. Der Vitalfarbstoff Trypanblau diffundiert leicht in die Zellen, wird jedoch von lebenden Zellen sofort wieder ausgeschieden, während er in toten Zellen akkumuliert. Die höchstmögliche Konzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle über den gesamten Zeitraum maximal 5% tote Zellen nachzuweisen waren, lag für *N. tabacum* bei 500 μ M und für *L. esculentum* bei 250 μ M Kupferacetat.

Die Zellsuspensionskulturen wurden mit der für die jeweilige Kultur ermittelten Konzentration an Kupferacetat versetzt. Zu den in den Abbildungen IV.25 und IV.26 aufgeführten Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot der Suspensionskulturen über einen Büchnertrichter unter schwachem Vakuum vom Medium getrennt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Zur Untersuchung der Pflanzenproben auf dPPJ₁ wurden je Zeitpunkt drei Proben (entsprechend einem Frischgewicht von 3 - 10 g) entnommen, wie unter IV.5.4 angegeben aufgearbeitet und mittels Fluoreszenz-HPLC analysiert (HPLC-Bedingungen siehe III.4.4.6, Trennsystem 2). Parallel zu den Inkubationsansätzen wurden Kontrollansätze der Zellkulturen mit der entsprechenden Menge sterilfiltriertem Wasser versetzt und analog zu den Inkubationsansätzen aufgearbeitet. In allen Ansätzen waren neben den im Überschuss zugesetzten Reagenzien drei Peaks nachzuweisen, die in ihren Retentionszeiten mit den parallel aufgearbeiteten Referenzverbindungen dPPJ₁ und dem verwendeten internen Standard 15d-PGJ₂ übereinstimmten (siehe Abbildungen IV.22 und IV.24). 12-Oxo-Phytodiensäure konnte in den Inkubationsansätzen nicht nachgewiesen werden.

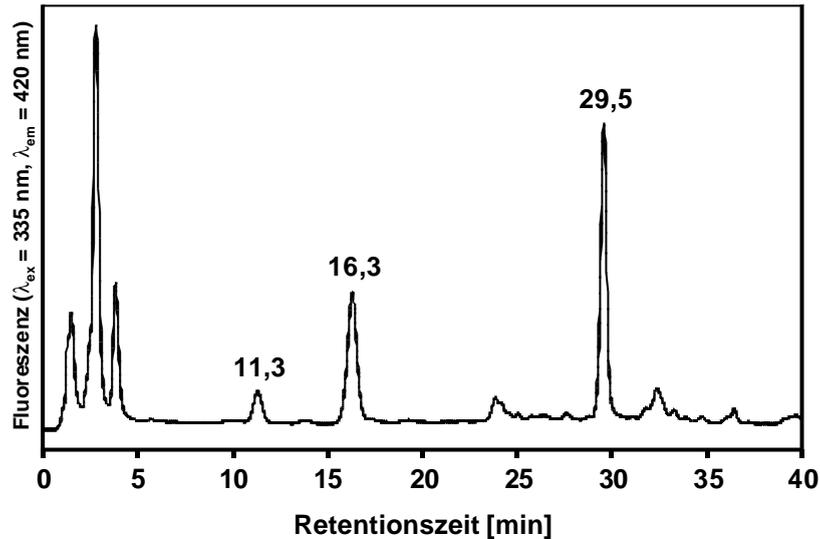


Abbildung IV.24: Beispiel-Chromatogramm einer Aufarbeitung von *L. esculentum* (Zellsuspensionskultur) nach Behandlung mit 250 μM Kupferacetat. Die fluoreszenzmarkierten Verbindungen dPPJ₁ Typ I (Rt = 11,3 min) und Typ II (Rt = 16,3 min) und der Standard 15d-PGJ₂ (Rt = 29,5 min) sind deutlich detektierbar, OPDA konnte in dem Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Die Behandlung von *L. esculentum*-Zellsuspensionskulturen mit Kupferacetat in einer Endkonzentration von 250 μM führte etwa zu einer Vervierfachung der dPPJ₁-Konzentrationen beider Regioisomere mit einem Maximum zwischen zwei und vier Stunden. Wie schon bei der Ermittlung der Basalkonzentrationen in Pflanzen festgestellt, konnte wiederum das Typ II-Regioisomer (3327 ± 334 ng/g TG) in einer deutlich höheren Konzentration nachgewiesen werden als dPPJ₁-I (715 ng \pm 78 ng/g TG) (siehe Abbildung IV.25).

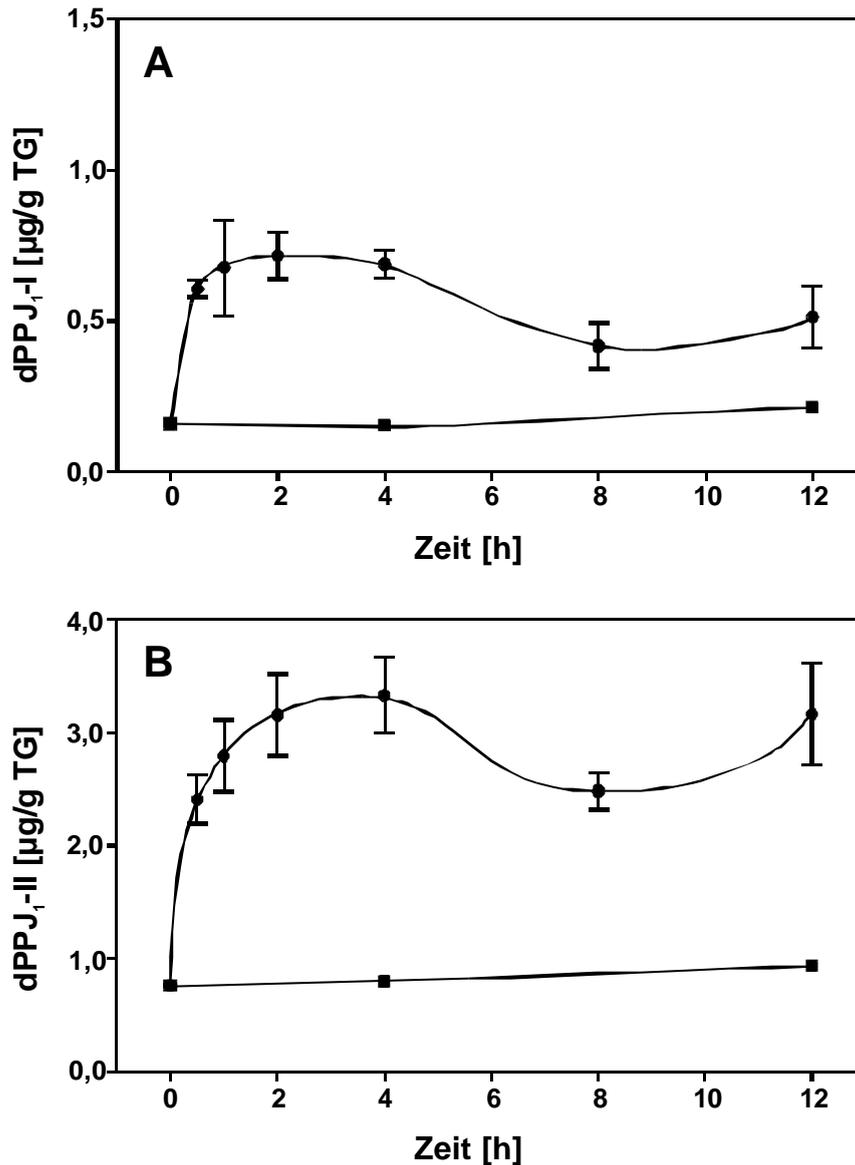


Abbildung IV.25: Induktion von dPPJ₁ in *L. esculentum*-Zellsuspensionskulturen durch 250 µM Kupferacetat (●) im Vergleich zur Kontrolle (■) (A = dPPJ₁ Typ I, B = dPPJ₁ Typ II; Mittelwerte ± S.D., n = 3).

Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Untersuchung von *N. tabacum*-Suspensionszellkulturen nach Behandlung mit 500 µM Kupferacetat über 12 Stunden. Hier wurde ein Anstieg von dPPJ₁ ca. um den Faktor 11 für das Regioisomer Typ I (maximal 1162 ng ± 169 ng/g TG) und das Siebenfache für das Typ II-Regioisomer (maximal 3556 ng ± 1044 ng/g TG) im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt, wobei das Maximum im Untersuchungszeitraum für beide Verbindungen bei ca. 2 h lag (siehe Abbildung IV.26). Auch in diesem Versuchsansatz konnte keine 12-Oxo-Phytodiensäure nachgewiesen werden.

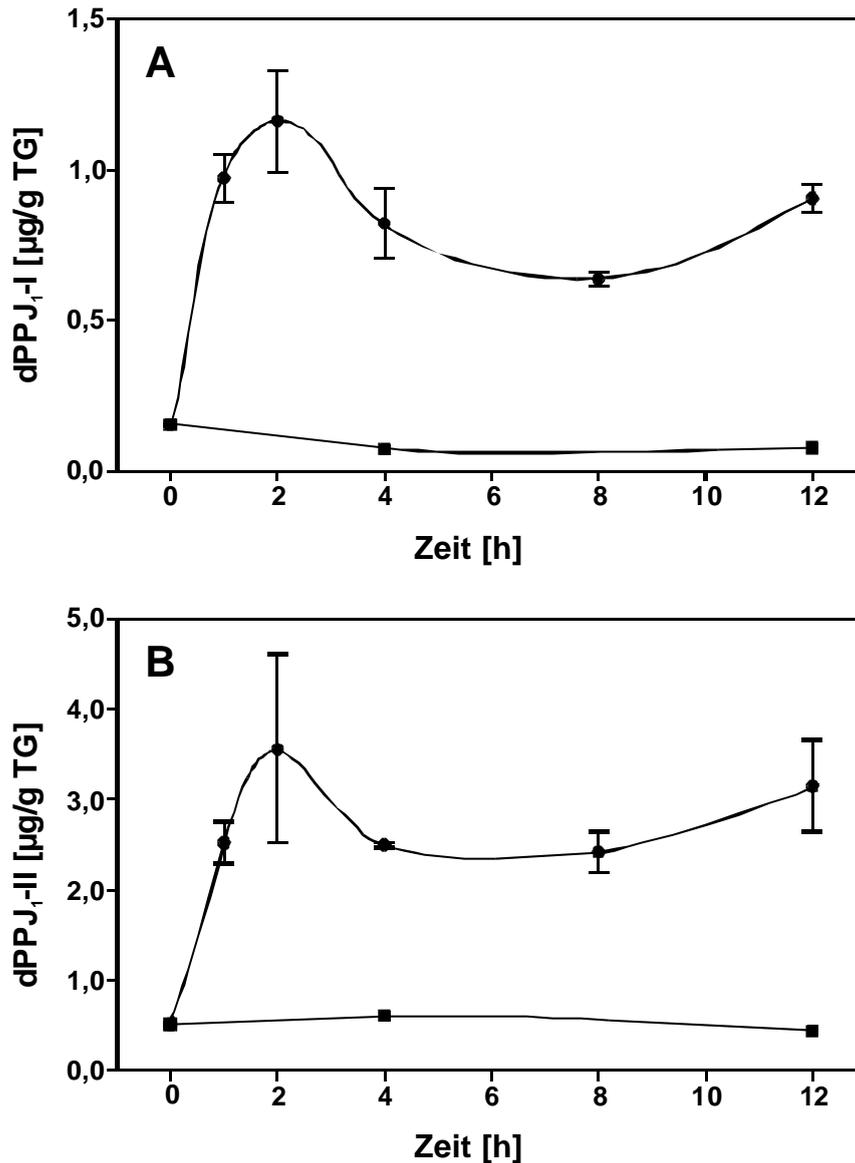


Abbildung IV.26: Induktion von dPPJ₁ in *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen durch 500 µM Kupferacetat (·) im Vergleich zur Kontrolle (■) (A = dPPJ₁ Typ I, B = dPPJ₁ Typ II; Mittelwerte ± S.D., n = 3).

IV.6.3 Induzierte Akkumulation von dPPJ₁ in Pflanzen

In Zellsuspensionskulturen konnte durch Kupferacetat eine verstärkte Bildung von dPPJ₁ induziert werden, so dass sich als nächstes die Frage stellte, inwieweit Deoxy-J₁-Phytoprostane auch in intakten Pflanzen infolge von oxidativem Stress akkumulieren können. Imbusch *et.al.* konnten zeigen, dass die Verwundung von *Mentha piperita*-Blättern mit einem Nagelstempel zu einem signifikanten Anstieg von F₁-Phytoprostanen führt (Imbusch und Mueller, 2000b), eine Verwundung von Tomatenpflanzen resultiert in einer gesteigerten Bildung von Wasserstoffperoxid

(Orozco-Cárdenas und Ryan, 1999). Da die Verwundung von Blattmaterial einen massiven Eingriff in die Pflanze darstellt, der mit einer verstärkten Lipidperoxidation einhergeht, wurde hier mit einem Kältereiz ein schwächerer Stimulus gewählt, um zu untersuchen, ob bereits geringe Formen von oxidativem Stress zu einer verstärkten Bildung von Phytoprostanen führen. Dazu wurden *A. thaliana*-Blätter abgeschnitten, was an sich schon eine geringe Verwundung des Pflanzenmaterials darstellt, und für 10 min bei 4°C bzw. die Kontrollblätter parallel dazu bei 20°C in einer wassergesättigten Atmosphäre gelagert und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Aufarbeitung und Analyse der Pflanzenproben auf Deoxy-J₁-Phytoprostane erfolgte wie unter IV.5.4 bzw. III.4.4.6 (HPLC-Trennsystem 2) angegeben.

Die zehnmünütige Lagerung der abgeschnittenen Blätter bei 4°C führte lediglich zu einem geringen Anstieg von dPPJ₁, vor allem des Regioisomers Typ II, im Vergleich zu den Kontrollblättern. Allerdings wurde, wahrscheinlich infolge der Verwundung durch das Abschneiden der Blätter, eine Verdopplung des 12-OPDA-Gehaltes festgestellt (siehe Abbildung IV.27), so dass die festgestellten Veränderungen auf eine Überlappung des Kältereizes mit der Blattverletzung zurückgeführt werden konnten.

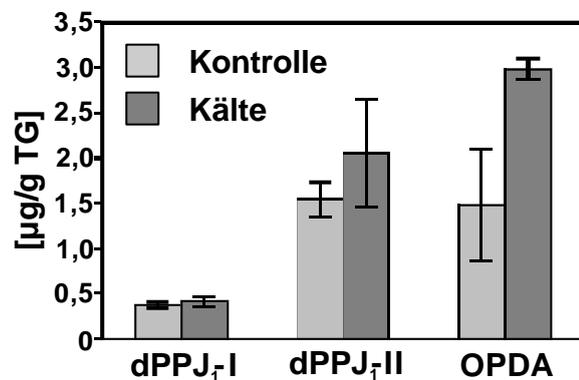


Abbildung IV.27: Induktion von dPPJ₁ Typ I und Typ II sowie von OPDA nach einem kurzfristigen Kälteschock. Zur Untersuchung wurden abgeschnittene Blätter verwendet. (Mittelwerte ± S.D., n = 3).

Um die durch die Verwundung hervorgerufenen Effekte auszuschließen, wurden in weiteren Versuchsansätzen ganze Pflanzen für 10 min bei 4°C bzw. die Kontrollpflanzen bei 20°C gelagert, ohne die Blätter abzuschneiden. Anschließend wurde das Blattmaterial jeder einzelnen Pflanze in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wie oben angegeben gelagert und aufgearbeitet.

Bereits dieser kurzfristige Stimulus induzierte bei den unverwundeten Pflanzen eine verstärkte Bildung von Deoxy-J₁-Phytoprostanen (siehe Abbildung IV.28). Der Kältereiz

fürte innerhalb von 10 min zu einer Verdopplung des Gehalts an dPPJ₁-I. Die Konzentration des Regioisomers Typ II wurde im Vergleich zu den Kontrollen um das 2-3-fache gesteigert. Auch hier konnte parallel zu den durch Autoxidation gebildeten Phytosteranen ein Anstieg von enzymatisch gebildeter OPDA nachgewiesen werden.

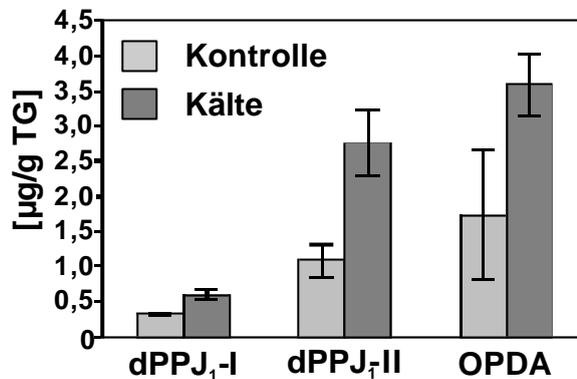


Abbildung IV.28: Induktion von dPPJ₁ Typ I und Typ II sowie von OPDA durch einen kurzfristigen Kälteschock. Das Experiment wurde mit unverwundeten Pflanzen durchgeführt. (Mittelwerte ± S.D., n = 3).

IV.7 Biologische Aktivität von dPPJ₁ in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Deoxy-J₁-Phytosterane in Pflanzen vorkommen und infolge von oxidativem Stress, z.B. durch abiotische Stimuli, eine verstärkte Bildung dieser Verbindungen nachgewiesen werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage, welche Auswirkungen diese Verbindungen und ihre Akkumulation in Pflanzen bzw. pflanzlichen Zellkulturen haben.

Jasmonsäure und ihre biologisch aktive Vorstufe, 12-Oxo-Phytodiensäure, sind wichtige Signalstoffe bei pflanzlichen Abwehrreaktionen und bewirken über eine Genaktivierung unter anderem die Synthese von Abwehrproteinen und von antimikrobiellen Sekundärstoffen, sogenannten Phytoalexinen.

N. tabacum (Solanaceae) bildet bei verschiedenen Formen von Stress verstärkt das Phytoalexin Scopoletin (Taguchi *et al.*, 2001), ein Hydroxycumarinderivat, das über den Phenylpropanstoffwechsel gebildet wird. Scopoletin wird in der Zelle durch Glycosyltransferasen in Scopolin, die Transport- und Speicherform, überführt und kann bei einer Abwehrreaktion in den Extrazellarraum abgegeben werden. Durch β-Glucosidasen kann das Aglykon Scopoletin wieder freigesetzt werden. Scopoletin besitzt neben einer antimikrobiellen (Goy *et al.*, 1993) und antiviralen Wirkung (Chong *et al.*, 1999) auch Radikalfänger-Eigenschaften (Chong *et al.*, 2002). Die Zugabe von exogenem Methyljasmonat zu Tabak-Suspensionszellkulturen führt zu einer

verstärkten Biosynthese und Akkumulation von Scopoletin im Medium (Sharan *et al.*, 1998). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass durch *tert*-Butylhydroperoxid und Jasmonsäure eine Scopoletin-Freisetzung induziert werden kann. *t*-BuOOH führte in einer Endkonzentration von 1 mM zu einer Erhöhung des Scopoletin-Gehaltes um das 16-fache, die Zugabe von 10 μ M Jasmonsäure zu Tabak-Zellkulturen ergab innerhalb von 4 h eine Scopoletin-Zunahme um das Sechsfache im Vergleich zu Kontrollansätzen. Da Phytoprostane durch freie Radikale aus α -Linolensäure gebildet werden können, sollte eine Scopoletinfreisetzung auch durch Phytoprostane induzierbar sein. Der Zusatz exogener Phytoprostane (Endkonzentration 10 μ M) zu Tabak-Zellkulturen ergab z.B. für die Cyclopentenon-Verbindungen PPA₁ eine Erhöhung um das Zehnfache, die B₁-Phytoprostane steigerten die Scopoletin-Konzentration im Medium um das Zweifache (Regioisomer Typ I) bzw. Siebenfache (Typ II) (Thoma *et al.*, 2003).

