

Von Untersuchungen biochemischer Mechanismen zu neuen biologischen Mediatoren: Prostaglandinendoperoxide, Thromboxane und Leukotriene (Nobel-Vortrag)**

Von Bengt Samuelsson*

1. Einleitung

Nachdem die gemeinsam mit *Sune Bergström* und seinen Mitarbeitern durchgeführten Arbeiten über die Struktur von Prostaglandinen abgeschlossen waren (siehe Überichten^[1-3]), konnte ich ein Jahr am Chemischen Institut der Harvard University, Cambridge, MA, verbringen. Während dieser Zeit konnte ich mich mit theoretischen und präparativen Aspekten der Organischen Chemie befassen. Das Jahr in Cambridge war für meine weiteren Forschungen äußerst wichtig. Zu dieser Zeit arbeiteten auch *Konrad Bloch*, *E. J. Corey*, *Frank Westheimer*, *Robert B. Woodward* und viele andere bekannte Wissenschaftler in diesem Institut, so daß die Atmosphäre für einen jungen an Chemie interessierten Mediziner äußerst anregend war. Ich war im Laboratorium von *E. J. Corey* tätig und habe seit damals die Zusammenarbeit mit ihm auf vielen Gebieten gepflegt.

1964 war die enge Beziehung zwischen mehrfach ungesättigten Fettsäuren und den Prostaglandinen entdeckt worden^[4,5]. Da dieser Befund große biologische Bedeutung hatte und die beteiligten Reaktionsmechanismen unbekannt waren, beschloß ich, dieses Problem in meinem damals neu etablierten Laboratorium zu untersuchen.

2. Mechanismus der Prostaglandin-Biosynthese

Um das Prostaglandin E₁ (PGE₁) aus 8,11,14-Eicosatriensäure zu bilden, müssen zwei Hydroxygruppen und eine Ketogruppe eingeführt werden. Nach Inkubation der 8,11,14-Eicosatriensäure in einer ¹⁸O₂-Atmosphäre enthielt die Hydroxygruppe ¹⁸O, die Ketogruppe aber nicht^[6,7]. Später fanden wir, daß dieses Phänomen auf einen Sauerstoffaustausch zwischen der Ketogruppe und dem Wasser zurückzuführen ist^[8]. In diesen Versuchen wurde die Ketogruppe sofort mit BH₄ reduziert; die dabei entstandene Trihydroxysäure enthielt drei ¹⁸O-Atome. Diese Reaktion wurde auch in einem ¹⁸O₂/¹⁶O₂-Gemisch durchgeführt^[8]. Das reduzierte Produkt wurde in das Trimethoxyderivat umgewandelt, und die Seitenkette, die eine Hydroxygruppe trägt, wurde durch Oxidation mit Permanganat/Periodat abgespalten. Der entstandene Ester einer Dicarbonsäure enthielt die beiden Sauerstoffatome, die während der Biosynthese in den Fünfring eingebaut werden. Massenspektroskopische Analyse ergab, daß der Ring entweder zwei ¹⁶O-Atome oder zwei ¹⁸O-Atome enthielt, und daß

ein Molekül mit einem ¹⁸O-Atom und einem ¹⁶O-Atom praktisch nicht nachzuweisen war. Nach diesem Befund mußte das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe an C-11 und das der Ketogruppe an C-9 aus demselben Sauerstoffmolekül stammen (Fig. 1).

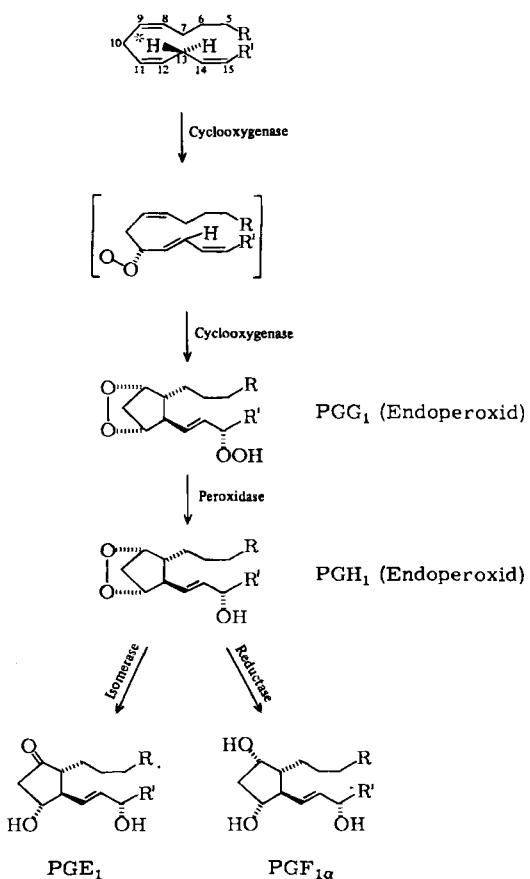


Fig. 1. Mechanismus der Prostaglandin-Biosynthese anhand der Umwandlung der 8,11,14-Eicosatriensäure. R = (CH₂)₃COOH, R' = (CH₂)₄CH₃.

Die Wasserstoffatome an C-8, C-11 und C-12 blieben bei der Umwandlung der 8,11,14-Eicosatriensäure in PGE₁ an ihrem Platz; dies bestätigte den vorgeschlagenen Mechanismus. Experimente mit hypothetischen Zwischenprodukten wie der 15-Hydroperoxy-8,11,13-eicosatriensäure und der 15-Hydroxy-8,11,13-eicosatriensäure zeigten, daß schon in der ersten Reaktion das Sauerstoffmolekül in den Ring eingeführt wird^[9,10]. Zwei Mechanismen schienen möglich^[9-11]: Entweder eine verbrückende Addition des Sauerstoffs an C-9 und C-11 unter Bildung einer neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen C-8 und C-12 oder eine Lipoxygenase-ähnliche Reaktion unter Bildung der 11-Hydroperoxy-8,12,14-eicosatriensäure als erstem Zwischenprodukt. Um zum cyclischen Zwischenprodukt

[*] Prof. Dr. B. Samuelsson
Department of Physiological Chemistry, Karolinska Institutet
S-10401 Stockholm (Schweden)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1983. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

zu gelangen, muß auf beiden Wegen ein Wasserstoffatom an C-13 entfernt werden. Beim zweiten Weg wird der Wasserstoff an C-13 wahrscheinlich im ersten Schritt entfernt, beim ersten Weg passiert das erst später. Es war somit vorstellbar, daß die Entfernung des Wasserstoffatoms der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und daß der Ersatz des Wasserstoffatoms durch ein Tritiumatom im Edukt einen kinetischen Isotopeneffekt hervorrufen würde. Bricht man die Reaktion ab, bevor vollständiger Umsatz erreicht ist, so sollte, falls der zweite Mechanismus zutrifft, Tritium-angereichertes Edukt zurückzugewinnen sein; ist jedoch der erste Mechanismus gültig, so hätte dies eine Anreicherung des Tritiums in einem oxygenierten Zwischenprodukt zur Folge. Wir synthetisierten daraufhin eine Eicosatriensäure, die an C-13 stereospezifisch mit Tritium und an C-3 mit ^{14}C markiert war^[10].