Zur Überprüfung der Cyclopentenon-Phytoprostane dPPJ₁ auf eine mögliche biologische Aktivität wurden 25 ml einer drei Tage alten Suspensionszellkultur von *N. tabacum* ssp. *xanthii* zu 75 ml Medium gegeben und unter Standardbedingungen drei Tage kultiviert. Ein Aliquot (10 ml) jeder Zellkultur wurde abzentrifugiert und das Verhältnis von Zellen zu Medium bestimmt. Die Zellmasse wurde zur Trockengewichtsbestimmung abgewogen und bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 60°C gelagert. Die Bestimmung des Medienvolumens war notwendig, um die einzusetzende Menge der zu testenden Verbindungen zu berechnen. Zu der verbliebenen Zellkultur wurden die beiden Regioisomere von dPPJ₁ in einer Endkonzentration von 10 μ M in einer methanolischen Lösung zugegeben, wobei die Methanolmenge so gewählt wurde, dass die Endkonzentration unter 1% (v/v) lag, um toxische Effekte des Lösungsmittels zu vermeiden. Die Kontrollansätze wurden jeweils mit der gleichen Menge Methanol versetzt. Zu den in der Abbildung IV.30 angegebenen Zeitpunkten wurde je ein Aliquot (ca. 5 ml) Zellsuspension entnommen, mit dem internen Standard 4-Methylumbelliferon (100 μ M) versetzt und für 10 min bei 2900 x g zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde über Fluoreszenz-HPLC analysiert (Trenn- und Detektionsbedingungen siehe III.4.4.7, siehe Abbildung IV.29).

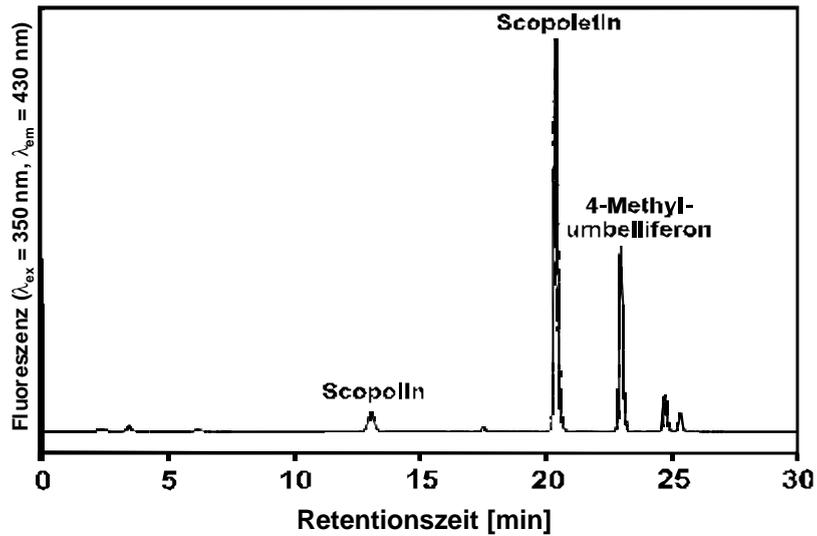


Abbildung IV.29: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm des Mediums von *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen nach Behandlung mit dPPJ₁. Als interner Standard diente 4-Methylumbelliferon, Scopolln ist die glycosylierte Form von Scopoletin.

Der Zusatz von 10 μM dPPJ₁ zu Tabak-Suspensionszellkulturen führte zu einem ca. 15-fachen Anstieg für das Regioisomer Typ I und einem ca. 14-fachen Anstieg für Typ II im Vergleich zu den Kontrollansätzen (siehe Abbildung IV.30). Die maximale Konzentration an Scopoletin im Medium wurde in beiden Versuchen nach ca. 3 h erreicht. Die beobachtete Scopoletin-Induktion der Deoxy-J₁-Phytostane ist mit der von 12-Oxo-Phytodiensäure (ca. 18-fache Steigerung) vergleichbar (siehe Abbildung IV.30).

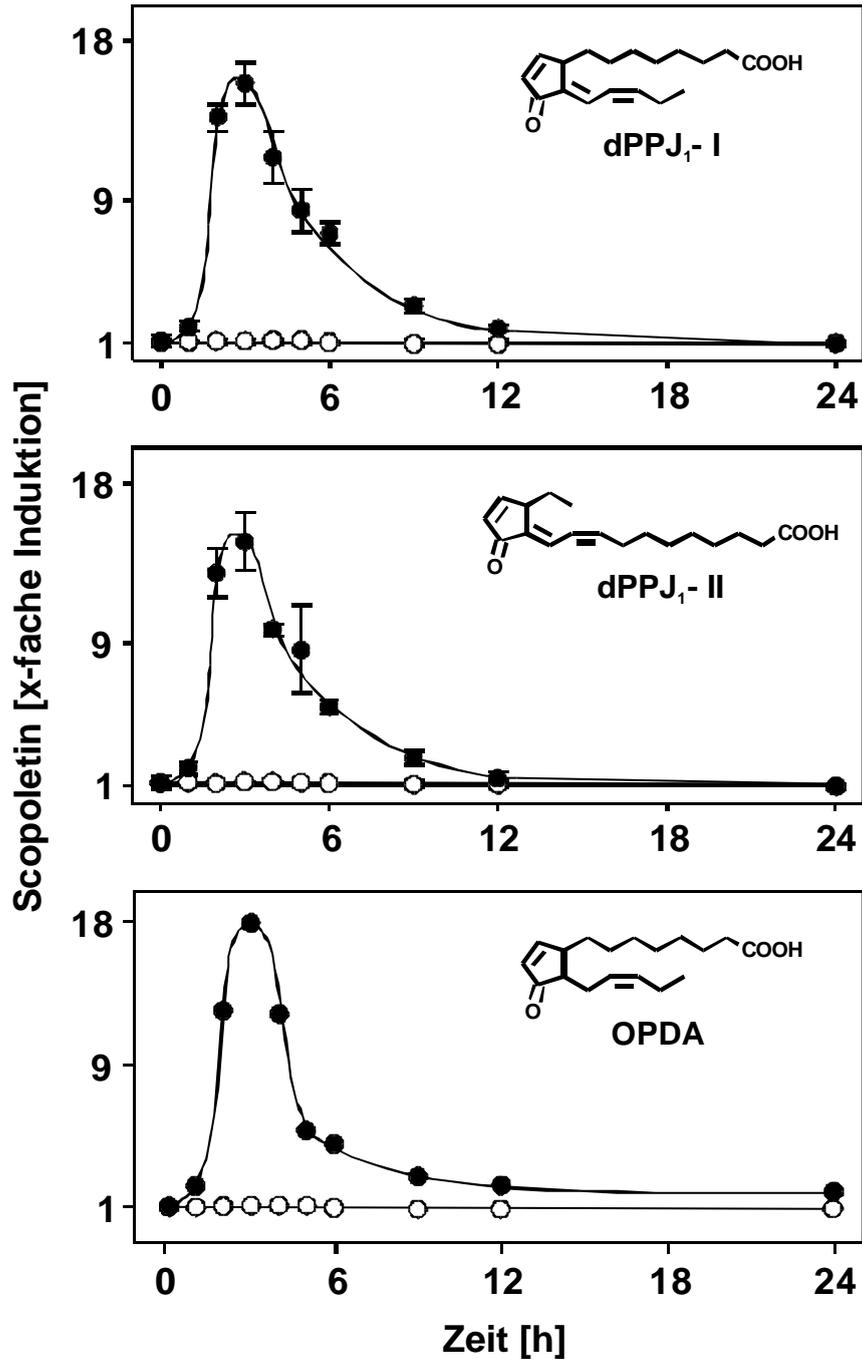


Abbildung IV.30: Zeitlicher Verlauf der Scopoletin-Induktion nach Behandlung von *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen mit dPPJ₁ Typ I und II sowie 12-Oxo-Phytodiensäure in einer Endkonzentration von 10 μ M (Mittelwerte \pm S.D., n = 3). Die Daten für OPDA wurden von Fr. Dr. Löffler (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Die Zugabe von Kupferacetat in einer Endkonzentration von 500 μM zu *N. tabacum*-Suspensionszellkulturen führte zu einem deutlichen Anstieg freier Deoxy-J₁-Phytoprostane (siehe IV.6.2). Da durch exogen zugesetzte dPPJ₁ zu *N. tabacum*-Zellkulturen eine verstärkte Freisetzung von Scopoletin in das Medium zu beobachten war, wurde im Folgenden untersucht, ob in diesem Testsystem auch nach Zusatz von Kupferacetat eine Konzentrationszunahme von Scopoletin nachzuweisen ist. Dazu wurde eine wie oben vorbereitete Zellkultur mit einer sterilfiltrierten, wässrigen Kupferacetat-Lösung in einer Endkonzentration von 500 μM versetzt und zu den im Diagramm dargestellten Zeitpunkten Teile der Zellsuspensionskultur unter sterilen Bedingungen abgenommen und wie oben angegeben analysiert. Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz aufgearbeitet, der mit einer adäquaten Menge Wasser versetzt wurde. Die Zugabe von Kupferacetat führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Scopoletin-Menge um ca. den Faktor 9 (siehe Abbildung IV.31). Hier wurde die maximale Konzentration an Scopoletin erst nach ca. 6 h erreicht, im Gegensatz zu den bisher untersuchten Verbindungen wie Jasmonsäure oder den Phytoprostanen mit einem Maximum nach ca. 2 - 4 h.

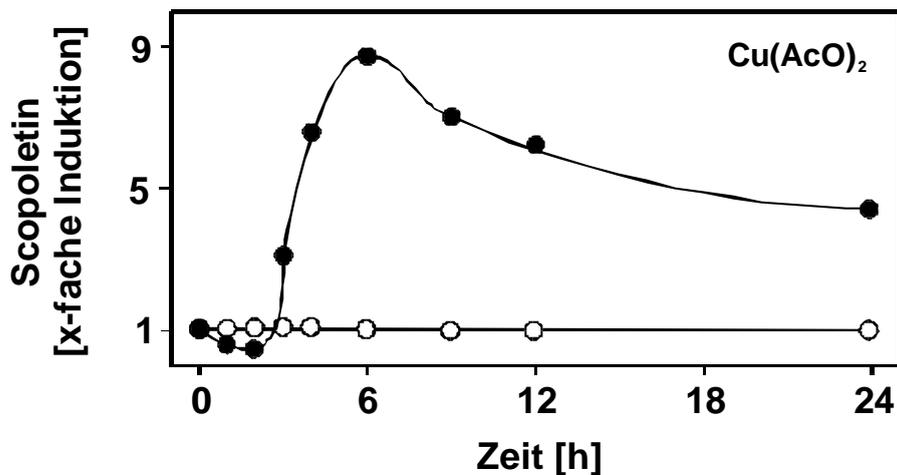


Abbildung IV.31: Zeitlicher Verlauf der Scopoletin-Induktion in *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen nach Zugabe von Kupferacetat in einer Endkonzentration von 500 μM .

V. DISKUSSION

V.1 Synthese von D₁-Phytoprostanen und Deoxy-J₁-Phytoprostanen

Isoprostane sind eine komplexe Familie von Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen, die *in vivo* und *in vitro* über Radikal-katalysierte Mechanismen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z.B. aus Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, gebildet werden können (Morrow *et al.*, 1990b; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998). In höheren Pflanzen können aus α -Linolensäure, der - neben Linolsäure - am häufigsten vorkommenden mehrfach ungesättigten Fettsäure in Pflanzen (Conconi *et al.*, 1996), auf chemisch analogem Weg nichtenzymatisch cyclische Verbindungen, sogenannte Phytoprostane, gebildet werden. Diese Verbindungen weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den enzymatisch gebildeten Jasmonaten auf (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998). Jasmonate wie Jasmonsäure und 12-Oxo-Phytodiensäure sind etablierte Signalmoleküle in Pflanzen, die an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in der Pflanze beteiligt sind (Liechti und Farmer, 2002). Eine wichtige Funktion von Jasmonaten ist die Induktion von Phytoalexinen im Rahmen der pflanzlichen Verteidigungsantwort (Gundlach *et al.*, 1992). Später konnte gezeigt werden, dass auch Phytoprostane eine mit den Jasmonaten vergleichbare Bildung bzw. Freisetzung von Phytoalexinen auslösen können (Imbusch und Mueller, 2000a; Thoma *et al.*, 2003).

Für eine umfassende Untersuchung der biologischen Aktivität von Phytoprostanen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren ist die Verfügbarkeit größerer Mengen (ca. 50 mg) der reinen Verbindungen notwendig. Bisher wurden Phytoprostane ausschließlich durch *in vitro*-Autoxidation von α -Linolensäure hergestellt (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998). Bedingt durch den radikalischen Reaktionsmechanismus kann dabei neben einer Vielzahl weiterer oxygenierter Fettsäuren in Analogie zu den Isoprostanen eine Mischung aller drei theoretisch möglichen Phytoprostan-Klassen PPD₁, PPE₁ und PPF₁ gebildet werden. Jede dieser Verbindungsklassen besteht theoretisch aus zwei Regioisomeren mit jeweils 16 Stereoisomeren. Die Cyclopentanon-Phytoprostane E₁ sind im Gegensatz zu den F₁-Phytoprostanen instabil und können unter Wasserabspaltung in die Cyclopentenon-Phytoprostane A₁/B₁ mit theoretisch 8 bzw. 4 Stereoisomeren umgelagert werden, so dass sich allein für die bisher charakterisierten Phytoprostane (PPE₁, PPF₁, PPA₁ und PPB₁) eine Anzahl von 76 Stereoisomeren ergibt. Eine chromatographische Auftrennung einzelner Phytoprostan-Klassen und insbesondere eine Gewinnung einzelner Stereoisomere ist aufgrund der Komplexität der Mischung sehr aufwendig.

Schon eine Isolierung einzelner Enantiomere der B₁-Phytosterane, die lediglich aus vier Stereoisomeren bestehen, ist mit mehreren chromatographischen Aufreinigungsschritten verbunden und liefert insgesamt nur geringe Ausbeuten der gewünschten Verbindungen (Thoma, 2003).

Die große Anzahl an Isomeren führt auch zu Problemen bei der Untersuchung dieser Verbindungen auf biologische Aktivität. Einzelne PPB₁-Regioisomere, die als racemische Mischung eingesetzt wurden, führten in *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen zu einer unterschiedlichen Scopoletin-Akkumulation. Während das Typ II-Regioisomer zu einer verstärkten Freisetzung von Scopoletin führte (siebenfach im Vergleich zur Kontrolle), zeigte das Regioisomer vom Typ I mit einer Verdopplung der Scopoletin-Konzentration eine deutlich schwächere Aktivität (Thoma *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass einzelne Regioisomere einer Phytosteran-Klasse deutliche Aktivitätsunterschiede aufweisen können, obwohl sie sich nur in der Länge der Seitenketten am Ringsystem unterscheiden.

Nach Behandlung von pflanzlichen Zellsuspensionskulturen mit einer lediglich vorgereinigten PPF₁-Isomerenmischung konnte in verschiedenen Testsystemen, z.B. in *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae), ebenfalls eine Akkumulation von Phytoalexinen nachgewiesen werden, wohingegen einzelne, durch HPLC gereinigte, racemische PPF₁-Regioisomere in dem oben genannten Testsystem nicht aktiv waren (Imbusch, 2001). Eine Ursache für diese Beobachtung könnte sein, dass die durch Autoxidation gewonnene und lediglich vorgereinigte PPF₁-Isomerenmischung noch andere Lipidperoxidationsprodukte als Verunreinigung enthielt, auf die die biologische Aktivität der Testmischung zurückzuführen ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass nur einige der insgesamt 32 PPF₁-Stereoisomere eine Phytoalexin-Akkumulation induzieren können, diese jedoch nicht unter den getesteten Verbindungen waren, da bisher lediglich vier Regioisomere, jeweils als Racemate, isoliert werden konnten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass zur Untersuchung der biologischen Aktivität von Phytosteranen einzelne Isomere mit bekannter Stereochemie eingesetzt werden sollten. Eine Isolierung ausreichender Mengen hierfür sowie zur genauen Strukturaufklärung der Verbindungen, z.B. die Bestimmung der absoluten Konfiguration einzelner Enantiomere mittels Circular dichroismus-Spektrometrie (CD), ist über eine chromatographische Auftrennung von α -Linolensäure-Autoxidationsgemischen kaum durchführbar. Hier bietet sich eine stereoselektive Totalsynthese einzelner Verbindungen an. Inzwischen sind sowohl für die F₁-Phytosterane (Fangour *et al.*, 2003) als auch für die E₁-Phytosterane Totalsynthesen für die ersten Typ I-Isomere beschrieben worden (Rodriguez und Spur, 2003). Die Typ-II-Isomere werden in Kürze ebenfalls zur Verfügung stehen (W. Spur, persönliche Mitteilung).

Die beiden Phytoprostan-Klassen E₁ und F₁ konnten bereits früher durch *in vitro*-Autoxidation von α -Linolensäure gewonnen und charakterisiert werden. Durch die Verfügbarkeit dieser Verbindungen konnten anschließend analytische Methoden entwickelt werden, mit denen es gelang, diese Verbindungen in Pflanzen nachzuweisen (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998). In Tieren konnte neben den E- und F-Ring-Verbindungen auch Prostaglandin D₂-Analoge, D₂-Isoprostane, identifiziert werden (Morrow *et al.*, 1990a; Morrow *et al.*, 1990b; Morrow *et al.*, 1994). Da es sich bei der Biosynthese der Phytoprostane wie bei der Bildung der Isoprostane um eine nichtenzymatische Reaktion handelt, müssen bei der Umlagerung der gemeinsamen Vorstufe aller Phytoprostane, dem Bicyclo-Endoperoxid PPG₁, auch D₁-Phytoprostane gebildet werden. Eine Charakterisierung bzw. ein Nachweis dieser dritten theoretisch möglichen Phytoprostanklasse in Pflanzen gelang bisher noch nicht.

Aus der Prostaglandin-Chemie ist bekannt, dass PGD₂, ein Hauptprodukt des Cyclooxygenase-Wegs, leicht unter Wasserabspaltung in Cyclopentenon-Prostaglandine umgewandelt werden kann. Eines der dabei gebildeten Produkte ist 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) (Fitzpatrick und Wynalda, 1983; Maxey *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2002). In Analogie zu Prostaglandin D₂ sollten aus D₁-Phytoprostanen durch Wasserabspaltung und Umlagerung ebenfalls dPPJ₁-Cyclopentenone gebildet und in Pflanzen nachgewiesen werden können. Bei diesen Verbindungen fällt auf, dass sie eine große strukturelle Ähnlichkeit zu 12-Oxo-Phytodiensäure aufweisen. Neben der für beide dPPJ₁-Regioisomere und OPDA charakteristischen α,β -ungesättigten Carbonylfunktion unterscheidet sich das Typ \dagger Regioisomer nur durch eine zusätzliche Doppelbindung von enzymatisch gebildeter OPDA.

12-Oxo-Phytodiensäure ist nicht nur eine Zwischenstufe in der Jasmonsäure-Biosynthese, sondern weist ein mit Jasmonsäure überlappendes, eigenes Wirkungsspektrum auf (Stintzi *et al.*, 2001; Weber, 2002). Ein Teil der biologischen Aktivität von OPDA ist auf die reaktive funktionelle Gruppe zurückzuführen (Farmer *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit sind von den Deoxy-J₁-Phytoprostanen ebenfalls Effekte bzw. eine Modulation der Genexpression zu erwarten, die mit der von OPDA vergleichbar sind. Interessanterweise führen auch zahlreiche andere α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone zu einer veränderten Genexpression in Pflanzen, dazu gehören zum Beispiel Ketodiene bzw. Ketotriene (Vollenweider *et al.*, 2000) sowie 2(E)-Alkenale und Malondialdehyd (Alméras *et al.*, 2003). Diese Verbindungen können infolge einer enzymatischen und nicht-enzymatischen Lipidperoxidation, z.B. nach Verwundung oder Pathogenbefall, in

pflanzlichen Geweben akkumulieren (Alméras *et al.*, 2003; Croft *et al.*, 1993; Vollenweider *et al.*, 2000).

Eine Induktion der Phytoprostan-Biosynthese, ausgelöst durch freie Radikale, konnte bisher bei verschiedenen Formen von oxidativem Stress in Pflanzen beobachtet werden. Dabei führten sowohl abiotische Faktoren, wie die Zugabe von Schwermetallen zu Zellsuspensionskulturen oder eine mechanische Verwundung von Blättern, als auch biotische Faktoren wie Pathogenbefall zu einer teilweise dramatischen Konzentrationserhöhung aller bisher untersuchten Phytoprostane (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Thoma *et al.*, 2003), so dass auch bei den Deoxy-J₁-Phytoprostanen eine verstärkte Bildung infolge von oxidativem Stress zu beobachten sein sollte.

Phytoprostane können in pflanzlicher Nahrung vorkommen, z.B. in partiell autoxydierten Pflanzenprodukten, oder in Arzneipflanzen. In verschiedenen, getrockneten Arzneidrogen konnten große Mengen sowohl freier als auch in Zellmembranen veresterter F₁-Phytoprostane nachgewiesen werden (siehe V.3) (Imbusch und Mueller, 2000a). α -Linolensäure als gemeinsame Vorstufe aller Phytoprostane ist nicht nur ein häufiger Bestandteil von pflanzlichen Zellmembranen, sondern ist auch in vielen fetten Ölen, z.B. in Sojaöl, in veresterter Form in Triglyceriden enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass durch Autoxydation dieser Öle große Mengen von F₁-Phytoprostanen gebildet werden (siehe unten) (Imbusch, 2001). Eine Untersuchung fetter Öle auf ihren Gehalt an Cyclopentenon-Phytoprostanen wurde noch nicht durchgeführt, vermutlich kommen diese Verbindungen ebenfalls verestert in Triglyceriden vor.

Phytoprostane weisen nicht nur eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Jasmonaten, sondern auch zu den tierischen Prostaglandinen und Isoprostanen auf. Phytoprostane kommen in Pflanzen in einer vielfach höheren Konzentration vor, als die strukturell verwandten Prostaglandine bzw. Isoprostane in Tieren (Loeffler *et al.*, 2003). Angesichts dieser Konzentrationsunterschiede stellt sich die Frage, inwieweit Phytoprostane die Prostaglandin-Signaltransduktion pharmakologisch beeinflussen können. Interessant ist dies insbesondere bei den Deoxy-J₁-Phytoprostanen, da in den vergangenen Jahren verschiedene Mechanismen aufgeklärt wurden, die zeigen, wie Cyclopentenon-Prostaglandine ihre Aktivität vermitteln. Im Gegensatz zu den Cyclopentan(on)-Prostaglandinen, für die je mindestens ein klassischer, membranständiger Rezeptor identifiziert wurde (Narumiya *et al.*, 1999), können Cyclopentenone wie 15d-PGJ₂ z.B. durch Interaktion mit Kernrezeptoren wie PPAR γ oder aufgrund ihrer α,β -ungesättigten Carbonylfunktion durch eine kovalente Modifikation von Zielproteinen wie den Transkriptionsfaktor NF- κ B wirken (Straus und Glass, 2001).

Eine Strukturaufklärung bzw. der Nachweis von D₁-Phytoprostanen und Deoxy-J₁-Phytoprostanen in Pflanzen konnte jedoch mangels Referenzverbindungen bisher noch

nicht durchgeführt werden. Deshalb war es notwendig, die gesuchten Verbindungen zuerst in größeren Mengen durch Synthese herzustellen, um ausreichende chromatographische und massenspektrometrische Daten zur Entwicklung geeigneter Nachweismethoden und zur Überprüfung einer biologischen Wirksamkeit dieser Verbindungen zu erhalten.

Mit ähnlichen Problemen hatte auch die Prostaglandin-Forschung in ihren Anfängen zu kämpfen, da diese Verbindungen in biologischen Systemen oftmals nur im picomolaren Konzentrationsbereich vorkommen. Die Gewinnung ausreichender Mengen für eine weitergehende klinische Untersuchungen gelang erst mit der Entdeckung, dass große Mengen (bis zu 1,3 %) an Prostaglandin A₂-Derivaten aus der karibischen Koralle *Plexaura homomalla* isoliert und durch synthetische Modifikationen in Prostaglandin E₂ und F_{2α} überführt werden konnten (Bundy, 1985). Bereits in den 70er Jahren wurden verschiedene Möglichkeiten zur Totalsynthese von Prostaglandin D₂ bzw. PGD₁ entwickelt (Hart *et al.*, 1979; Jenny *et al.*, 1974). Eine partialsynthetische Herstellung von Prostaglandin D₂ durch eine selektive Oxidation von Prostaglandin F_{2α} nach Einführung spezifischer Schutzgruppen wurde 1975 veröffentlicht (Nishizawa *et al.*, 1975). Eine Oxidation von Prostaglandinen der E und F-Serie ohne Schutzgruppe für die Hydroxy-Funktion in der Seitenkette führt neben geringen Mengen von Trioxo-Verbindungen vor allem zu einer Mischung der entsprechenden 15-Oxo-Analoga von Prostaglandinen D, E und F (Doehl und Greibrokk, 1989).

Eine Durchführung der Partialsynthese mit einer F₁-Phytoprostan-Isomerenmischung ergab eine Mischung aller D₁- und E₁-Phytoprostane im Verhältnis von ca. 3 : 1. Die als Ausgangsverbindung der Partialsynthese eingesetzte PPF₁-Fraktion enthielt neben den cyclischen Verbindungen unter anderem offenkettigen Trihydroxy-Verbindungen, die sowohl durch Autoxidation (O'Connor *et al.*, 1981) als auch durch Photooxidation (Frankel, 1998) von α-Linolensäure gebildet werden können. Die partialsynthetische Gewinnung von PPD₁ gestaltete sich durch diese Kontaminationen schwierig, da bei jedem Reaktionsschritt die Menge an unerwünschten Nebenprodukten deutlich zunahm und die Gesamtausbeute somit insgesamt weit unter der von Nishizawa *et al.* (1975) erreichten Ausbeute lag.

Eine chromatographische Isolierung einzelner PPD₁-Isomere aus dieser Mischung bzw. die Abtrennung der als Nebenprodukt gebildeten E₁-Phytoprostane war aufgrund dieser Probleme nicht durchführbar. Die über diesen Syntheseweg hergestellte PPD₁/E₁-Mischung konnte durch Säurebehandlung in Deoxy-J₁/A₁-Phytoprostane überführt werden. Es gelang, jeweils mg-Mengen der beiden dPPJ₁-Regioisomere bzw. geringere Mengen von dPPA₁ zu isolieren, um diese Verbindungen chromatographisch sowie spektrometrisch zu charakterisieren.

Mittels hochauflösender Massenspektrometrie im EI-Modus konnte die exakte Molekülmasse ($304,2039 \pm 5\text{ppm}$) der zum Methylester umgesetzten Cyclopentenone ermittelt werden. Die erhaltenen Werte bestätigten die Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{C}_3$) der Deoxy-J₁/A₁-Phytosterane, die mit den postulierten Strukturformeln übereinstimmte. Die Regioisomerie der einzelnen Cyclopentenone und insbesondere die Position der Seitenketten bezüglich der Carbonylfunktion im Ringsystem konnten anhand der Massenspektren allerdings nicht eindeutig festgelegt werden. Durch eine Reduktion der in den Molekülen enthaltenen Doppelbindungen konnten die Verbindungen so modifiziert werden, dass diese Zuordnung aufgrund der charakteristischen Fragmentierungsmuster eindeutig möglich war. Zudem war mit katalytisch hydrierter 12-Oxo-Phytodiensäure eine authentische Referenzverbindung für das Typ I-Regioisomer von dPPJ₁ verfügbar.

Kreuzkonjugierte Cyclopentenone wie 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ oder dPPJ₁ sind lichtempfindliche und instabile Verbindungen, die schon bei normalem Tageslicht und Raumtemperatur bezüglich der Doppelbindungskonfiguration isomerisieren können (Maxey *et al.*, 2000). Die Konfiguration der konjugierten Dien-Einheit in der Seitenkette von 15d-PGJ₂ wurde von Fitzpatrick und Wynalda (1983) ursprünglich mit *trans-trans-D*^{12,14} angegeben, aktuellere Untersuchungen von Maxey *et al.* (2000) kommen jedoch zu anderen Ergebnissen. Der seit 1990 auch kommerziell erhältliche PGD₂-Metabolit 15d-PGJ₂ ist keine isomerenreine Substanz, sondern eine Mischung verschiedener geometrischer Isomere dieser Verbindung (Maxey *et al.*, 2000). Das Hauptisomer von 15d-PGJ₂ weist eine *trans,cis-D*^{12,14}-Orientierung der Dien-Einheit auf, während das von Fitzpatrick und Wynalda beschriebene Isomer lediglich ein Nebenprodukt der Abbaureaktion darstellt (Maxey *et al.*, 2000). Theoretisch können bei den dPPJ₁-Phytosteranen insgesamt vier geometrische Isomere je Regioisomer entstehen (siehe Abbildung V.1). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass auch hier in Analogie zu 15d-PGJ₂ ebenfalls bevorzugt die thermodynamisch stabileren Isomere mit einer *trans-cis*-Konfiguration der konjugierten Doppelbindungen gebildet werden. Die relative Konfiguration der Cyclopentenon-Phytosterane konnte allerdings noch nicht eindeutig über Kernresonanzspektroskopie (NMR) bestimmt werden, da die einzelnen Regioisomere der Cyclopentenon-Phytosterane als Isomerenmischung vorlagen.

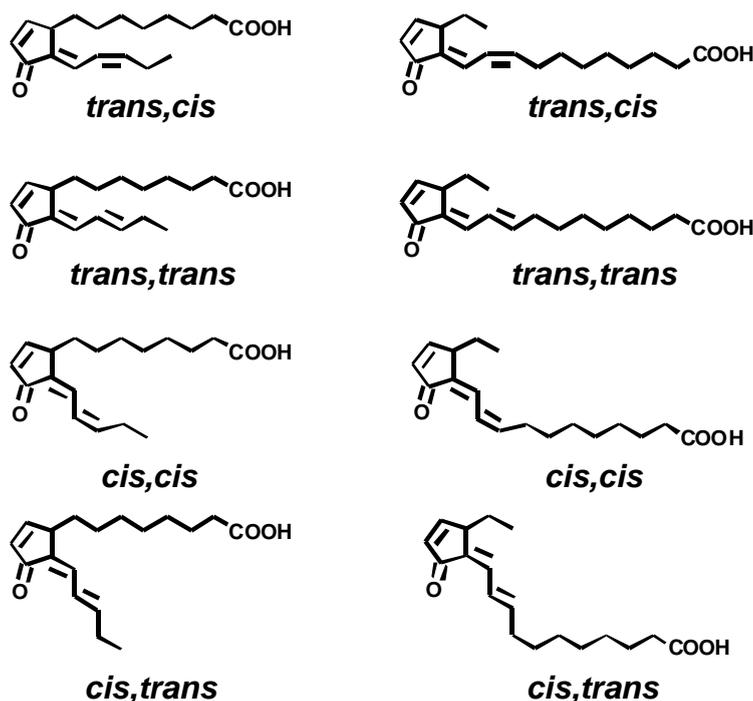


Abbildung V.1: Alle geometrischen Isomere von Deoxy-J₁-Phytostanen.

In den ersten Jahren nach der Isolierung und Charakterisierung bestand nur geringes Interesse an 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂, bis 1995 gezeigt werden konnte, dass 15d-PGJ₂ ein potenter endogener Ligand für den Kernrezeptor PPAR γ ist (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Im Folgenden konnten in verschiedenen tierischen Modellen weitere biologische Aktivitäten dieses Cyclopentenon-Prostaglandins nachgewiesen werden [siehe V.3 und Übersicht in (Straus und Glass, 2001)], obwohl diese Verbindung zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Die Experimente wurden alle mit käuflich erwerbbares 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ durchgeführt. Seit 1995 gibt es verschiedene Quellen für 15d-PGJ₂, die jedoch alle eine unterschiedliche Qualität bezüglich der Isomerenreinheit aufweisen (Maxey *et al.*, 2000). In zwei unterschiedlichen Bioassays konnten mit einigen isomerenrein eingesetzten Verbindungen z.T. deutliche Aktivitätsunterschiede festgestellt werden, wobei das von Fitzpatrick beschriebene Isomer in einigen Bioassays nur wenig aktiv ist (Maxey *et al.*, 2000). Unter Umständen sind die in anderen Studien erhaltenen z.T. widersprüchlichen Ergebnisse (Thieringer *et al.*, 2000; Vaidya *et al.*, 1999) auf unterschiedliche Konfigurationen des verwendeten 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandins J₂ zurückzuführen, was für eine Interpretation der meisten auf diesen Weg erhaltenen Aussagen berücksichtigt werden muss. Ein ebenfalls kommerziell verfügbarer Immunoassay zum Nachweis dieser Verbindung wurde inzwischen vom Markt genommen (Maxey *et al.*, 2000). Bei dieser Problematik könnte

der Einsatz totalsynthetisch hergestellter Verbindungen mit definierter Stereochemie Abhilfe schaffen. Aufgrund der Photolabilität dieser Substanzen kann allerdings selbst beim Einsatz reiner Verbindungen eine weitere Isomerisierung, verbunden mit eventuellen Aktivitätsunterschieden einzelner Isomere, während der Durchführung des Experiments oder bei der Probenaufarbeitung nicht ausgeschlossen werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Deoxy-J₁-Phytoprostane liegen ebenfalls als Isomerenmischung vor, da sie im Gegensatz zu den enzymatisch gebildeten Prostaglandinen direkt durch Autoxidation von α -Linolensäure bzw. durch Partialsynthese aus F₁-Phytoprostan-Isomerenmischungen gewonnen wurden. Ein Vorteil dieser Herstellungsmethode ist, dass die tatsächlichen Verhältnisse der Stereoisomere, wie sie zum Beispiel bei oxidativem Stress in Pflanzen entstehen können, am besten wiedergespiegelt werden. Eine synthetische Herstellung einzelner Phytoprostan-Isomere ist aufgrund der großen Anzahl an Isomeren sehr aufwendig und kann zudem zu einer falschen Einschätzung bei Untersuchungen der biologischen Aktivität führen, da einzelne Isomere in Pflanzen unter Umständen in deutlich unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen bzw. entstehen können.

Die Gewinnung einzelner Phytoprostane auf chemischem Wege ist dennoch sinnvoll, da oftmals nur so ausreichende Mengen entsprechend reiner und stereochemisch definierter Verbindungen isoliert werden können. Inzwischen ist es aufgrund des steigenden Interesses an Cyclopentenonen gelungen, sowohl A₂-Isoprostan-Isomere (Zanoni *et al.*, 2003a) als auch J₂-Isoprostan-Isomere (Zanoni *et al.*, 2003b) durch Totalsynthese herzustellen. Zudem wurde eine Methode entwickelt, um Prostaglandin A₂ in die entsprechende J₂-Verbindung zu überführen (Zanoni *et al.*, 2003c). Erst vor kurzem gelang die Totalsynthese der ersten dPPJ₁-Regioisomere in enantiomerenreiner Form (Dr. Paul Evans, Dept. of Chemistry, Trinity College, Dublin, Irland; unveröffentlicht), die Substanzen wurden uns kürzlich zugänglich gemacht. Eine Synthese von Cyclopentenon-Phytoprostanen A₁ und B₁ ist dagegen bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

V.2 Vorkommen von Cyclopentenon-Isoprostanen in der Natur

Die Aufklärung verschiedener physiologischer Effekte von Cyclopentenon-Prostaglandinen/Isoprostanen wirft die Frage auf, ob diese Verbindungen *in vivo* in einer für eine biologische Aktivität notwendigen Konzentration gebildet werden können. Eine kritische Beurteilung älterer Befunde über das Vorkommen von Cyclopentenonen in Tieren und Menschen ist notwendig, da die Umwandlung von Prostaglandinen bzw. Isoprostanen der D- und E-Familie auch *in vitro* ablaufen kann, z.B. während der Lagerung oder der Aufarbeitung der Proben (Straus und Glass, 2001).

Während es sich bei den in früheren Untersuchungen von biologischen Proben nachgewiesenen Cyclopentenonen PGA und PGB möglicherweise um Artefakte handelte (Straus und Glass, 2001), gelang es in neueren Arbeiten jedoch, Cyclopentenone nach schonender Aufarbeitung zweifelsfrei nachzuweisen. So konnte Δ^{12} -PGJ₂ im menschlichen Urin mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (EIA) detektiert werden (Hirata *et al.*, 1988). Zudem konnte eine Bildung von Δ^{12} -PGJ₂ und PGJ₂ in murinen Mastzellen über HPLC kombiniert mit einem Radioimmunoassay (RIA) nachgewiesen werden (Haberl *et al.*, 1998).

Physiko-chemische Beweise für die Existenz von 15-Deoxy-Prostaglandin J₂ mittels Massenspektrometrie gibt es bis jetzt nur vereinzelt. Thévenon *et al.* bestimmten freies 15d-PGJ₂ mittels GC-MS im menschlichen Urin in einem Konzentrationsbereich um 1,2 µg/l (Thévenon *et al.*, 2001). Zudem konnte diese Verbindung mittels HPLC-MS/MS in picomolaren Konzentrationen im Medium von Präadipozyten bzw. intrazellulär im Bereich von $1,0 \pm 0,4$ nM detektiert werden (Bell-Parikh *et al.*, 2003). Dieser Zelltyp ist aufgrund der Beteiligung von PPAR γ an der Adipogenese von besonderem Interesse (siehe V.3) (Bell-Parikh *et al.*, 2003). Nichtenzymatisch gebildete Cyclopentenone wie A₂/J₂-Isoprostane bzw. A₄/J₄-Neuroprostane wurden dagegen bisher nur in veresterter Form nachgewiesen (Chen *et al.*, 1999; Fam *et al.*, 2002).

Es war deshalb eine große Überraschung, als gezeigt werden konnte, dass Cyclopentenone mit dem Isoprostan/Prostaglandin A- und B-Ringsystem in verhältnismäßig hohen Konzentrationen in Pflanzen vorkommen, obwohl sie über einen biochemisch analogen Mechanismus wie die tierischen Isoprostane gebildet werden. In verschiedenen Pflanzenspezies wurden Konzentrationen von bis zu 131 ng/g TG für A₁/B₁-Phytprostane ermittelt (Thoma *et al.*, 2003). Diese Konzentrationen liegen im Bereich der enzymatisch gebildeten Jasmonate wie z.B. 12-Oxo-Phytodiensäure, die in Pflanzen in Konzentrationen von ca. 0.01 - 1 µg/g FG vorkommt (Stelmach *et al.*, 1998).

Darüber hinaus wurde bereits 1981 von Bohlmann *et al.* eine - zu diesem Zeitpunkt neuartige - Klasse Prostaglandin-ähnlicher Octadecanoide in luftgetrockneten, oberirdischen Pflanzenteilen von verschiedenen *Chromolaena*-Spezies identifiziert (Bohlmann *et al.*, 1981). Diese Verbindungen weisen eine sehr große Ähnlichkeit zu OPDA und dPPJ₁ auf, wobei eine der Bohlmann'schen Verbindungen identisch mit dPPJ₁-I ist (siehe I.3.3) (Bohlmann *et al.*, 1982a; Bohlmann *et al.*, 1981; Bohlmann *et al.*, 1982b). Die Biosynthese dieser Verbindungen blieb für lange Zeit jedoch rätselhaft. Ursprünglich wurde von Bohlmann *et al.* vorgeschlagen, dass diese Verbindungen analog zur Biosynthese von Prostaglandinen durch einen Cyclooxygenase-abhängigen Weg über Prostaglandin-G-ähnliche Zwischenstufen aus α -Linolensäure gebildet werden (Bohlmann *et al.*, 1982a; Bohlmann *et al.*, 1981). Allerdings konnte bisher

- trotz intensiver Bemühungen - eine Cyclooxygenase-Enzymaktivität in Pflanzen nicht nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit zur Bildung von cyclischen Verbindungen stellt in Pflanzen der Allenoxid-Synthase-/Cyclase-Weg (AOS, AOC) dar, über den aus α -Linolensäure OPDA biosynthetisiert werden kann (Mueller, 1997). OPDA wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Bohlmann'schen Verbindungen später als mögliche Vorstufe diskutiert. Dieser Hypothese zufolge wird zunächst die Verbindung 1 (siehe Abbildung I.18) durch Hydroxylierung von OPDA an Position C-13 gebildet. dPPJ₁-I (2) könnte dann durch Dehydratisierung aus Verbindung 1 gebildet werden. Die Verbindung 3 würde dieser Hypothese zufolge aus dPPJ₁ durch Hydroxylierung in Position C-8 entstehen (Grechkin, 1995). Bisher scheiterten jedoch alle Versuche, exogene OPDA in einem pflanzlichen System in eine der von Bohlmann *et al.* isolierten Verbindungen umzuwandeln (Grechkin, 1995).