Die Umwandlung der doppelt markierten Säure in PGE₁ wurde durch eine vesikuläre Drüsenträgerpräparation katalysiert, und das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis des Edukts, des Produkts und des zurückgewonnenen Edukts wurde bestimmt. Es zeigte sich, daß die 13D-13- $^3\text{H}, 3-^{14}\text{C}-8,11,14$ -Eicosatriensäure ihre Tritiummarkierung während der Umwandlung in PGE₁ behielt. Aus 13L-13- $^3\text{H}, 3-^{14}\text{C}-8,11,14$ -Eicosatriensäure entstand PGE₁, hingegen unter vollständigem Verlust des Tritiums. Im Edukt, das nach 75% Umsatz zurückgewonnen wurde, war Tritium angereichert (284%). Der erste Schritt bei der Umwandlung von 8,11,14-Eicosatriensäure zu Prostaglandin ist also eine stereospezifische Eliminierung des 13L-Wasserstoffatoms. Diesem Schritt folgt die Einführung von Sauerstoff an C-11 in einer Lipoxygenase-ähnlichen Reaktion; dabei entsteht die 11-Hydroperoxy-8,12,13-eicosatriensäure^[10, 12]. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Lipoxygenase aus Sojabohnen das gleiche Wasserstoffatom regio- und stereospezifisch entfernt^[9]. Die Lipoxygenase aus Pflanzen führt den Sauerstoff jedoch in $\omega 6$ -Position ein, während die Lipoxygenase, die Teil der Prostaglandin-Synthetase ist, den Sauerstoff in $\omega 10$ -Position bringt^[9]. Folgender in Figur 1 gezeigter Mechanismus ist danach plausibel: Bei der primären Oxygenierung entsteht 11-Peroxy-8,12,13-eicosatriensäure; Addition von Sauerstoff an C-15, Isomerisierung der Δ^{13} -Doppelbindung, Bildung einer neuen CC-Bindung zwischen C-8 und C-12 und Angriff des Sauerstoffradikals an C-9 führen zum Endoperoxid PGG₂^[8]. Indirekte Beweise weisen auf eine Beteiligung freier Radikale hin^[13, 14]. Aus dem Endoperoxid wird PGE₁ durch Entfernung des Wasserstoffatoms an C-9 oder PGF_{1a} durch reduktive Spaltung gebildet.

Wurden gewaschene Mikrosomen als Enzymquellen verwendet, entstanden aus der Eicosatriensäure andere Produkte^[15-17], die jedoch nicht in Prostaglandine umgewandelt werden können. Ihre Struktur und das Schicksal der ^3H -markierten Edukte lieferten jedoch zusätzliche Beweise für den vorgeschlagenen Bildungsmechanismus. Die Monohydroxycarbonsäure-Fraktion der Produkte einer Inkubation von Eicosatriensäure enthielt 11-Hydroxy-8,12,14-eicosatriensäure, 15-Hydroxy-8,11,13-eicosatriensäure und (8E,10E)-12-Hydroxy-8,10-heptadecadiensäure. Mit der 3- ^{14}C -Eicosatriensäure, die an C-9, C-10 oder C-11 Tritium-markiert war, wurde der Bildungsmechanismus der C₁₇-Säure studiert^[16]; Tritium ging während der Umwandlung in allen drei Positionen verloren. Als Reaktionsprodukt

konnte Malonaldehyd durch Kondensation mit L-Arginin zu δ -N-2-(Pyrimidinyl)-L-ornithin oder mit Harnstoff zu 2-Hydroxypyrimidin nachgewiesen werden. Die Malonaldehydderivate enthielten das ^3H aus der C-9- und C-11-Position des Edukts; das ^3H aus der Position C-10 ging durch Enolisierung des Malonaldehyds verloren.

Ferner wurde gefunden, daß aus der Eicosatriensäure auch eine Substanz mit ähnlichen chromatographischen Eigenschaften wie PGE₁ entsteht, die durch Reduktion mit BH₄⁻ in PGF_{1a} umgewandelt wird^[17]. Das neue Produkt war eine 9 α ,15-Dihydroxy-11-ketoprosta-13-ensäure (11-Dehydro-PGF_{1a})^[18]. Bei der Reaktion der 9- $^3\text{H}, 3-^{14}\text{C}$ - und der 11- $^3\text{H}, 2-^{14}\text{C}-8,11,14$ -Eicosatriensäure zu 11-Dehydro-PGF_{1a} verlor nur letztere ihre ^3H -Markierung. Alle Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Struktur der Produkte der Eicosatriensäureoxidation und zum Schicksal der ^3H -Markierung bei ihrer Bildung sind in Einklang mit der Existenz eines Endoperoxid-Zwischenproduktes.