Deshalb wurde ein weiterer Biosyntheseweg vorgeschlagen. Dieser verläuft über ein α -Ketol, welches als Nebenprodukt des Allenoxid-Synthase-Wegs gebildet wird (Grechkin, 1998; Grechkin, 1995). Das über diesen Weg aus 13(S)-Hydroperoxylinolensäure gebildete Allenoxid ist instabil und kann entweder zu einem α -Ketol bzw. γ -Ketol hydrolysiert werden oder spontan zu racemischer 12-Oxo-Phytodiensäure cyclisieren (Blee, 1998). Es wurde postuliert, dass aus dem α -Ketol über α - oder γ -Diketon-Zwischenstufen die Verbindung 1 gebildet werden kann. Allerdings wurden weder die Diketone, noch Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, in Pflanzen aufgefunden (siehe Abbildung I.18) (Grechkin, 1995). Somit gibt es bisher keine experimentelle Evidenz für einen dieser postulierten Wege.

Eine attraktive neue Hypothese besteht darin, dass die Bohlmann'schen Verbindungen über den von uns postulierten D₁-Phytoprostan-Weg gebildet werden. Dieser Hypothese zufolge wird zunächst die Verbindung 2 auf nichtenzymatischem Weg gebildet. Von Verbindung 2 leiten sich die Cyclopentenone 1 und 3 durch Hydratisierung bzw. Hydroxylierung ab. Falls diese Hypothese stimmt, kann eine Reihe von Voraussagen getroffen werden, die experimentell überprüft werden können. So sollte neben dem bereits identifizierten Regioisomer (Typ I) ein weiteres Isomer existieren, das die Struktur von dPPJ₁ Typ II aufweist. Bedingt durch den radikalischen Synthesemechanismus sollten diese Verbindungen nicht auf *Chromolaena*-Spezies beschränkt sein, sondern ubiquitär in allen Pflanzen vorkommen. Aufgrund der nichtenzymatischen Biosynthese müsste das Cyclopentenon 2 (dPPJ₁-I) als racemische Mischungen gebildet werden. Neben den Cyclopentenonen dPPJ₁ sollten zudem auch die postulierten Vorstufen dieser Substanzen, die Cyclopentanon-Verbindungen PPD₁, in Pflanzen nachgewiesen werden können. Wie bisher schon für

verschiedene Phytoprostane gezeigt werden konnte, ist auch bei dieser Phytoprostan-Klasse eine verstärkte Bildung infolge von oxidativem Stress zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden postulierten dPPJ₁-Regioisomere tatsächlich in gesunden Pflanzen vorkommen. *Chromolaena*-Pflanzenmaterial stand uns für Untersuchungen nicht zur Verfügung. Stattdessen wurden drei Pflanzenspezies (die Modellpflanzen *A. thaliana*, *N. tabacum* und *L. esculentum*) untersucht. In allen drei Pflanzen konnten dPPJ₁ vom Typ I (entsprechend dem Cyclopentenon 2) und Typ II quantifiziert werden. Dieser Befund legt nahe, dass diese Verbindungen - ähnlich wie die anderen Phytoprostane - weitverbreitet oder sogar ubiquitär in allen Pflanzen vorkommen. Bemerkenswerterweise kann die von uns gefundene Typ II-Verbindung von dPPJ₁ weder aus Metaboliten des Allenoxid-Synthese-Wegs, noch über einen anderen bekannten Oxylin-Weg *in planta* biosynthetisiert werden. Die Bildung dieser Cyclopentenone konnte entsprechend der Voraussage durch abiotische Stimuli, die eine vermehrte Bildung von freien Radikalen *in vivo* bewirken, induziert werden. Darüber hinaus konnten auch die beiden postulierten PPD₁-Regioisomere, die biosynthetischen Vorstufen dieser Verbindungen, in den Pflanzen nachgewiesen werden. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die von Bohlmann *et al.* charakterisierte Verbindung 2 bzw. die von uns identifizierten dPPJ₁ als Racemate gebildet werden. Interessanterweise hat Bohlmann alle vier theoretisch möglichen geometrischen Isomere des Cyclopentenons 2 (*cis,cis*; *cis,trans*; *trans,cis*; *trans,trans*) in *Chromolaena*-Spezies gefunden (Bohlmann *et al.*, 1982a; Bohlmann *et al.*, 1982b). Auch dieser Befund deutet darauf hin, dass die Bohlmann'sche Verbindung 2 nicht enzymkatalysiert, sondern nichtenzymatisch gebildet wird und somit als Racemat vorliegen sollte. Die stereochemische Orientierung der Carboxyl-Seitenkette bezüglich des Ringsystems wurde nicht näher untersucht. Zusammengefasst sprechen alle bisher erhaltenen Befunde dafür, dass der ursprünglich von Bohlmann *et al.* vorgeschlagene Biosyntheseweg über Prostaglandin G-ähnliche Zwischenstufen im Prinzip korrekt ist (Bohlmann *et al.*, 1982a; Bohlmann *et al.*, 1981).

Beide dPPJ₁-Regioisomere sollten, bedingt durch die postulierte nichtenzymatische Biosynthese, *in vitro* und *in vivo* in annähernd gleichen Konzentrationen vorkommen. Aufgrund des radikalischen Reaktionsmechanismus des D₁-Phytoprostan-Wegs erscheint eine Bildung beider Regioisomere gleich wahrscheinlich. Da die Verbindungen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den enzymatisch gebildeten Jasmonaten aufweisen, ist aber auch eine Beteiligung von Enzymen an der Biosynthese dieser Verbindungen nicht vollständig auszuschließen.

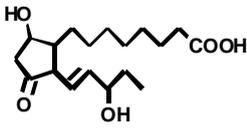
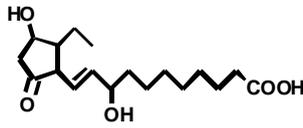
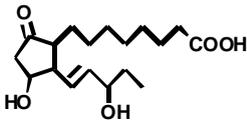
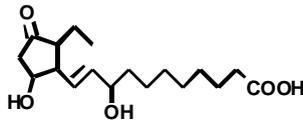
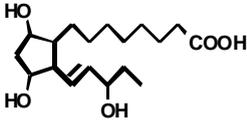
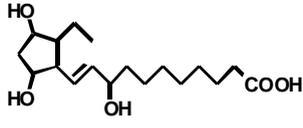
Das Verhältnis der beiden möglichen Regioisomere war bei allen bisher nachgewiesenen Phytoprostan-Klassen in der Regel 1 : 1, unabhängig davon, ob die Verbindungen *in vivo* oder *in vitro* entstehen (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998), so dass ein vergleichbares Ergebnis auch hier zu erwarten war. Die Herstellung von dPPJ₁ durch eine *in vitro*-Autoxidation von α -Linolensäure bestätigte diese Annahme, beide Regioisomere wurden ca. in einem Verhältnis von 1 : 1 gebildet. In allen untersuchten Pflanzen konnte jedoch sowohl das dPPJ₁-II-Regioisomer als auch das entsprechende PPD₁-II-Regioisomer in deutlich höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Das Verhältnis der Typ I-Regioisomere lag im Vergleich zu Typ II *in planta* bei ca. 1 : 1,4 - 5,7. Dieser Befund könnte ein Hinweis für eine enzymatische Beteiligung entweder bei der Entstehung oder - aufgrund der Beobachtungen der *in vitro*-Synthese eher wahrscheinlich - bei der Metabolisierung dieser Verbindungen sein. Bisher ist zur Metabolisierung dieser Substanzen jedoch nichts bekannt (siehe unten).

Der Nachweis von PPD₁ und Deoxy-J₁-Phytoprostanen in pflanzlichen Proben erwies sich als nicht trivial. Mit den klassischen Methoden der Prostaglandin-Chemie und der Isoprostan-Analytik (GC-MS) konnten diese Verbindungen nicht analysiert werden. Dies lag einerseits an der Instabilität dieser Verbindungen sowie an der Anfälligkeit der kreuzkonjugierten Cyclopentenone zur Isomerisierung, andererseits an der Anwesenheit einer in pflanzlichen Geweben ubiquitär nachweisbaren Kontamination. Deshalb musste eine neue, spezifische Methode zum Nachweis dieser Verbindungen entwickelt werden. Cyclopentenone sind α,β -ungesättigte Verbindungen, die leicht mit freien Thiolen nucleophile Michael-Additionen eingehen können (Chen *et al.*, 1999). Eine Konjugation erfolgt dabei bevorzugt in β -Position zur Carbonylgruppe im Ringsystem (Maxey *et al.*, 2000). Durch diese reaktive funktionelle Gruppe war es möglich, die Cyclopentenone selektiv an einen Fluoreszenzmarker zu koppeln und mittels Fluoreszenz-HPLC zu bestimmen. Neben den Cyclopentenon-Phytoprostanen konnte durch diese Methode parallel 12-Oxo-Phytodiensäure miterfasst werden. Mittels dieser neuentwickelten Nachweismethode konnte analysiert werden, ob PPD₁ und dPPJ₁ in ähnlichen Konzentrationen in Pflanzenmaterial gebildet werden können, wie Jasmonate oder die bereits charakterisierten Phytoprostane, z.B. die Cyclopentenon-Verbindungen PPA₁ und PPB₁.

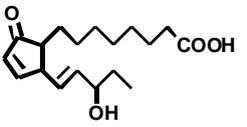
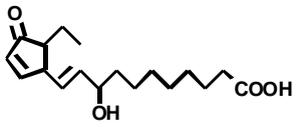
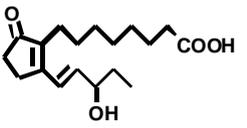
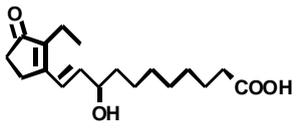
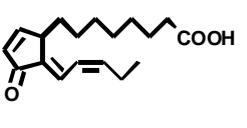
Untersuchungen von frischen, unverwundeten Blättern von *A. thaliana* Ecotyp Columbia, *N. tabacum* ssp. Samson und *L. esculentum* var. Moneymaker zeigten, dass die gesuchten Verbindungen dPPJ₁ und ihre biosynthetischen Vorläufer PPD₁ in allen drei Spezies vorkommen (siehe Tabelle IV.2). Im Vergleich zu allen anderen bisher quantifizierten Phytoprostanen zeigt sich am Beispiel von *L. esculentum*, dass sowohl dPPJ₁ als auch PPD₁ in deutlich höheren Konzentrationen vorkommen als andere

Phytosteran-Klassen. Zumindest für diese Modellpflanze stellen diese Verbindungen die Hauptprodukte des Radikal-katalysierten Phytosteran-Wegs dar (siehe Abbildung V.2).

Cyclopentan(on)-Phytosterane [ng/g TG]

	PPD₁-I 459 ± 130		PPD₁-II 698 ± 161
	PPE₁-I 35 ± 8		PPE₁-II 35 ± 12
	PPF₁-I 75 ± 25		PPF₁-II 75 ± 25

Cyclopentenon-Phytosterane [ng/g TG]

	PPA₁-I 3.3 ± 2.0		PPA₁-II 1.2 ± 2.0
	PPB₁-I 1.2 ± 1.1		PPB₁-II 0.75 ± 1.5
	dPPJ₁-I 293 ± 20		dPPJ₁-II 1668 ± 202

Jasmonate [ng/g TG]

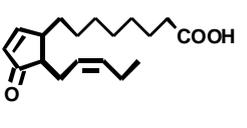
	12-Oxo-Phyto- diensäure 212 ± 51		Jasmonsäure 20 ± 5
---	--	--	------------------------------

Abbildung V.2: Übersicht über alle bisher in *L. esculentum* nachgewiesenen Phytosterane im Vergleich zu den Jasmonaten.

Der Befund, dass Phytoprostane (PPA₁, PPB₁, PPE₁ und PPF₁) seit 1998 in über 20 Pflanzen aus taxonomisch unterschiedlichen Pflanzenfamilien nachgewiesen werden konnten, sowie das Vorkommen der über den D₁-Phytoprostan-Weg gebildeten Substanzen in drei verschiedenen Pflanzenspezies lässt darauf schließen, dass diese Verbindungen ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet sind (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b; Parchmann und Mueller, 1998; Thoma *et al.*, 2003).

dPPJ₁-I, die Verbindung mit der größten Ähnlichkeit zu 12-Oxo-Phytodiensäure, konnte in derselben Größenordnung nachgewiesen werden wie enzymatisch gebildete OPDA. Die mit dieser Methode für OPDA erhaltenen Konzentrationen waren mit den über konventionelle GC-MS-Methoden ermittelten Werten vergleichbar (Stelmach *et al.*, 1998).

Der dPPJ₁-I-Gehalt in frischen Pflanzen wurde von uns in einem Konzentrationsbereich von 294 bis 932 ng/g TG bestimmt. Da dieselbe Verbindung zuvor aus oberirdischen Teilen von *C. chasleae* in einer Menge von 8 µg/g TG isoliert wurde (Bohlmann *et al.*, 1982a), stellt sich die Frage nach der Ursache für diesen großen Konzentrationsunterschied. Dabei könnte es sich entweder um eine speziesspezifische (enzymatische?) Biosynthese dieser Verbindungen oder lediglich um eine bereits fortgeschrittene, unspezifische Autoxidation des Pflanzenmaterials handeln. Bohlmann *et al.* verwendeten zur Isolierung der Cyclopentenon-Verbindungen luftgetrocknetes Pflanzenmaterial verschiedener *Chromolaena*-Spezies. Da bereits früher gezeigt werden konnte, dass beim Trocknen von Pflanzen durch eine fortschreitende nichtenzymatische Lipidperoxidation verstärkt Phytoprostane gebildet werden (Imbusch und Mueller, 2000a; Parchmann und Mueller, 1998), ist der große Konzentrationsunterschied wahrscheinlich auf das Trocknen des Pflanzenmaterials zurückzuführen.

Isoprostane sind etablierte Marker von oxidativem Stress in Tieren. Daher stellt sich die Frage, ob auch Phytoprostane durch oxidativen Stress in Pflanzen gebildet werden können. Redox-aktive Schwermetalle wie z.B. Kupfer können in hohen Konzentrationen eine oxidative Zellschädigung auslösen, die unter anderem auf eine gesteigerte Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen ist (Cuypers *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 1999; Schützendübel und Polle, 2002). In Pflanzen konnte durch verschiedene abiotische Stimuli, die eine verstärkte Freisetzung von freien Radikalen *in vivo* auslösen, ebenfalls eine Induktion von Phytoprostanen beobachtet werden (Imbusch und Mueller, 2000a; Thoma *et al.*, 2003). Die Behandlung von *Eschscholtzia californica*-Zellsuspensionskulturen mit *tert*-Butylhydroperoxid (10 mM) oder mit Kupferionen (500 µM) führte zum Beispiel zu einem dramatischen Anstieg sowohl freier als auch veresterter F₁-Phytoprostane (Imbusch und Mueller, 2000b). Nach Zugabe

von 250 μM bis 500 μM Kupferacetat zu *L. esculentum*- bzw. *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein vier- bis elffacher Anstieg freier Deoxy-J₁-Phytoprostane in den Zellen festgestellt werden (siehe IV.6.2). Neben den bereits oben genannten Faktoren kann die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies in Pflanzen auch durch verschiedene Umwelteinflüsse wie Trockenheit, UV-Strahlung oder extreme Temperaturen ausgelöst werden (A-H-Mackerness *et al.*, 2001; Desikan *et al.*, 2001). Eine Anzucht von *A. thaliana*-Kalluskulturen bei 4°C führte zu einer oxidativen Belastung dieser Pflanzen, die unter anderem anhand zunehmender Konzentrationen von Lipidperoxidationsprodukten nachgewiesen werden konnte (O`Kane *et al.*, 1996). Bisher wurden in derartigen Experimenten vor allem Effekte einer längerfristigen Kälteexposition über mehrere Tage hinweg beobachtet (O`Kane *et al.*, 1996), während Auswirkungen eines kurzfristigen Kälteschocks in Pflanzen noch nicht untersucht wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei intakten, unverwundeten *A. thaliana*-Pflanzen (die unter normalen Bedingungen bei 20°C angezogen wurden) bereits eine zehnmünütige Lagerung bei 4°C ausreichte, um die dPPJ₁-Konzentration im Vergleich zu Kontrollpflanzen um das zwei- bis dreifache zu erhöhen. Parallel dazu konnte eine Verdopplung der OPDA-Konzentration nachgewiesen werden (siehe V.6.3). dPPJ₁ werden somit schon bei geringen Formen von oxidativem Stress induziert.

Wo werden Isoprostane gebildet? Untersuchungen in Tieren haben ergeben, dass iPF₂ vorwiegend in Membranen gebildet werden (Morrow *et al.*, 1992). Der Großteil der α -Linolensäure, der gemeinsamen Vorstufe der Jasmonate und aller Phytoprostane, liegt in Pflanzenzellen verestert in Form von Membranlipiden vor. Dementsprechend sind zwei Möglichkeiten denkbar, die zu einer Akkumulation von freien Phytoprostanen bei oxidativen Stress führen können. Zum einen könnten in der Pflanzenzelle Lipasen aktiviert werden, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren freisetzen. Diese könnten anschließend zu Phytoprostanen oxidiert werden. Alternativ könnten Phytoprostane in Membranen *in situ* gebildet und anschließend präformiert durch eine Lipase freigesetzt werden. In beiden Fällen kommt einer Lipase eine regulatorische Funktion zu.

Erste Hinweise, dass die Bildung von Phytoprostanen auch in Membranlipiden stattfindet, lieferten die Bestimmungen von F₁-Phytoprostanen in pflanzlichen Lipidfraktionen nach alkalischer Hydrolyse, die eine ca. zehnfach höhere Konzentration im Vergleich zu freien PPF₁ ergaben (Imbusch und Mueller, 2000b). Ein direkter Nachweis von veresterten Phytoprostanen in Membranlipiden ist bisher jedoch noch nicht erbracht worden. Da in tierischen Lipiden Peroxidationsprodukte wie z.B. Cyclopentenon-Isoprostane J₂/A₂ in veresteter Form gefunden werden konnten, ist

eine Phytoprostan-Bildung auch in pflanzlichen Membranen zu erwarten. Untersuchung hierzu stehen allerdings noch aus.

Die Biosynthese von OPDA erfolgt, soweit bekannt, nur über unveresterte Intermediate. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Hauptmenge der zellulären 12-Oxo-Phytodiensäure in *A. thaliana* verestert in der *sn1*-Position von Monogalactosyldiacylglycerolen (MGDG) der Chloroplastenmembran vorliegt (Stelmach *et al.*, 2001). Es ist vorstellbar, dass OPDA nach der Biosynthese in Membranen eingebaut, dort gespeichert und bei Bedarf durch eine Lipase freigesetzt werden kann (Stelmach *et al.*, 2001). Andererseits wäre es auch möglich, dass über einen bisher noch unbekanntem Weg auch in Membranen veresterte Fettsäuren zu OPDA umgesetzt werden können. Während die Biosynthese von Jasmonaten aus freier α -Linolensäure bereits gut untersucht ist (Turner *et al.*, 2002), gibt es für einen Einbau präformierter Verbindungen in Membranen noch keine Hinweise. Auch für eine direkt in den Membranen stattfindende OPDA-Biosynthese gibt es keine Evidenz. Es gelang *in vitro* nicht, Monogalactosyldiacylglycerole (MGDG) mit Hilfe einer Lipoxygenase aus *Glycine max* und einer *A. thaliana*-Allenoxid-Synthase zu OPDA-haltigen MGDG (MGDG-O) umzusetzen (Stelmach *et al.*, 2001). Die Enzyme katalysieren lediglich die OPDA-Synthese aus freien Fettsäuren, so dass noch nicht abschließend geklärt ist, warum große Mengen von OPDA in der Zelle membrangebunden vorliegen.

Phytoprostane können in Pflanzen aus freien Fettsäuren und wahrscheinlich in großen Mengen auch aus veresterten Fettsäuren in Membranlipiden gebildet werden. Freie Phytoprostane kommen in gesunden Pflanzen in einem Konzentrationsbereich vor, der mit den Produkten des Jasmonat-Wegs vergleichbar ist. Für die Jasmonate konnten mittlerweile vielfältige biologische Wirkungen gezeigt werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob Phytoprostane ebenfalls eine biologisch relevante Aktivität in Pflanzen aufweisen. Bei vielen pathophysiologischen Prozessen werden sowohl in Tieren als auch in Pflanzen verstärkt freie Radikale gebildet, die zu einer unspezifischen Lipidperoxidation von Zellmembranen und infolge dessen zu einer Schädigung der Zelle bis hin zum Zelltod führen können. Andererseits könnte die Eliminierung oxidativ geschädigter Membranbestandteile mittels einer Lipase sowohl einen Membranschaden reparieren als auch zur Freisetzung von biologisch aktiven Molekülen führen. In Tieren konnte eine Signalfunktion für oxidierten Phospholipide (OxPL), darunter Isoprostan-Phospholipide, gezeigt werden (Fontana *et al.*, 2002; Subbanagounder *et al.*, 2002). OxPL können in Tieren zudem durch spezifische intra- und extrazelluläre Phospholipasen (z.B. PAF-Acylhydrolase) erkannt und die oxidierten Fettsäuren selektiv aus den veränderten Lipiden eliminiert werden (Kudo und Murakami, 2002;

Marathe *et al.*, 2003). Dabei kommt es zur Freisetzung biologisch aktiver Moleküle wie Isoprostane oder Aldehyde (Fontana *et al.*, 2002). In Pflanzen ist ein derartiger Reparaturmechanismus für oxidierte Lipide noch unbekannt, es ist jedoch denkbar, dass über einen vergleichbaren Weg in Pflanzen ebenfalls biologisch aktive Oxylipine aus oxidierten Membranen freigesetzt werden können. Inwieweit Phytoprostane nur Nebenprodukte einer unspezifischen Lipidperoxidation in Pflanzen sind oder biologisch aktive Verbindungen, die eine Signalfunktion bei oxidativem Stress aufweisen, ist noch nicht geklärt.

Eine der biologischen Haupteigenschaften der Jasmonate, insbesondere bei Verteidigungsreaktionen, ist die Induktion der *de novo*-Synthese von Phytoalexinen (Mueller *et al.*, 1993). Phytoalexine sind antimikrobiell wirksame Pflanzeninhaltsstoffe aus dem Sekundärstoffwechsel (Gundlach *et al.*, 1992). Sie gehören keiner einheitlichen Naturstoffgruppe an, sondern umfassen strukturell verschiedene Sekundärstoffe. So werden z.B. durch Jasmonate in *Eschscholtzia californica* (Papaveraceae) verstärkt Benzophenanthridin-Alkaloide und in *N. tabacum* Scopoletin, ein Cumarin-Derivat, gebildet (Gundlach, 1992). Cyclopentanon- und Cyclopentenon-Verbindungen mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu den Jasmonaten induzieren in vielen, wenn nicht allen, Pflanzenfamilien eine verstärkte Phytoalexin-Biosynthese (Gundlach *et al.*, 1992; Gundlach und Zenk, 1998).

Sowohl Phytoprostane E₁ als auch die Cyclopentenon-Phytoprostane A₁ und B₁ führten in *E. californica*-Zellsuspensionskulturen zu einer mit den Jasmonaten vergleichbaren Induktion der Benzophenanthridin-Synthese (Parchmann und Mueller, 1998; Thoma *et al.*, 2003). Eine Untersuchung der Cyclopentenone dPPJ₁ in diesem Testsystem steht noch aus.

Eine Behandlung von *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen mit Methyljasmonat löst in den Zellen eine verstärkte Biosynthese sowie eine Akkumulation von Scopoletin im extrazellulären Medium aus (Sharan *et al.*, 1998). Dieser Effekt ist auch nach der Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid, einem Katalase-resistenten Wasserstoffperoxid-Derivat, zu dieser Zellkultur zu beobachten (Thoma *et al.*, 2003).

tert-Butylhydroperoxid führt in *N. tabacum* nicht zu einer gesteigerten Biosynthese von Jasmonaten, jedoch zu einer Akkumulation von Phytoprostanen (Imbusch und Mueller, 2000b; Thoma *et al.*, 2003). Der Zusatz von Deoxy-J₁-Phytoprostanen zu *N. tabacum*-Zellkulturen in einer Konzentration von 10 µM bewirkte wie PPE₁ und die Cyclopentenone PPA₁/B₁ eine deutliche und mit Jasmonsäure bzw. OPDA vergleichbare Scopoletin-Freisetzung ins Medium (siehe IV.7) (Thoma *et al.*, 2003). Der zeitliche Verlauf des Anstiegs war bei allen untersuchten Verbindungen mit einem Maximum nach ca. 2 - 4 h in etwa vergleichbar. Der Zusatz von Kupferacetat zu *N. tabacum*-Zellsuspensionskulturen ergab ebenfalls einen Scopoletin-Anstieg, wobei die

maximale Konzentration erst nach ca. 6 Stunden erreicht wurde und damit, in Abweichung zu der bisher untersuchten Induktion durch Phytoprostane bzw. Methyljasmonat, um zwei Stunden verzögert war. Die Zugabe von Kupferacetat zu *N. tabacum*-Kulturen führte zudem zu einer Induktion von dPPJ₁ mit einem Maximum nach ca. 2 h (siehe IV.6.2). Somit ist es vorstellbar, dass Kupferionen in dieser Zellkultur zu einer Induktion von dPPJ₁ führen und infolgedessen (mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. vier Stunden) eine verstärkte Freisetzung von Scopoletin ausgelöst wird.

Bei einem Vergleich der durch Radikal-katalysierte Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstandenen Oxylipin-Mengen in Pflanzen und Tieren fällt auf, dass in Pflanzen deutlich höhere Gehalte dieser Verbindungen zu finden sind. F₁-Phytoprostane kommen in Pflanzen in freier Form in Mengen von 4 - 144 ng/g TG bzw. verestert im Bereich von 47 - 1124 ng/g TG vor (Imbusch und Mueller, 2000a; 2000b), wohingegen freie F₂-Isoprostane in menschlichen Blut nur in einer Konzentration von 0,04 ng/ml bzw. veresterte F₂-iP in der Leber von Ratten in einem Bereich von 6 ng/g Frischgewicht nachgewiesen werden konnten (Morrow *et al.*, 1992; Morrow *et al.*, 1990a).

Die Ursache für die vergleichsweise hohen Konzentrationen dieser Verbindungsklasse in Pflanzen im Vergleich zum Tier ist weitgehend unklar. Dies kann einerseits in einer verstärkten Biosynthese dieser Verbindungen in Pflanzen oder an einer schnelleren Metabolisierung von Lipidperoxydationsprodukten in Tieren liegen. Eine Bildung von Phytoprostanen könnte in Pflanzen auf eine vermehrte Freisetzung freier Radikale über die Photosynthese zurückgeführt werden. Untersuchungen von Imbusch und Mueller (2000a) zeigten jedoch, dass auch in Wurzeln große Mengen an F₁-Phytoprostanen gebildet werden können. Da es sich dabei allerdings zum Teil um getrocknetes Pflanzenmaterial handelte und somit eine fortgeschrittene Autoxidation des Pflanzengewebes nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine gesteigerte Biosynthese aufgrund der photosynthetischen Aktivität bzw. unter Lichteinfluss noch nicht geklärt. Eine weitere Ursache für die auffälligen Konzentrationsunterschiede könnte zudem eine schnellere Beseitigung freier Radikale in Tieren sein. Pflanzen besitzen jedoch auch ausgeprägte enzymatische und nichtenzymatische Mechanismen zum Schutz vor freien Radikalen. Dazu gehören zum Beispiel die Superoxid-Dismutase (SOD), die den Abbau von Superoxid-Radikalen katalysiert (Wojtaszek, 1997), und antioxidative Moleküle wie α -Tocopherol und Ascorbinsäure, so dass keine Hinweise für einen verbesserten Radikalschutz in Tieren vorliegen. Eine weitere Möglichkeit für die niedrigen Konzentrationen von Isoprostanen in Tieren könnte ein ausgeprägter Metabolismus dieser Verbindungen sein. Allerdings sind auch in Pflanzen

verschiedene Wege denkbar (siehe unten), wie Phytoprostane eliminiert werden können, so dass die großen Konzentrationsunterschiede bis jetzt nicht erklärt werden können.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Deoxy-J₁-Phytoprostane sind in Pflanzen drei Abbauwege vorstellbar. In Analogie zu OPDA ist sowohl eine enzymatische Reduktion der ringständigen Doppelbindung durch 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktasen (OPR) als auch eine Seitenkettenverkürzung durch β -Oxidation denkbar (Creelman und Rao, 2002). Aufgrund der α,β -ungesättigten Carbonylfunktion könnten diese Moleküle zudem mit Biomolekülen reagieren, die nucleophile Gruppen wie z.B. freie Thiole aufweisen.

Eine wegen ihrer Beteiligung an der Jasmonat-Kaskade näher untersuchte Enzymgruppe sind OPDA-Reduktasen. Bisher konnten in *A. thaliana* drei Isoenzyme charakterisiert werden (Biesgen und Weiler, 1999; Schaller *et al.*, 2000; Schaller und Weiler, 1997). Eine Expression von *OPR1* und *OPR2* konnte vor allem in Wurzeln nachgewiesen werden (Biesgen und Weiler, 1999), während *OPR3* in allen Pflanzenteilen gebildet werden kann (Schaller *et al.*, 2000). An der Reduktion von 12-Oxo-Phytodiensäure, die in Peroxisomen abläuft (Stintzi und Browse, 2000), ist nur *OPR3* beteiligt (Schaller *et al.*, 2000). Für die *OPR2*-Isoform konnte bis jetzt noch kein endogenes Substrat identifiziert werden, dagegen ist *OPR1* in der Lage, unspezifisch eine Vielzahl α,β -ungesättigter Verbindungen zu reduzieren (Strassner *et al.*, 2002). Inwieweit dPPJ₁ durch diese Enzyme reduziert werden können, ist noch nicht geklärt. Das C₂₀-Homologe von dPPJ₁, 15-Deoxy-Prostaglandin J₂, z.B. kann durch *OPR3* reduziert werden (Costa *et al.*, 2000), so dass eine vergleichbare Reaktion auch mit den Cyclopentenon-Phytoprostanen zu erwarten ist.

Einen weiteren Metabolisierungsweg von dPPJ₁ könnte eine β -Oxidation der Carboxyl-Seitenkette darstellen. Diese Reaktion ist auch aus der Jasmonsäure-Biosynthese bekannt und ist in Peroxysomen bzw. in Glyoxysomen lokalisiert (Creelman und Rao, 2002). Dabei entsteht aus 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure, der durch *OPR3* reduzierten Form von OPDA, mittels dreifacher β -Oxidation Jasmonsäure. In Tieren konnte gezeigt werden, dass Isoprostane wie 8-*epi*-PGF_{2 α} und Prostaglandine durch β -Oxidation metabolisiert werden können (Chiabrando *et al.*, 1999). Ein Abbau von Phytoprostanen über diesen Stoffwechselweg wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

Lipidperoxidationsprodukte, die eine elektrophile α,β -ungesättigte Carbonylfunktion aufweisen, stellen eine Gefahr für die Zelle dar. Es konnte gezeigt werden, dass sie über die Reaktivität dieser funktionellen Gruppe z.B. Proteine kovalent modifizieren (Vranová *et al.*, 2002) und zu einer Zellschädigung im Pflanzengewebe führen können (Vollenweider *et al.*, 2000). Sowohl in Tieren als auch in Pflanzen können ungesättigte

Ketone und Aldehyde durch Reaktion mit Glutathion (GSH) entgiftet werden. Dieser Prozess wird durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert.

A_2 -Isoprostan ($15-A_{2t}$ -iP) und Prostaglandin A_2 , die in Tieren entstehen können, werden *in vitro* schnell unter GST-Katalyse an GSH konjugiert (Chen *et al.*, 1999). Diese nucleophile Additionsreaktion (Michael-Addition) kann, wie früher schon am Beispiel von 9-Deoxy- $\Delta^{9,12}$ -Prostaglandin D_2 gezeigt wurde, *in vitro* auch nichtenzymatisch ablaufen, wenngleich langsamer als die enzymkatalysierte Reaktion (Atsmon *et al.*, 1990). Cyclopentenon-Phytoprostane wie $dPPJ_1$ reagieren *in vitro* ebenfalls bereits in Abwesenheit von GST mit Glutathion (siehe IV.5.2).

In *A. thaliana* führen α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen wie z.B. Ketodiene und Ketotriene, die sowohl enzymatisch als auch nichtenzymatisch durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen können, zu einer Induktion der Glutathion-S-Transferase 1 (GST1) (Vollenweider *et al.*, 2000). Die Expression von *Gst1* kann in *A. thaliana* auch durch 12-Oxo-Phytodiensäure gesteigert werden, nicht jedoch durch Jasmonsäure (Stintzi *et al.*, 2001), so dass die funktionelle Gruppe notwendig für eine Induktion von GST1 zu sein scheint (Vollenweider *et al.*, 2000). Durch Infiltration von Cyclopentenon-Phytoprostanen A_1 und B_1 (Thoma *et al.*, 2003) und von $dPPJ_1$ in Blätter von *A. thaliana* konnte in unserem Arbeitskreis eine Aktivierung des *Gst1*-Promotors beobachtet werden (siehe Abbildung V.3).

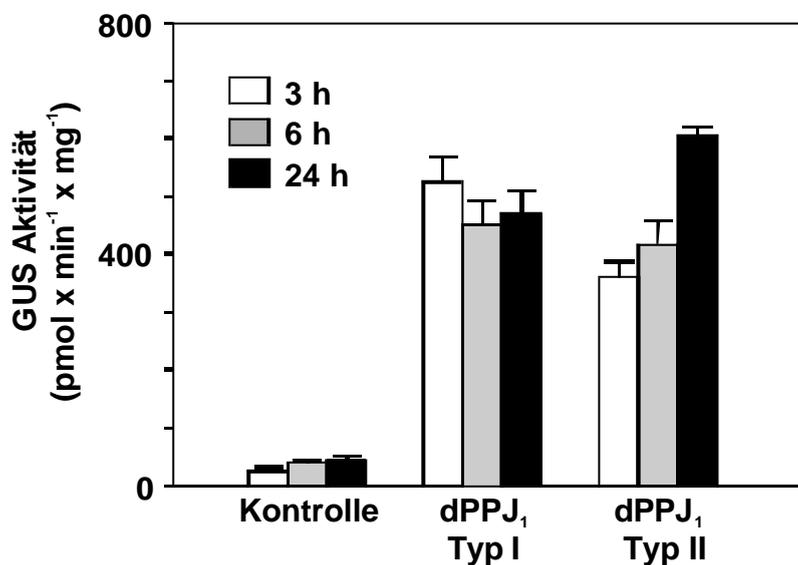


Abbildung V.3: Aktivierung des *GST1*-Promotors in transgenen *A. thaliana*-Blättern (Col-0) nach Infiltration von $dPPJ_1$ Typ I und II. Der *GST1*-Promotor enthält ein β -Glucuronidase-Reportergen-Konstrukt (GUS). Je Blatt wurden 4 nmol $dPPJ_1$ durch die Stomata der Blätter infiltriert, als Kontrolle diente Wasser. Nach 3, 6 und 24 h wurde in drei unabhängigen Experimenten die GUS-Aktivität bestimmt. (Mittelwert \pm S.D., n = 3).

Die Cyclopentenon-Verbindungen induzieren damit ein System zur Metabolisierung von reaktiven Molekülen und damit möglicherweise ihre eigene Inaktivierung. Vielleicht haben Cyclopentenon-Phytprostane in Verbindung mit anderen Lipidperoxidationsprodukten eine Signalfunktion bei der Induktion von Schutzmechanismen, die die Konsequenzen von oxidativem Stress limitieren.

V.3 Phytprostane: Mediatoren von oxidativem Stress?

Phytprostane können wie die Jasmonate in Pflanzen und die tierischen Prostaglandine/Isoprostane in Cyclopentan(on)e und Cyclopentenone unterteilt werden, für die differenzierte biologische Aktivitäten nachgewiesen werden konnten.

Prostanoide vermitteln eine Vielzahl von Effekten in verschiedenen Geweben und Zelltypen. Die Wirkung von Cyclopentan(on)-Prostaglandinen wird dabei durch eine Interaktion mit membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt. Für jedes Prostaglandin konnte mindestens ein spezifischer Rezeptor in Tieren nachgewiesen werden (Narumiya *et al.*, 1999). Nichtenzymatisch gebildete Isoprostane können als Prostaglandin-Analoga zum Teil ebenfalls über Prostaglandin-Rezeptoren wechselwirken, wobei auch das Vorkommen eigener Isoprostan-Rezeptoren diskutiert wird (Janssen, 2001). Die biologische Aktivität von Cyclopentenon-Prostaglandinen beruht dagegen auf einer Ligation mit Kernrezeptoren wie PPAR γ oder einer kovalenten Modifikation von zellulären Zielproteinen wie dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Straus und Glass, 2001). Eine kovalente Reaktion z.B. mit der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) kann in Zellen zu einer Veränderung der Redox-Regulation führen (Moos *et al.*, 2003).

1995 konnte gezeigt werden, dass die γ -Isoform des Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR γ) ein spezifischer Kernrezeptor für 15d- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ ist (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Dieser ist vor allem im Fettgewebe, sowie in Makrophagen und im Kolon lokalisiert (Bell-Parikh *et al.*, 2003). PPAR γ spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausdifferenzierung von Adipozyten (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995) und bei der Regulation des Glucose-Gleichgewichts (Negishi und Katoh, 2002). Zudem ist PPAR γ an der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen beteiligt (siehe unten) (Straus und Glass, 2001). Bis jetzt wurde 15d-PGJ₂ *in vivo*, z.B. im Fettgewebe, jedoch noch nicht nachgewiesen (Straus und Glass, 2001). Auch bei *in vitro*-Untersuchungen von Präadipozyten konnten im Medium lediglich picomolare Mengen dieser Verbindungen gefunden werden (Bell-Parikh *et al.*, 2003). Somit ist eine physiologische Bedeutung von 15d-PGJ₂ bei der Aktivierung von PPAR γ *in vivo* fragwürdig, da hierfür *in vitro* Konzentrationen in einem Bereich von 2,5 bis 100 μ M benötigt werden (Bell-Parikh *et al.*, 2003).

Cyclopentenon-Prostaglandine können aufgrund ihrer Reaktivität zu einer direkten kovalenten Modifikation von Proteinen führen, dazu gehört z.B. die Inaktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B, der an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist (siehe unten) (Cerunda-Morollon *et al.*, 2001; Straus *et al.*, 2000). Zu den weiteren Signalproteinen, die ebenfalls durch kovalente Reaktion mit Cyclopentenonen inhibiert werden können, gehören I κ B Kinase (IKK), die zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (siehe unten) (Rossi *et al.*, 2000), sowie HRas-Proteine, die an der Regulation von Zellproliferationsvorgängen beteiligt sind (Oliva *et al.*, 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass 15d-PGJ₂ direkt mit Cystein-Resten dieser Proteine reagieren kann (Oliva *et al.*, 2003).