3. Isolierung und Charakterisierung der Prostaglandinendoperoxide

Etwas später gelang es, ein Endoperoxid aus Kurzzeit-Inkubationen von Arachidonsäure mit mikrosomalen Fraktionen aus homogenisierten vesikulären Drüsen des Schafes zu gewinnen^[19]. Das Inkubationsgemisch wurde mit SnCl₂ in Ethanol behandelt, um das Endoperoxid zu PGF_{2a} zu reduzieren; nach weiterer Reduktion mit BD₄⁻ bestimmten wir die entstandenen PGE₂-Spezies massenspektroskopisch (MIS). Mit dieser Methode konnten sowohl PGE₂ als auch 11-Dehydro-PGF_{2a} und PGF_{2a} nachgewiesen werden. Es war besonders interessant, daß PGF_{2a} in der Anfangsphase der Inkubation auftrat. In Präparaten von vesikulären Drüsen des Schafes konnte keine metabolische Umwandlung von PGF-Derivaten beobachtet werden; es war daher unwahrscheinlich, daß PGF_{2a} enzymatisch gebildet und sofort metabolisch abgebaut würde. Außerdem konnte PGF_{2a} nicht nachgewiesen werden, wenn nicht mit SnCl₂ und NaBH₄ reduziert wurde; demnach mußte PGF_{2a} durch chemische Reduktion eines oxygenierten Derivates entstanden sein, das in der Anfangsphase der Inkubation anwesend war. Ein weiterer Hinweis auf die Gegenwart eines oxygenierten Zwischenproduktes war es, daß die PGE₂-Bildung langsamer verlief als die Oxygenierung des Edukts.

Zusätzliche Beweise für die Existenz eines oxygenierten Zwischenproduktes, welches durch SnCl₂ zu PGF_{2a} umgewandelt werden kann, lieferten Versuche, in denen reduziertes Glutathion oder p-Mercuribenzoat der mikrosomalen Suspension zugesetzt wurden. Reduziertes Glutathion erhöhte die Geschwindigkeit der PGE₂-Bildung und unterdrückte die Bildung von PGF_{2a}, während p-Mercuribenzoat das Gegenteil bewirkte: PGE₂ entstand langsamer, PGF_{2a} schneller, und sein Anteil im Produktgemisch war erhöht. Das durch diese Versuche nachgewiesene oxygenierte Zwischenprodukt konnte isoliert werden. Durch Dünnschichtchromatographie ließ sich nach kurzer Inkubation (30 s) von markierter Arachidonsäure mit Mikrosomen in Gegenwart von p-Mercuribenzoat ein neues radioaktives Derivat reinigen. Es handelte sich um den Methyl-

ester des früher postulierten Endoperoxides. Später konnte das Endoperoxid als freie Säure erhalten werden; des weiteren wurde ein Endoperoxid mit einer Hydroperoxygruppe am C-15 isoliert^[20, 21]. Wir schlugen die Trivialnamen PGG₂ für das schwächer polare Endoperoxid (15-Hydroperoxy-9 α ,11 α -epidioxyprosta-5,13-diensäure) und PGH₂ für das stärker polare Endoperoxid (15-Hydroxy-9 α ,11 α -epidioxyprosta-5,13-diensäure) vor. Die Struktur von PGG₂ konnte durch drei verschiedene Experimente aufgeklärt werden. Die Umsetzung von PGG₂ mit milden Reduktionsmitteln wie SnCl₂ und Triphenylphosphoran ergab als Hauptprodukt PGF_{2 α} . Das bewies zwar die Existenz der Epidioxybrücke zwischen C-9 und C-11, lieferte aber keine Aussage darüber, ob sich am C-15 eine Hydroxy- oder eine Hydroperoxygruppe befindet, da das Reduktionsmittel diese zu jener reduzieren würde. In einem zweiten Versuch wurde PGG₂ sukzessive in Benzol mit Bleitetraacetat und mit Triphenylphosphoran umgesetzt. In diesem Fall war 15-Keto-PGF_{2 α} das Hauptprodukt. Bleitetraacetat dehydratisiert Hydroperoxide zu Ketonen; dies wies also auf eine Hydroperoxygruppe am C-15 hin. Die Isomerisierung von PGG₂ zu 15-Hydroperoxy-PGE₂ in wäßrigem Medium stützte unabhängig diesen Befund.