Eine direkte kovalente Reaktion führt auch zur Inhibierung eines weiteren regulatorischen Proteins, der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) (Moos *et al.*, 2003). TRxR dient in der Zelle zur Redox-Regulation und beeinflusst damit z.B. die Funktion von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren (Moos *et al.*, 2003).

Die Isolierung dieser Proteine gelang über eine Inkubation von Zellkulturen mit Biotin-markierten Cyclopentenon-Prostaglandinen und eine anschließende Aufreinigung der gebildeten Prostaglandin-Protein-Konjugate mittels Affinitätschromatographie (Cerunda-Morollon *et al.*, 2001; Moos *et al.*, 2003). Die verwendeten Biotin-konjugierten Prostaglandine wurden von tierischen Zellen aufgenommen und waren biologisch aktiv (Cerunda-Morollon *et al.*, 2001). Interessant ist die hohe Spezifität, mit der Cyclopentenone an bestimmte Proteine koppeln können. Selbst in Gegenwart hoher cytosolischer GSH-Konzentrationen wurden nur ca. 15 Zielproteine kovalent modifiziert (Moos *et al.*, 2003). Inwieweit auch pflanzliche Cyclopentenon-Verbindungen wie OPDA und dPPJ₁ mit intrazellulären Proteinen kovalent reagieren können und ob die oben angewandte Methode auch auf diese Verbindungen übertragbar ist, wird noch geklärt werden.

Im Gegensatz zu den Prostaglandinen ist über die Signaltransduktionswege von Jasmonaten in Pflanzen noch wenig bekannt. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Jasmonate ihre biologische Aktivität über eine Modulation von verschiedenen Genen vermitteln. Der genaue Mechanismus der Genregulation ist jedoch noch unklar. Bisher konnte noch kein spezifischer Jasmonat-Rezeptor charakterisiert werden (Turner *et al.*, 2002). Da Cyclopentenon-Phytostane und 12-Oxo-Phytodiensäure eine mit den tierischen Analoga vergleichbare chemische Reaktivität aufweisen, ist es vorstellbar, dass diese Cyclopentenone einen Teil ihrer Wirkung in Pflanzen über eine kovalente Modifikation von Zielproteinen vermitteln.

Die biologischen Funktionen von Jasmonsäure und OPDA stimmen teilweise überein. Es gibt jedoch auch Wirkungen, die nur von einem der beiden Signalstoffe vermittelt werden. Die Unterschiede im Wirkungsspektrum lassen sich in Analogie zu den

Cyclopentenon-Prostaglandinen im Tier auf die reaktive α,β -ungesättigte Carbonylfunktion von 12-Oxo-Phytodiensäure zurückführen (Alméras *et al.*, 2003; Farmer *et al.*, 2003; Weber, 2002).

Eine isolierte Betrachtung beider Signalmoleküle im Bezug auf ihre jeweilige physiologische Bedeutung war bisher nur schwer durchführbar, da eine Umwandlung von 12-Oxo-Phytodiensäure zu Jasmonsäure *in planta* erfolgen kann (Stintzi und Browse, 2000). Neue Erkenntnisse lieferte hier die Charakterisierung einer *A. thaliana*-Mutante (*opr3*), die 12-Oxo-Phytodiensäure nicht mehr zu Dihydro-OPDA reduzieren kann und damit nicht in der Lage ist, Jasmonsäure zu biosynthetisieren (siehe auch V.2) (Stintzi und Browse, 2000). Mit dieser Mutante konnten erstmals biologische Effekte von Jasmonsäure und OPDA differenziert werden (Stintzi *et al.*, 2001).

Diese Mutanten sind männlich steril, die Fertilität konnte durch die Gabe exogener Jasmonsäure, nicht jedoch durch OPDA, wieder hergestellt werden (Stintzi und Browse, 2000). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Jasmonsäure und nicht OPDA - zumindest in *A. thaliana* - der entscheidende Signalstoff für die Entwicklung der Antheren und die Bildung von Pollen ist (Stintzi und Browse, 2000). Bei einer weitergehenden Untersuchung der *opr3*-Mutante fiel auf, dass diese Pflanzen wie der Wildtyp resistent gegenüber dem Fraßfeind *Bradysia impatiens* und dem Pilz *Alternaria brassicicola* waren, während sowohl die *fad3fad7fad8*-Mutante, die keine α -Linolensäure mehr biosynthetisieren kann, als auch die Jasmonat-insensitive *coi1*-Mutante anfällig gegenüber beiden Pathogenen waren (Stintzi *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur Fertilität kann Jasmonsäure in diesem Fall durch OPDA ersetzt werden. COI1 ist ein F-Box-Protein, das an der Ubiquitin-Konjugation von Proteinen und damit an deren Abbau beteiligt ist (Weber, 2002). Auf diese Weise könnten regulatorische Proteine, die an der Jasmonat-Signaltransduktion beteiligt sind, markiert und abgebaut werden (Weber, 2002). Durch Verwundung werden in *A. thaliana*-Wildtypen zwei unterschiedliche Gruppen von Genen aktiviert, COI1-abhängige Gene, die durch Jasmonsäure reguliert werden, und COI1-unabhängige Gene, für deren Induktion andere Signalstoffe als Jasmonsäure benötigt werden (Reymond *et al.*, 2000). Genexpressionsstudien in *opr3*-Pflanzen nach Verwundung zeigten auch in Abwesenheit von Jasmonsäure eine Induktion vieler Gene, von denen ursprünglich angenommen wurde, dass sie nur durch Jasmonsäure über COI1 reguliert werden können (Stintzi *et al.*, 2001). Dieser Effekt lässt sich möglicherweise auf 12-Oxo-Phytodiensäure zurückführen. Die Zugabe exogener OPDA zu *opr3*-Mutanten führte ebenfalls zu einer gesteigerten Genexpression vieler, jedoch nicht aller Jasmonsäuresensitiven und COI1-abhängigen Gene und zusätzlich zu einer Induktion verschiedener COI1-unabhängiger Gene, die nicht über Jasmonsäure vermittelt werden (Stintzi *et al.*, 2001). Die Signaltransduktion von 12-Oxo-Phytodiensäure verläuft somit offensichtlich

über zwei Wege. Diese unterscheiden sich allerdings zum Teil auch überschneidenden biologischen Aktivitäten von Jasmonsäure und OPDA könnten einer verbesserten Feinabstimmung der Genexpression, z.B. nach Verwundung, dienen (Stintzi *et al.*, 2001).

Inzwischen gibt es experimentelle Hinweise dafür, dass Cyclopentenon-Phytoprostane biologische Wirkungen aufweisen, die mit 12-Oxo-Phytodiensäure vergleichbar sind, z.B. eine Induktion von GST1 und eine Akkumulation von Phytoalexinen [siehe V.2 und (Thoma *et al.*, 2003)]. Eine gesteigerte *Gst1*-Expression konnte auch für weitere α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen nachgewiesen werden (Vollenweider *et al.*, 2000). *Gst1* wird als Marker gen für Reaktive Sauerstoffspezies angesehen (Grant *et al.*, 2000). Durch geringe Mengen an Cyclopentenonen wird somit ein essentielles System zur Inaktivierung von Elektrophilen angeschaltet, das die Zelle vor einer möglichen Schädigung durch oxidativen Stress schützt. Höhere Konzentrationen ($> 150 \mu\text{M}$) dieser Verbindungen führen dagegen zu einem Absterben der Zellen. Inwieweit es sich dabei um toxische Effekte oder eine Auslösung des programmierten Zelltods handelt, ist nicht untersucht worden.

In Eukaryoten spielt bei vielen Signaltransduktionskaskaden eine Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) eine entscheidende Rolle bei Abwehrreaktionen z.B. gegenüber Pathogenen oder abiotischem Stress (Zhang und Klessig, 2001). MAP-Kinasen sind in einer dreistufigen Kaskade angeordnet, ihre Aktivierung erfolgt durch eine zweifache Phosphorylierung mittels einer MAPK-Kinase (MAPKK), die wiederum durch eine weitere MAPKK-Kinase (MAPKKK) phosphoryliert wird (Zhang und Klessig, 2001). MAPK sind vermutlich sowohl an der Aktivierung von Abwehrgenen als auch an der Hypersensitiven Reaktion (HR) in *N. tabacum* beteiligt (Yang *et al.*, 2001; Zhang und Klessig, 2001). In *A. thaliana* ist der MAPK-Signalweg auch durch H_2O_2 induzierbar (Kovtun *et al.*, 2000). In Zusammenarbeit mit Dr. A. Sinha (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) konnte gezeigt werden, dass exogen zugesetzte Phytoprostane A und das Typ II-Regioisomer von PPB₁ sowie Deoxy-J₁-Phytoprostane (siehe Abbildung V.4) in *L. esculentum* zu einer MAPK-Aktivierung führen, während Methyljasmonat inaktiv ist (unveröffentlichte Daten) (Thoma *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Phytoprostane und Jasmonate ihre biologische Aktivität über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermitteln. Ob Cyclopentenon-Phytoprostane bei der Aktivierung von MAPK durch oxidativen Stress in Pflanzen von Bedeutung sind, ist noch unklar.

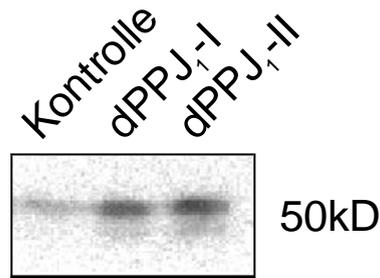


Abbildung V.4: Die MAPK-Aktivität wurde in *L. esculentum*-Zellsuspensionskulturen nach Zugabe von dPPJ₁ (75 µM) untersucht, als Kontrolle diente Wasser. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden Tyrosinphosphorylierte Proteine mit phospho-Tyr-spezifischen MAPK-Antikörpern präzipitiert und in einem „in gel kinase assay“ mit MBP (myelin basic protein) analysiert.

Cyclopentenon-Phytoprostane weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den analogen Prostaglandinen auf und sind in biologischen Geweben in zum Teil deutlich größeren Mengen enthalten (siehe V.2). Insbesondere beim Trocknen oder bei der Lagerung von Pflanzen, z.B. von Arzneidrogen, können große Mengen an Phytoprostanen gebildet werden. In getrockneten Pflanzenproben wurden freie bzw. veresterte F₁-Phytoprostane in Konzentrationen von bis zu 55 µg/g TG gefunden (Imbusch und Mueller, 2000a). Daneben können Phytoprostane auch in α-Linolensäure-haltigen Pflanzenprodukten entstehen, z.B. in fetten Ölen, die in der Ernährung eingesetzt werden. In Sojaöl konnten 8,2 µg/g PPF₁ in veresteter Form nachgewiesen werden (Imbusch, 2001). Entsprechend ist zu erwarten, dass auch die anderen Phytoprostanklassen in fetten Ölen vorkommen. Untersuchungen hierzu stehen noch aus. Phytoprostane könnten z.B. als Marker für Lipidperoxidation in pflanzlichen Lebensmitteln herangezogen werden. Viel interessanter ist allerdings die Frage, ob Phytoprostane, insbesondere die Cyclopentenon-Verbindungen, eine biologische Aktivität in Tieren aufweisen.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. V. Dirsch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in München konnten Effekte von Cyclopentenon-Phytoprostanen auf die Aktivität von NF-κB untersucht werden. 15-Deoxy-Δ^{12,14}-Prostaglandin J₂ unterdrückt in aktivierten Makrophagen die Expression einiger Gene, wie z.B. für die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die Cyclooxygenase 2 (COX2), die an der akuten und chronischen Entzündungsantwort beteiligt sind (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Ricote *et al.*, 1998). Ein Teil dieser Genrepression kann in Makrophagen durch Bindung von 15d-PGJ₂ an PPARγ vermittelt werden (Ricote *et al.*, 1998). Es existieren jedoch auch zwei PPARγ-unabhängige Mechanismen. 15d-PGJ₂ kann

sowohl I- κ B Kinase (IKK) in Makrophagen als auch NF- κ B (in HeLA Zellen) durch kovalente Modifikation von Cystein-Resten inhibieren. Durch die Reaktion von Cyclopentenon-Prostaglandinen mit IKK wird eine Aktivierung von NF- κ B und damit die Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern unterbunden (Straus und Glass, 2001). Zudem kann NF- κ B direkt durch Alkylierung der DNA-Bindungsdomäne inaktiviert werden (Straus *et al.*, 2000). Mit einem NF- κ B-Luciferase-Assay konnte *in vitro* gezeigt werden, dass auch Deoxy-J₁-Phytoprostane in HEK-Zellen zu einer dosis-abhängigen Inhibierung von NF- κ B führen, die fast identisch mit der von 15d-PGJ₂ ist (Abbildung V.5, unveröffentlichte Daten).

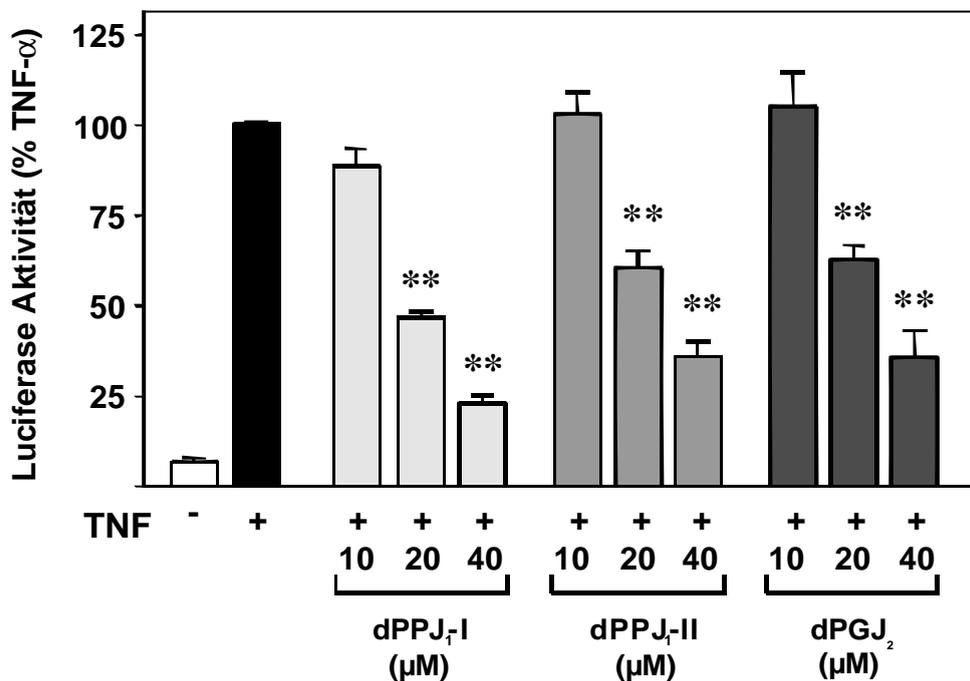


Abbildung V.5: NF- κ B-Inhibierung durch dPPJ₁ Typ I und II im Vergleich zu 15d-PGJ₂. Dazu wurden HEK 293-Zellen („human embrionic kidney“), die zuvor mit einem pNF- κ B-luc- und pRSV-b-gal-Plasmid transfektiert wurden, mit den Testsubstanzen für 2 h vorinkubiert und anschließend mit Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) stimuliert. Nach 6 h wurde die NF- κ B-Aktivität in den Zellen anhand eines Luciferase-Reporterassays (Luciferase Assay System, Promega, Heidelberg) bestimmt. (Ergebnisse von Dr. V. Dirsch, Pharmazeutische Biologie, LMU München; unveröffentlicht).

Es ist noch nicht klar, inwieweit dieses Ergebnis für den Menschen auch *in vivo* von Bedeutung ist. Am wichtigsten erscheint dabei die Frage, ob Cyclopentenon-Phytoprostane in biologisch relevanten Mengen in Nahrungsmitteln vorkommen. Zudem muss geklärt werden, inwieweit diese Verbindungen vom menschlichen

V. DISKUSSION

Organismus aufgenommen werden können. Über die Resorption bzw. den Metabolismus und die Ausscheidung von Phytoprostanen *in vivo* ist bisher noch wenig bekannt.

V.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Klasse von Phytoprostanen untersucht, PPD₁ und die aus diesen Substanzen abgeleiteten dPPJ₁. Phytoprostane entstehen durch Radikal-katalysierte Peroxidation von α -Linolensäure. Diese Verbindungen kommen vermutlich ubiquitär in Pflanzen vor und werden durch oxidativen Stress in Pflanzen verstärkt gebildet.

Bisher konnten nur freie PPD₁ und dPPJ₁ untersucht werden. Da der größte Teil der α -Linolensäure verestert in Lipiden vorliegt, ist anzunehmen, dass auch Membranen hohe Konzentrationen dieser Phytoprostane enthalten. Zudem ist eine Akkumulation dieser Verbindungen in fetten Ölen, die reich an dieser Fettsäure sind, anzunehmen. Diese Hypothese muss jedoch durch weitere Untersuchungen noch überprüft werden. Da PPD₁ und dPPJ₁ instabile Verbindungen sind, ist eine alkalische Hydrolyse von Lipiden nicht durchführbar. Hier bietet sich der Einsatz einer Lipase zur Spaltung der Fettsäureester an.

Phytoprostane weisen in Pflanzen eine mit den Jasmonaten vergleichbare biologische Aktivität auf. Jasmonate sind unter anderem an pflanzlichen Verteidigungsreaktionen beteiligt, z.B. an der Produktion von antimikrobiellen Sekundärstoffen. Es konnte gezeigt werden, dass dPPJ₁ wie auch andere Phytoprostanklassen eine gesteigerte Bildung bzw. Freisetzung von Phytoalexinen in verschiedenen Pflanzenspezies bewirken können (Loeffler *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003). Eine Akkumulation von Phytoprostanen bei oxidativem Stress ist durch eine verstärkte Lipidperoxidation von freier α -Linolensäure, aber auch durch eine gesteigerte Freisetzung präformierter Phytoprostane aus Membranlipiden mittels einer Lipase vorstellbar. In Tieren sind Phospholipasen bekannt, die selektiv oxidierte Fettsäuren aus Phospholipiden entfernen und so zur Freisetzung von biologisch aktiven Molekülen wie Isoprostanen führen können (siehe V.2). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch in Pflanzen denkbar, bis jetzt konnte jedoch noch kein vergleichbares Reparatursystem charakterisiert werden. Inwieweit diesen biologisch aktiven Verbindungen eine Funktion als Mediator von oxidativem Stress in Pflanzen zukommt, ist allerdings noch zu belegen.

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Cyclopentenon-Prostaglandinen wie 15d-PGJ₂ ist von dPPJ₁ auch eine biologische Aktivität in Tieren zu erwarten, was in ersten Versuchen auch bestätigt werden konnte (siehe V.3). Unklar ist allerdings noch, ob Phytoprostane zum Beispiel in Nahrungsmitteln oder Phytopharmaka in biologisch relevanten Konzentrationen vorkommen. Zudem muss noch geklärt werden, inwieweit diese Verbindungen in Tieren freigesetzt bzw. resorbiert und metabolisiert werden können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Phytoprostane (PP) können nichtenzymatisch *in vivo* und *in vitro* durch freie Radikal-katalysierte Peroxidation von α -Linolensäure entstehen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob über den von uns postulierten D₁-Phytoprostan-Weg in Pflanzen Jasmonat-ähnliche Produkte gebildet werden können, die eine mit den Jasmonaten und den in Tieren nachgewiesenen Cyclopentenonen-Prostanoiden vergleichbare biologische Aktivität aufweisen.

Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. Phytoprostane mit dem Prostaglandin D- und Deoxy-J-Ringsystem (PPD₁ und dPPJ₁) konnten erstmals durch Partialsynthese hergestellt werden. Dabei wurden jeweils zwei racemische Regioisomere (Typ I und Typ II) der Verbindungen erhalten. Die Regioisomere von dPPJ₁ konnten chromatographisch aufgetrennt werden. Alle Produkte wurden UV-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert.
2. PPD₁ und dPPJ₁ entstehen *in vitro* durch Autoxidation von α -Linolensäure. Es wurden präparative Methoden entwickelt, um diese Verbindungen zu isolieren. Die Ausbeute betrug für das dPPJ₁-Regioisomer Typ I 210 μ g bzw. für dPPJ₁-II 290 μ g je Gramm eingesetzter α -Linolensäure. Eine präparative Gewinnung einzelner PPD₁-Regioisomere gelang nicht.
3. Zum Nachweis von PPD₁ und dPPJ₁ wurde eine neuartige Analysenmethode entwickelt. Aufgrund der in Cyclopentenonen wie dPPJ₁ enthaltenen reaktiven α,β -ungesättigten Carbonylfunktion konnten diese Verbindungen selektiv mit 7-Mercapto-4-methylcumarin, einem Fluoreszenzmarker, gekoppelt und mittels Fluoreszenz-HPLC bestimmt werden. Mit dieser Methode konnten die PPD₁- und dPPJ₁-Regioisomere sowie ein strukturell verwandtes Phytohormon, 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), in allen untersuchten Pflanzenspezies nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng.
4. Mit dieser Methode konnten erstmals alle über den D₁-Phytoprostan-Weg gebildeten Verbindungen in intakten Pflanzen nachgewiesen werden. Von diesen konnte allein dPPJ₁-I bereits vor über 20 Jahren von Bohlmann *et al.* aus getrocknetem Pflanzenmaterial von *Chromolaena morii* und *C. chasleae* isoliert werden. Zur Biosynthese dieses Cyclopentenons existieren seit langem eine Reihe von Hypothesen, die jedoch alle nicht experimentell bestätigt

werden konnten. Die vorgelegten Ergebnisse bestätigen unsere neu aufgestellte Hypothese, nach der die von Bohlmann *et al.* erstmals beschriebene Verbindung durch Autoxidation von α -Linolensäure nicht nur in *Chromolaena*-Spezies, sondern in allen Pflanzen gebildet werden können.

5. PPD₁ konnte in gesunden und unbehandelten Pflanzen von *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* in einem Konzentrationsbereich von 348 - 2239 ng/g Trockengewicht (TG) für Typ I und 492 - 3995 ng/g TG für das Typ II-Regioisomer nachgewiesen werden. Die ermittelten Konzentrationen für dPPJ₁ lagen im Bereich von 294 - 932 ng/g TG für das Typ I-Regioisomer und 1074 - 2413 ng/g TG für das Typ II-Regioisomer. dPPJ₁ weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu OPDA auf. OPDA kommt in den untersuchten Pflanzen in einer Konzentration von 67 - 549 ng/g TG vor. Die Hauptprodukte des nichtenzymatischen PPD₁-Wegs kommen somit in höheren Konzentrationen als enzymatisch gebildete OPDA vor.
6. *A. thaliana*-Pflanzen wurden für 10 min bei 4°C gelagert. Der Kältereiz führte annähernd zu einer Verdopplung der Konzentration von dPPJ₁-I (597 ng/g TG) im Vergleich zu Kontrollpflanzen (317 ng/g TG), die bei 20°C gelagert wurden. Für dPPJ₁-II wurde ein Anstieg von 1082 ng/g TG (Kontrollen) auf 2764 ng/g TG ermittelt. OPDA wurde ebenfalls induziert, die Kälteexposition führte zu einer Verdopplung der OPDA-Konzentration. Das Ergebnis zeigt, dass bereits milde Stressbedingungen eine verstärkte Bildung von freien Radikalen und so eine Synthese von dPPJ₁ auslösen.
7. Eine vermehrte Bildung von freien Radikalen z.B. bei oxidativem Stress führt zu einer nichtenzymatischen Lipidperoxidation und zu einer transienten Akkumulation von Phytoprostanen. Die Behandlung von *L. esculentum*-Zellkulturen mit Kupferacetat (250 μ M), einem starken Induktor einer Radikal-katalysierten Lipidperoxidation, führte zu einer Vervierfachung der dPPJ₁-Konzentration nach 2 - 4 h im Vergleich zu Kontrollansätzen. Unter diesen Bedingungen wurde OPDA nicht induziert.
8. Auch die Behandlung von *N. tabacum*-Zellkulturen mit Kupferacetat (500 μ M) führte zu einer Akkumulation von dPPJ₁. Die dPPJ₁-I-Konzentration wurde um den Faktor 11 und die dPPJ₁-II-Konzentration um das Siebenfache gesteigert. Maximale dPPJ₁-Konzentrationen wurden nach 2 h beobachtet. Neben einer Akkumulation von Phytoprostanen konnte auch eine Akkumulation von Scopoletin, einem antimikrobiellen Sekundärstoff, im Zellkultur-Medium beobachtet werden. Maximale Scopoletin-Konzentrationen wurden 4 h nach

dem Phytoprostan-Maximum bei 6 h gemessen. Eine Akkumulation von Scopoletin konnte in *N. tabacum*-Zellkulturen auch durch exogene Gabe von dPPJ₁ (10 µM) induziert werden, wobei maximale Scopoletin-Konzentrationen nach 2 - 4 h ermittelt wurden. Beide Regioisomere von dPPJ₁ waren gleich wirksam und ergaben eine 14- bis 15-fache Induktion von Scopoletin. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs der Scopoletin-Induktion nach Zusatz von Kupferacetat bzw. dPPJ₁ ist es denkbar, dass dPPJ₁ in diesem Testsystem eine Funktion als Mediatoren von oxidativem Stress besitzen. Exogen zugesetzte OPDA (10 µM) führte in dieser Zellkultur ebenfalls zu einem 18-fachen Anstieg von Scopoletin mit einem Maximum nach 2 - 4 h. Allerdings wird OPDA in *N. tabacum* nicht durch Kupferacetat induziert. Somit kann OPDA in diesem Testsystem als Mediator der Scopoletin-Freisetzung in *N. tabacum* ausgeschlossen werden.

9. Elektrophile Cyclopentenone wie dPPJ₁ und OPDA können kovalent an SH-Gruppen von Peptiden binden. Nach einer einstündigen Inkubation von dPPJ₁ (86 µM) mit Glutathion (GSH, 3,25 mM) waren ca. 80 % der Cyclopentenone an GSH gebunden.
10. dPPJ₁ und OPDA induzieren in *A. thaliana* die Glutathion-S-Transferase 1 (*GST1*). Nach 3 h konnte eine im Vergleich zu Kontrollen um mehr als das 14-fache gesteigerte *Gst1*-Expression nachgewiesen werden. GST katalysieren die Konjugation von Elektrophilen an GSH. Diese Reaktion kann zur Inaktivierung von reaktiven Verbindungen führen, die durch Lipidperoxidation bei oxidativem Stress gebildet werden, und schützt so die Zelle möglicherweise vor den Konsequenzen von oxidativem Stress.
11. dPPJ₁ sind auch in Tieren pharmakologisch wirksame Verbindungen. In *in vitro*-Assays konnte gezeigt werden, dass dPPJ₁ in demselben Konzentrationsbereich wie das in Tieren gebildete strukturanaloge 15d-PGJ₂ den NF-κB-Signalweg inhibieren und somit potentiell eine antiinflammatorische Wirkung aufweisen.

VI. SUMMARY

Phytosteranes (PP) are formed *in vivo* and *in vitro* by free radical-catalyzed peroxidation of linolenic acid. The aim of the present thesis was to investigate, whether jasmonate-like products could be synthesized via the postulated phytosterane D₁ pathway and whether these compounds display biological activity similar to jasmonates in plants and to cyclopentenone prostanoids in animals.

The following results were obtained:

1. Phytosteranes containing the prostaglandin D- and deoxy J-like ring structure (PPD₁ and dPPJ₁) were prepared by partial synthesis. Each phytosterane class is comprised of two racemic regioisomers (type I and type II). dPPJ₁ regioisomers were separated by chromatography and characterized by UV spectroscopy and mass spectrometry.
2. PPD₁ and dPPJ₁ were also prepared by autoxidation of linolenic acid *in vitro*. Methods for the preparative isolation of these compounds were developed. Yields of pure dPPJ₁ regioisomers were 210 µg and 290 µg per g of linolenate for type I and II compounds, respectively. A large scale preparation of PPD₁ regioisomers was not practicable.
3. A novel analysis method for the quantitation of PPD₁ and dPPJ₁ was developed. Due to the chemical reactivity of the α,β-unsaturated ketone component in cyclopentenones like dPPJ₁, these compounds selectively react with 7-mercapto-4-methylcoumarin, a fluorescent molecule. Analysis of the obtained fluorescent products was performed by HPLC using fluorescence detection. This method allowed the identification of PPD₁ and dPPJ₁ regioisomers as well as OPDA, a structurally related phytohormone, in all plants investigated so far. The detection limit of these compounds was approximately 10 ng.
4. For the first time, determination of all products of the phytosterane D₁ pathway in plants was achieved using this method. One exception is dPPJ₁-I, which was already discovered 20 years ago by Bohlmanns group in dried plant material from *Chromolaena morii* and *C. chasleae*. The biosynthesis of this compound remained unclear, since several hypotheses that have been proposed could not be substantiated experimentally. Our results suggest, that the compound characterized by Bohlmann *et al.* is not limited to *Chromolaena* species, but is

formed during autoxidation of linolenate via the phytoprostane D₁ pathway in all plants.

5. PPD₁ were detected in healthy and untreated plants of *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* in a concentration range of 348 - 2239 ng per g of dry weight for type I and 492 - 3995 ng per gram of dry weight for the type II regioisomer. The determined concentrations for dPPJ₁ were in a range of 294 - 932 ng per g of dry weight for the type I regioisomer and 1074 - 2413 ng per g of dry weight for type II, respectively. dPPJ₁ is structurally related to the phytohormone OPDA. OPDA was detected in the above mentioned plants in levels of 67 - 549 ng per g of dry weight. The main products of the non-enzymatic PPD₁ pathway exceed the levels of enzymatically formed OPDA.
6. *A. thaliana* plants were chilled for 10 min at 4°C. This short cold shock caused an approximately twofold induction of dPPJ₁-I (597 ng per g of dry weight) compared to control plants (317 ng per g of dry weight), which were stored at 20°C. dPPJ₁-II levels increased from 1082 ng (controls) to 2764 ng per g of dry weight. In addition, OPDA levels rose approximately twofold in the cold. This result indicates, that already mild stress conditions trigger formation of free radicals and, as a consequence, the synthesis of dPPJ₁.
7. The augmented formation of free radicals, e.g. during oxidative stress, causes a non-enzymatic lipid peroxidation and a transient accumulation of phytoprostanes. Treatment of *L. esculentum* cell suspension cultures with cupric acetate (250 µM), a strong inductor of free radical catalyzed lipid peroxidation, resulted in a 4-fold increase of free dPPJ₁ with a maximum value between 2 and 4 h. Induction of OPDA was not observed in this experiment.
8. Treatment of *N. tabacum* cell cultures with cupric acetate (500 µM) also resulted in an accumulation of dPPJ₁. Levels of dPPJ₁-I and dPPJ₁-II increased up to 11- and 7-fold. Maximum values were observed after 2 h. Beside the accumulation of phytoprostanes also an accumulation of scopoletin, a antimicrobial secondary metabolite, in the cell culture medium could be observed. Maximum levels of scopoletin were determined after 6 h, 4 h later than the maximum phytoprostane levels. Exogenous addition of dPPJ₁ (10 µM) to *N. tabacum* cell cultures also resulted in an accumulation of scopoletin. Maximum scopoletin concentrations were observed after 2 - 4 h. Both regioisomers exhibit similar activities, resulting in a 14- to 15-fold increase of scopoletin with a maximum after 2 - 4 h. Results are compatible with the

hypothesis that dPPJ₁ act as mediators of oxidative stress at least in this system. Treatment of the cell culture with exogenous OPDA (10 µM) led to a 18-fold induction of scopoletin with a maximum value after 2 - 4 h. However, formation of OPDA in *N. tabacum* was not induced by cupric acetate. Consequently OPDA could be ruled out as potential mediator of scopoletin release in *N. tabacum*.

9. Electrophilic compounds such as dPPJ₁ and OPDA are susceptible to covalent reactions with thiols, e.g. of peptides. After incubation of dPPJ₁ (86 µM) with glutathione (GSH, 3,25 mM) for 1 h, 80 % of the cyclopentenones were conjugated to GSH.
10. Exogenous application of dPPJ₁ and OPDA trigger the expression of glutathione-S-transferase 1 (*GST1*) in *A. thaliana*. After 3 h, a more than 14-fold increase of Gst1 expression was observed, compared to control experiments. GST catalyze the conjugation of electrophilic compounds with GSH. This reaction leads to a inactivation of electrophiles, which can be formed through lipid peroxidation during oxidative stress and, thus, possibly can protect cells from the consequences of oxidative stress.
11. dPPJ₁ display pharmacological activity in animal systems. It was shown, that dPPJ₁ inhibit the NF-κB signaling pathway *in vitro* in the same concentration range as the structurally related mammalian 15d-PGJ₂ and, hence, may exert antiinflammatory properties.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- A-H-Mackerness, S., John, C. F., Jordan, B. und Thomas, B.** (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* 489, 237-242.
- Alméras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., M ene-Saffran e, L. und Farmer, E. E.** (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34, 205-216.
- Atsmon, J., Sweetman, B. J., Baertschi, S. W., Harris, T. M. und Roberts, L. J.** (1990). Formation of Thiol Conjugates of 9-Deoxy- Δ^9 - Δ^{12} (E)-prostaglandin D_2 and Δ^{12} (E)-Prostaglandin D_2 . *Biochemistry.* 29, 3760-3765.
- Baker, B. J., Okuda, R. K., Yu, P. T. K. und Scheuer, P. J.** (1985). Punaglandins: Halogenated antitumor eicosanoids from the octocoral *Telestoa riisei*. *J Am. Chem. Soc.* 107, 2976-2977.
- Bell-Parikh, L. C., Ide, T., Lawson, J. A., McNamara, P., Reilly, M. und FitzGerald, G. A.** (2003). Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ₂ and the ligation of PPARgamma. *J. Clin. Invest.* 112, 945-955.
- Biesgen, C. und Weiler, E. W.** (1999). Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 208, 155-165.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Xia, Z.-Q. und Zenk, M. H.** (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 4099-4105.
- Blee, E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37, 33-72.
- Bl ee, E.** (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315-321.
- Bohlmann, F., Borthakur, N., King, R. M. und Robinson, H.** (1982a). Further prostaglandin-like fatty acids from *Chromolaena morii*. *Phytochemistry.* 21, 125-127.
- Bohlmann, F., Gupta, R. K., King, R. M. und Robinson, H.** (1981). Prostaglandin-like fatty acid derivative from *Chromolaena morii*. *Phytochemistry.* 20, 1417-1418.
- Bohlmann, F., Singh, P., Jakupovic, J., King, R. M. und Robinson, H.** (1982b). Three cadeinene derivatives and a prostaglandin-like acid from *Chromolaena* species. *Phytochemistry.* 21, 371-374.
- Bundy, G. L.** (1985). Nonmammalian sources of eicosanoids. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research.* J. E. Pike und D. R. Morton. New York, Raven Press. 14, 229-262.
- Cerunda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J. und Perez-Sala, D.** (2001). 15-Deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibition of NF- κ B-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 35530-35536.
- Chen, Y., Morrow, J. D. und Roberts, I. L. J.** (1999). Formation of reactive cyclopentenone compounds *in vivo* as products of the isoprostane pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 10863-10868.

- Chiabrando, C., Valagussa, A., Rivalta, C., Durand, T., Guy, A., Zuccato, E., Villa, P., Rossi, J.-C. und Fanelli, R.** (1999). Identification and measurement of endogenous β -oxidation metabolites of 8-*epi*-prostaglandin $F_{2\alpha}$. *J. Biol. Chem.* 274, 1313-1319.
- Chong, J., Baltz, R., Fritig, B. und 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. und 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.
- Colville-Nash, P. R. und Gilroy, D. W.** (2000). COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins - a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 62, 33-43.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J. A. und Ryan, C. A.** (1996). Intracellular levels of free linolenic and linoleic acid increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111, 797-803.
- Corey, E. J., Shih, C., Shih, N.-Y. und Shimoji, K.** (1984). Preferential formation of 8-*epi*-prostaglandin $F_{2\alpha}$ via the corresponding endoperoxide by a biomimetic cyclization. *Tetrahedron Lett.* 25, 5013-5016.
- Corey, E. J. und 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.
- Costa, C. L., Arruda, P. und Benedetti, C. E.** (2000). An Arabidopsis gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Mol. Biol.* 44, 61-71.
- Creelman, R. A. und Mullet, J. E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355-381.
- Creelman, R. A. und Rao, M. V.** (2002). *The Oxylin Pathway in Arabidopsis*. The Arabidopsis Book.
- Croft, K. P. C., Jüttner, F. und Slusarenko, A. J.** (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol.* 101, 13-24.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. und Clijsters, H.** (1999). The Chemical Behavior of Heavy Metals Plays a Prominent Role in the Induction of Oxidative Stress. *Free Rad. Res.* 31, 39-43.
- Cuzzocrea, S., Wayman, N. S., Mazzon, E., Dugo, L., Di Paola, R., Serraino, I., Britti, D., Chatterjee, P. K., Caputi, A. P. und Thiemermann, C.** (2002). The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J_2 attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol. Pharmacol.* 61, 997-1007.
- Desikan, R., Mackerness, A.-H., Hancock, J. T. und Neill, S. J.** (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127, 159-172.

- Doehl, J. und Greibrokk, T.** (1989). Identification of reaction products from the pyridinium dichromate derivatization of prostaglandins by high-performance liquid chromatography and direct chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 477, 345-357.
- Fam, S. S., Murphey, L. J., Terry, E. S., Zackert, W. E., Chen, Y., Gao, L., Pandalai, S., Milne, G. L., Roberts, L. J., Porter, N. A., Montine, T. J. und Morrow, J. D.** (2002). Formation of Highly Reactive A-ring and J-ring Isoprostane-like Compounds (A_4/J_4 -neuroprostanes) *in vivo* from Docosahexaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 277, 36076-36084.
- Fangour, S. E., Guy, A., Vidal, J.-P., Rossi, J.-C. und Durand, T.** (2003). Total synthesis of phytprostane F_1 and its 16 epimer. *Tetrahedron Lett.* 44, 2105-2108.
- Farmer, E. E., Alméras, E. und Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Op. Plant Biol.* 6, 1-7.
- Farmer, E. E. und Ryan, C. A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 7713-7716.
- Farmer, E. E. und Ryan, C. A.** (1992). Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends Cell Biol.* 2, 236-241.
- Feussner, I. und Wasternack, C.** (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297.
- Feys, B. J. S., Bendetti, C. E., Penfold, C. N. und Turner, J. G.** (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell.* 6, 751-759.
- Fitzpatrick, F. A. und Wynalda, M. A.** (1983). Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D_2 . Identification of products formed *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 258, 11713-11718.
- Fontana, L., Giagulli, C., Cominacini, L. D., Pasini, A. F., Minuz, P., Lechi, A., Sala, A. und Laudanna, C.** (2002). β_2 Integrin-dependent neutrophil adhesion induced by minimally modified low-density lipoproteins is mainly mediated by F_2 -Isoprostanes. *Circulation.* 106, 2434-2441.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. und Evans, R. M.** (1995). 15-Deoxy- Δ^{12} , 14-prostaglandin J_2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 83, 803-812.
- Frankel, E. N.** (1998). Linolenate oxidation. *Lipid Oxidation, The Oily Press, Dundee, UK,* 29-48.
- Fukushima, M.** (1990). Prostaglandin J_2 - anti-tumor and anti-viral activities and the mechanisms involved. *Eicosanoids.* 3, 189-199.
- Fukushima, M.** (1992). Biological Activities and Mechanisms of Action of PGJ_2 and Related Compounds: an update. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids.* 47, 1-12.
- Fukushima, M., Kato, T., Ota, K., Arai, Y., Narumiya, S. und Hayaishi, O.** (1982). 9-Deoxy- Δ^{12} -prostaglandin D_2 , a prostaglandin D_2 derivative with potent

- antineoplastic and weak smooth muscle-contracting activities. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 109, 626-633.
- Garcia, A., Baquedano, F. J., Navarro, P. und Castillo, F. J.** (1999). Oxidative Stress Induced by Copper in Sunflower Plants. *Free Rad. Res.* 31, 45-50.
- Gerwick, W. H.** (1993). Carbocyclic Oxylinins of Marine Origin. *Chem. Rev.* 93, 1807-1823.
- Gilroy, D. W., Coleville-Nash, P. R., Chivers, D. W. J., Paul-Clark, M. J. und Willoughby, D. A.** (1999). Inducible cyclooxygenase may have antiinflammatory properties. *Nature Medicine.* 5, 698-701.
- Goy, P. A., Signer, H., Reist, R., Aichholz, R., Blum, W., Schmidt, E. und Kessmann, H.** (1993). Accumulation of scopoletin is associated with high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* X *Nicotiana debneyi*. *Planta.* 191, 200-206.
- Grant, J. J., Yun, B.-W. und Loake, G. J.** (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J.* 24, 569-582.
- Grechkin, A.** (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 37, 317-352.
- Grechkin, A. N.** (1995). Clavulones and related *tert*-hydroxycyclopentenone fatty acids: occurrence, physiological activity and problem of biogenetic origin. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 11, 205-218.
- Grechkin, A. N. und Hamberg, M.** (2000). Formation of cyclopentenones from all-(E) hydroperoxides of linoleic acid via allene oxides. New insight into the mechanism of cyclization. *FEBS Lett.* 466, 63-66.
- Gundlach, H.** (1992). Das Abwehrsystem der Pflanzen: Reinigung eines Elicitors und Induktion von Sekundärstoffen in pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M. und Zenk, M. H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2389-2393.
- Gundlach, H. und Zenk, M. H.** (1998). Biological activity and biosynthesis of pentacyclic oxylinins: the linoleic acid pathway. *Phytochemistry.* 47, 527-537.
- Haberl, C., Hultner, L., Flugel, A., Falk, M., Geuenich, S., Wilmanns, W. und Denzlinger, C.** (1998). Release of prostaglandin D₂ by murine mast cells: importance of metabolite formation for antiproliferative activity. *Mediators of Inflammation.* 7, 79-84.
- Hamberg, M.** (2000). New Cyclopentenone Fatty Acids Formed from Linoleic and Linolenic Acids in Potato. *Lipids.* 35, 353-363.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T. und Samuelsson, B.** (1974). Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71, 345-349.
- Hart, T. W., Metcalfe, D. A. und Scheinmann, F.** (1979). Total Synthesis of (+/-) Prostaglandin D₁: Use of Trimethylsilyl Protecting Groups. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 156.