Die Reaktion von PGG₂ zu PGE₂ umfaßt zwei Stufen (siehe auch Fig. 1): Zuerst wird die Hydroperoxygruppe am C-15 zu einer Hydroxygruppe reduziert (Peroxidase), dann wird die Endoperoxidstruktur zu einem β -Hydroxyketon isomerisiert (Endoperoxid-Isomerase). Die Endoperoxid-Isomerase kommt fast ausschließlich in der Mikrosomenfraktion vor. Ihre enzymatische Aktivität wurde durch reduziertes Glutathion stimuliert.

Die Endoperoxide waren relativ instabil ($t_{1/2} = 5$ min), in wasserfreiem Aceton waren sie jedoch mehrere Wochen haltbar. An in-vitro-Präparationen gastrointestinaler glatter Muskulatur ähnelten die Wirkungen der Endoperoxide denen von PGE₂ und PGF_{2 α} . Die Wirkungen auf die glatte Muskulatur von Gefäßen (Aorta des Kaninchens) und auf die Luftröhre (Trachea des Meerschweinchens) waren jedoch bedeutend stärker als die von PGE₂ und PGF_{2 α} ^[22]. Beide Endoperoxide verursachten starke Kontraktionen der isolierten umbilikalen Arterie^[*] des Menschen^[23]. Die intravenöse Gabe von PGG₂ und PGH₂ an Meerschweinchen^[22] bewirkte einen erhöhten Insufflationsdruck, der wesentlich ausgeprägter war, als der von PGF_{2 α} ausgelöste. Die Wirkungen der Endoperoxide auf das cardiovasculäre System waren sehr komplex. Der Blutdruck reagierte triphasisch, d. h. auf einen vorübergehenden Druckabfall folgte ein kurzer Anstieg und schließlich ein langdauernder Zustand niedrigen Blutdrucks. Die Experimente mit der glatten Muskulatur von Gefäßen und Luftwegen zeigten, daß die Wirkungen der Endoperoxide nicht auf ihrer Umwandlung in stabile Prostaglandine beruhen können.

Weitere Untersuchungen in unserem Laboratorium ergaben, daß beide Endoperoxide, PGG₂ und PGH₂, schnelle und irreversible Aggregation von menschlichen Blutplättchen verursachen^[19, 20, 24].

4. Entdeckung des instabilen Aggregationsfaktors und der Thromboxane

Die biologischen Wirkungen der reinen Endoperoxide waren besonders für solche Versuche interessant, in denen gezeigt wurde, daß Arachidonsäure die Blutplättchenverklebung verursacht^[25, 26]; nach Inkubation mit Präparationen aus vesikulären Drüsen des Schafes wurde aus Arachidonsäure ein instabiler Aggregationsfaktor (LASS) gebildet^[27-29]. Bezuglich der sogenannten Kaninchenaorta-kontrahierenden Substanz (RCS) war interessant, daß die Endoperoxide die Kontraktion der isolierten Kaninchenaorta stimulierten^[30]. RCS wird in der Meerschweinchenlunge während Anaphylaxie gebildet; die Wirkung der RCS wurde später dem Endoperoxidzwischenprodukt der Prostaglandin-Biosynthese zugeschrieben^[31]. Wir zeigten, daß eine Substanz mit ähnlichen biologischen Eigenschaften nach Gabe von Arachidonsäure zu Blutplättchen gebildet wurde. Die RCS aus Meerschweinchenlunge und aus Blutplättchen bestand aus einer Hauptkomponente mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Sekunden und aus einer Nebenkomponente, die sich aus PGG₂ und/oder PGF₂ mit einer Halbwertszeit von 4–5 Minuten zusammensetzte^[32]. Die kurzlebige Hauptkomponente der RCS entstand bei Zusatz von Arachidonsäure zu Blutplättchen.