- Hirata, Y., Hayashi, H., Ito, S., Kikawa, Y., Ishibashi, M., Sudo, M., Miyazaki, H., Fukushima, M., Narumiya, S. und Hayaishi, O. (1988). Occurrence of 9-deoxy- Δ^9, Δ^{12} -13,14-dihydroprostaglandin D₂ in human urine. *J Biol Chem.* 263, 16619-16625.
- Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J. und Ryan, C. A. (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is comprised in signalling for defense against insect attack. *Plant Cell.* 8, 2067-2077.
- Hurst, J. S., Flatman, S. und McDonald-Gibson, R. G. (1987). Thin-layer chromatography (including radio thin-layer chromatography and autoradiography) of prostaglandins and related compounds. *Prostaglandins and related substances: a practical approach.*
- Iguchi, K., Mori, K., Yamada, Y., Honda, A. und Mori, Y. (1985). Chlorovulones, new halogenated marine prostanoids with an antitumor activity from the stolonifer *Clavuraria viridis* Quoy and Gaimard. *Tetrahedron Lett.* 26, 5787-5790.
- Imbusch, R. (2001). Phytoprostane F₁ - eine neue Klasse Prostaglandin-ähnlicher Verbindungen in Pflanzen. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Imbusch, R. und Mueller, M. J. (2000a). Formation of isoprostane F₂-like compounds (phytoprostanes F₁) from α -linolenic acid in plants. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 720-726.
- Imbusch, R. und Mueller, M. J. (2000b). Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor-Isoprostanes F₁ (Phytoprostanes F₁) in Plants. *Plant Physiol.* 124, 1293-1303.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Hishida, I. und Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *Plant Cell.* 13, 2191-2209.
- Janssen, L. J. (2001). Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L1067-1082.
- Jenny, E. F., Schäublin, P., Fritz, H. und Fuhrer, H. (1974). Total synthesis of Prostaglandin D₂. *Tetrahedron Lett.* 26, 2235-2238.
- Kikuchi, H., Tsukitani, Y., Iguchi, K. und Yamada, Y. (1982). Clavulones, new type of prostanoids from the stolonifer *Clavuraria viridis* Quoy and Gaimard. *Tetrahedron Lett.* 23, 5171-5174.
- Kim, I.-K., Lee, J.-H., Sohn, H.-W., Kim, H.-S. und Kim, S.-H. (1993). Prostaglandin A₂ and Δ^{12} -prostaglandin J₂ induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS.* 321, 209-214.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. und Lehmann, J. M. (1995). A 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 83, 813-819.
- Kobayashi, M., Yasugawa, T., Yoshihara, M., Akutsu, H., Kyogoku, Y. und Kitagawa, I. (1982). Four new prostanoids: claviridenone-A, -B, -C and -D from the Okinawan sorf coral *Clavularia viridis*. *Tetrahedron Lett.* 23, 5331-5334.

- Koljak, R., Järving, I., Kurg, R., Boeglin, W. E., Varvas, K., Valmsen, K., Ustav, M., Brash, A. R. und Samel, N.** (2001). The Basis of Prostaglandin Synthesis in Coral. *J Biol Chem.* 276, 7033-7040.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. und Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2940-2945.
- Kudo, I. und Murakami, M.** (2002). Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 3-58.
- Lamb, C. und Dixon, R. A.** (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48, 251-275.
- Liechti, R. und Farmer, E. E.** (2002). The Jasmonate Pathway. *Science.* 296, 1649-1650.
- Linsmaier, E. M. und Skoog, F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100-127.
- Liu, T. Z., Stern, A. und Morrow, J. D.** (1998). The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. An overview. *J. Biomed. Sci.* 5, 415-420.
- Loeffler, C., Thoma, I., Krischke, M. und Mueller, M.** (2003). The dinor isoprostane pathway in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 525, 217-220.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J.** (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Marathe, G. K., Zimmermann, G. A. und McIntyre, T. M.** (2003). Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 278, 3937-3947.
- Marks, F. und Fürstenberger, G.** (1999). *Prostaglandins, Leukotrienes and other Eicosanoids.* WILEY-VCH.
- Maxey, K. M., Hessler, E., MacDonald, J. und Hitchingham, L.** (2000). The nature and composition of 15-deoxy-(delta)^{12,14}PGJ₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 62, 15-21.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. und Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5473-5477.
- Moos, P. J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E. und Fitzpatrick, F. A.** (2003). Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 278, 745-750.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, H. J., Blair, I. A. und Roberts, L. J. n.** (1992). 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., Chen, J., Brame, C. J., Yang, J., Sanchez, S. C., Xu, J., Zackert, W. E., Awad, J. A. und Roberts, L. J.** (1999). The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab. Rev.* 31, 117-139.

- Morrow, J. D., Harris, T. M. und Roberts, L. J. n.** (1990a). Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* 184, 1-10.
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F. und Roberts, L. J.** (1990b). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 9383-9387.
- Morrow, J. D., Minton, T. A., Mukundan, C. R., Campbell, M. D., Zackert, W. E., Daniel, V. C., Badr, K. F., Blair, I. A. und Roberts, L. J.** (1994). Free radical-induced generation of isoprostanes *in vivo*. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J. Biol. Chem.* 269, 4317-4326.
- Morrow, J. D. und Roberts, L. J.** (1997). The isoprostanes: unique bioreactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid Res.* 36, 1-21.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., Williamson, B., Lyon, G. D. und Deighton, N.** (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* 53, 207-214.
- Mueller, M. J.** (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant.* 100, 653-663.
- Mueller, M. J.** (1998). Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem. Biol.* 5, 323-333.
- Mueller, M. J. und 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. und Zenk, M. H.** (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7490-7494.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. und Ushikubi, F.** (1999). Prostanoid Receptors: Structures, Properties and Functions. *Physiological Reviews.* 79, 1193-1226.
- Narvaéz-Vásquez, J., Florin-Christensen, J. und Ryan, C. A.** (1999). Positional Specificity of a Phospholipase A Activity induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors on Tomato Leaves. *Plant Cell.* 11, 2249-2260.
- Negishi, M. und Katoh, H.** (2002). Cyclopentenone prostaglandin receptors. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 68-69, 611-617.
- Neill, S. J., Desikan, R. und Hancock, J. T.** (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Op. Plant Biol.* 5, 388-395.
- Nishizawa, E. E., Miller, W. L., Gorman, R. R., G.L., B., Svensson, J. und M., H.** (1975). Prostaglandin D₂ as potential antithrombotic agent. *Prostaglandins.* 9, 109-121.
- Nourooz-Zadeh, J., Halliwell, B. und Anggard, E.** (1997). Formation of a novel class of F₃-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid (EPA). *Adv. Exp. Med. Biol.* 433.
- O`Kane, D., Gill, V., Boyd, P. und Burdon, R.** (1996). Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta.* 198, 371-377.

- O'Connor, D. E., Mihelich, E. D. und Coleman, M. C.** (1981). Isolation and characterisation of bicyclo endoperoxides derived from methyl linolenate. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 223-224.
- O'Connor, D. E., Mihelich, E. D. und Coleman, M. C.** (1984). Stereochemical course of the autoxidative cyclization of lipid hydroperoxides to prostaglandin-like bicyclo endoperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 3577-3584.
- Oliva, J. L., Perez-Sala, D., Castrillo, A., Martinez, N., Canada, F. J., Bosca, L. und Rojas, J. M.** (2003). The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 binds to and activates H-Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 4772-4777.
- Orozco-Cárdenas, M. und Ryan, C. A.** (1999). Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 6553-6557.
- Parchmann, S.** (1999). Prostaglandin-Analoga in Pflanzen: 12-Oxo-Phytodiensäure und Dinor-Isoprostane. Herbert Utz Verlag.
- Parchmann, S. und Mueller, M. J.** (1998). Evidence for the formation of dinor isoprostanes E_1 from α -linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.* 273, 32650-32655.
- Porter, N. A., Zuraw, P. J. und Sullivan, J. A.** (1984). Peroxymercuration-demercuration of lipid hydroperoxides. *Tetrahedron Lett.* 25, 807-810.
- Pratico, D., Lawson, J. A., Rokach, J. und FitzGerald, G. A.** (2001). The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrin. Metab.* 12, 243-247.
- Reich, E. E., Zackert, W. E., Brame, C. J., Chen, Y., Roberts, L. J., Hachey, D. L., Montine, T. J. und Morrow, J. D.** (2000). Formation of Novel D-Ring and E-Ring Isoprostane-like Compounds (D_4/E_4 -Neuroprostanes) *in Vivo* from Docosahexaenoic Acid. *Biochemistry.* 39, 2376-2383.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. und Farmer, E. E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12, 707-719.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. und Glass, C. K.** (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391, 79-82.
- Roberts, L. J. und Morrow, J. D.** (2002). Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59, 808-820.
- Roberts, L. J., Morrow, J. D., Montine, T. J., Markesbery, W. R., Tapper, A. R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W. D. und Morrow, J. D.** (1998). Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) *in vivo* from docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 273, 13605-13612.
- Rodriguez, A. R. und Spur, B. W.** (2003). First total synthesis of the E type I phytprostanes. *Tetrahedron Lett.* 44, 7411-7415.
- Rokach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S. W., Adiyaman, M., Lawson, J. A. und FitzGerald, G. A.** (1997b). The Isoprostanes: A Perspective. *Prostaglandins.* 54, 823-851.

- Rokach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S.-W., Adiyaman, M., Lawson, J. A. und FitzGerald, G. A.** (1997a). Nomenclature of Isoprostanes: A proposal. *Prostaglandins*. 54, 853-873.
- Rossi, A., Elia, G. und Santoro, M. G.** (1996). 2-Cyclopenten-1-one, a new inducer of heat shock protein with antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 271, 32192-32196.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. und M.G., S.** (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature*. 403, 103-108.
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P. und Sanchez-Serrano, J. J.** (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 1146-1151.
- Santoro, M. G.** (1997). Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol.* 5, 276-281.
- Schaller, F.** (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* 52, 11-23.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T. und W., W. E.** (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*. 210, 979-984.
- Schaller, F. und Weiler, E. W.** (1997). Molecular cloning and characterisation of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 272, 28066-28672.
- Schützendübel, A. und Polle, A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351-1365.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. und Okazaki, M.** (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* 132, 13-19.
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M. und Uchida, K.** (2002). 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J_2 . A prostaglandin D_2 metabolite generated during inflammatory processes. *J. Biol. Chem.* 277, 10459-10466.
- Smith, W. L.** (1992). Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* 263, F181-F191.
- Smith, W. L. und Fitzpatrick, F. A.** (1996). The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. D. E. Vance und J. E. Vance. New York, Elsevier Science B. V., 283-307.
- Smith, W. L. und Marnett, L. M.** (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1083, 1-17.
- Stelmach, B. A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. und Weiler, E. W.** (2001). A novel class of oxylipins, *sn*-1-O-(12-oxophytodienoyl)-*sn*-2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 12832-12838.

- Stelmach, B. A., Müller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L. und Weiler, E. W.** (1998). Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in mechanotransduction. *Phytochemistry*. 47, 539-546.
- Stintzi, A. und Browse, J.** (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. und Farmer, E. E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1-6.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P. und Schaller, A.** (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* 32, 585-601.
- Straus, D. S. und Glass, C. K.** (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21, 185-210.
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C.-H., Sengchanthalangsy, L. L., Gosh, G. und Glass, C. K.** (2000). 15-Deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-κB signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 4844-4849.
- Subbanagounder, G., Deng, Y., Borromeo, C., Dooley, A. N., Berliner, J. A. und Salomon, R. G.** (2002). Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions in endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* 38, 201-209.
- Taguchi, G., Yoshizawa, K., Kodaira, R., Hayashida, N. und Okazaki, M.** (2001). Plant hormone regulation on scopoletin metabolism from culture medium into tobacco cells. *Plant Sci.* 160, 905-911.
- Thévenon, C., Guichardant, M. und Lagarde, M.** (2001). Gas chromatographic-mass spectrometric measurement of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in urine. *Clin. Chem.* 47, 768-770.
- Thieringer, R., Fenyk-Melody, J. E., Le Grand, C. B., Shelton, B. A., Detmers, P. A., Somers, E. P., Carbin, L., Moller, D. E., Wright, S. D. und Berger, J.** (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol.* 164, 1046-1054.
- Thoma, I.** (2003). Cyclopentenon-Phytoprostane als Induktoren von pflanzlichen Abwehrreaktionen. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A. K., Gupta, M., Steffan, B., Krischke, M., Roitsch, T. und Mueller, M. J.** (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34, 363-375.
- Tijet, N. und Brash, A. R.** (2002). Allene oxide synthase and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 423-431.
- Turner, J. G., Ellis, C. und Devoto, A.** (2002). The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell (Supplement 2002)*, 153-164.

- Vaidya, S., Somer, E. P., Wright, S. D., Detmers, P. A. und Bansal, V. S.** (1999). 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin \downarrow inhibits the β_2 integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol.* 163, 6187-6192.
- Valmsen, K., Järving, I., Boeglin, W. E., Varvas, K., Koljak, R., Pehk, T., Brash, A. R. und Samel, N.** (2001). The origin of 15R-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7700-7705.
- Varvas, K., Järving, I., Koljak, R., Valmsen, K., Brash, A. R. und Samel, N.** (1999). Evidence of a Cyclooxygenase-related Prostaglandin Synthesis in Coral. *J Biol Chem.* 274, 9923-9929.
- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C.** (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 470-477.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A. und 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.
- von Euler, U. S.** (1934). Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 175, 78-84.
- Vranová, E., Inze, D. und 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.
- Weber, H., Vick, B. A. und Farmer, E. E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 10473-10478.
- Weiler, E. W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Liss, H., Andert, L. und Spengler, P.** (1993). Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in tendrill coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry.* 32, 591-600.
- Weiler, E. W., Kutchan, T. M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U. und Bublitz, F.** (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.* 345, 9-13.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692.
- Xie, D.-X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. und Turner, J. G.** (1998). *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science.* 280, 1091-1094.
- Yang, K. Y., Liu, Y. und Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *PNAS.* 98, 741-746.
- Yin, H., Havrilla, C. M., Gao, L., Morrow, J. D. und Porter, N. A.** (2003). Mechanisms for the Formation of Isoprostane Endoperoxides from Arachidonic Acid. "Dioxetan" intermediate versus β -fragmentation of peroxy radicals? *J. Biol. Chem.* 278, 16720-16725.

- Zanoni, G., Castronovo, F., Perani, E. und Vidari, G.** (2003c). A -> J Prostaglandin Swap: A New Tactic for Cyclopentenone Prostaglandin Synthesis. *J. Org. Chem.* 68, 6803-6805.
- Zanoni, G., Porta, A., Castronovo, F. und Vidari, G.** (2003b). First Total Synthesis of J₂ Isoprostane. *J. Org. Chem.* 68, 6005-6010.
- Zanoni, G., Porta, A. und Vidari, G.** (2003a). First Total Synthesis of A₂ Isoprostane. *J. Org. Chem.* 67, 4346-4351.
- Zhang, S. und Klessig, D. F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6, 520-527.

PUBLIKATIONSLISTE

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*, 62, 351-358.

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

Thoma, I., Krischke, M., Loeffler, C. and Mueller, M.J. (2003). The isoprostanoid pathway in plants. *Chemistry and Physics of Lipids*, im Druck.

Loeffler, C., Thoma, I., Krischke, M., Mueller, M.J. (2003). The dinor isoprostane pathway in plants. *Advances in experimental medicine and biology*, im Druck.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Begeisterung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen haben ebenso wie seine fachliche und persönliche Unterstützung wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen in München und Würzburg, die durch die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und das angenehme Arbeitsklima ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. R. Imbusch, Frau Dr. I. Thoma, Frau Dr. C. Löffler und Frau Dr. G. Gresser für die anregenden fachlichen Diskussionen und die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge zur täglichen Laborarbeit. Ihre Freundschaft und persönliche Unterstützung waren ein großer Rückhalt für mich.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau B. Dierich und Frau B. Hilbert für die tatkräftige und kompetente Unterstützung bei zahlreichen Experimenten und der Pflege der verwendeten Zellkulturen.

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

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau Anja Krischke, die durch ihr grenzenloses Verständnis, ihre permanente Unterstützung sowie durch ihre unendliche Geduld die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erst ermöglichte.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Markus Krischke
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 30.07.1971
Geburtsort: Starnberg

Schulbildung:

09.1978 - 07.1982 Grundschule Gilching
09.1982 - 07.1991 Gymnasium Gilching
10.07.1991 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07.1991 - 09.1992 Mobiler sozialer Hilfsdienst, Nachbarschaftshilfe Weßling

Hochschulstudium:

10.1992 - 11.1997 Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
21.09.1995 Erste Pharmazeutische Staatsprüfung
27.11.1997 Zweite Pharmazeutische Staatsprüfung

Praktische Ausbildung:

08.1993 Famulatur in der St. Vitus-Apotheke, Gilching
04.1994 Famulatur in der Apotheke im Kreiskrankenhaus Starnberg
11.1997 - 10.1998 Praktische Ausbildung in der Schloss-Apotheke, Neuhausen a. d. Fildern
11.1998 - 12.1998 Mitarbeiter der Schloss-Apotheke, Neuhausen a. d. Fildern
11.12.1998 Dritte Pharmazeutische Staatsprüfung
21.12.1998 Approbation als Apotheker

Promotion:

02.1999 - 07.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von PD Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Anfertigung der vorliegenden Arbeit
08.2001 – 12.2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Anfertigung der vorliegenden Arbeit

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