Um Informationen über die Struktur der RCS zu erhalten, inkubierten wir 1-¹⁴C-Arachidonsäure mit Suspensions-

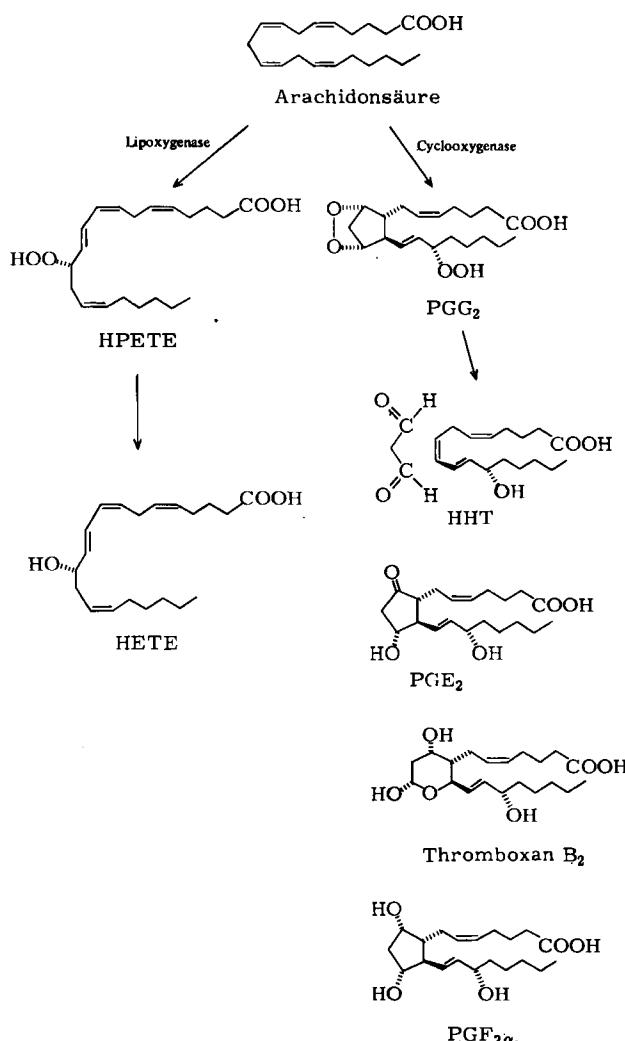


Fig. 2. Umwandlung der Arachidonsäure in menschlichen Blutplättchen.

[*] Anmerkung der Redaktion: Zur Erklärung der Chemikern nicht immer geläufigen medizinischen Fachausdrücke siehe z. B. W. Pschyrembel: *Klinisches Wörterbuch*, 254. Aufl., de Gruyter, Berlin 1982 oder *Duden-Wörterbuch medizinischer Fachausdrücke*, Bibliographisches Institut, Mannheim und Thieme, Stuttgart 1979.

nen von gewaschenen menschlichen Blutplättchen. Drei Hauptmetaboliten wurden isoliert^[33]; einer davon war die (12S)-12-Hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraensäure (12-HETE) (Fig. 2). Das entsprechende Hydroperoxid (HPETE) konnte nach Inkubation der Arachidonsäure mit beschallten Blutplättchen isoliert werden. Auch in den Blutplättchen des Rindes wird 12-HETE aus Arachidonsäure gebildet^[34]. Ein stärker polarer Metabolit war die (12S)-12-Hydroxy-5,8,10-heptadecatriensäure (HHT), und die dritte Komponente war das Halbacetal-Derivat der (12S)-8-(1-Hydroxy-3-oxopropyl)-9,12-dihydroxy-5,10-heptadecadiensäure (Thromboxan B₂, PHD). 1-¹⁴C-PGG₂ wurde von menschlichen Blutplättchen schnell in HHT und Thromboxan B₂ umgewandelt.

Da alle identifizierten Metaboliten der Arachidonsäure stabil waren, konnte es sich bei keiner um die instabile RCS ($t_{1/2}=30$ s) handeln. Es waren also weitere Experimente notwendig, um die Metaboliten der Arachidonsäure zu charakterisieren. Wurde Arachidonsäure mit gewaschenen Blutplättchen inkubiert und ein Teil des Inkubates zu einer Suspension gegeben, die mit Indomethacin präinkubiert worden war, so fand eine Aggregation statt. Sie konnte nicht von PGG₂ oder PGH₂ verursacht sein, da deren Konzentration nur etwa 1% der dafür benötigten ausmachte. Eine detaillierte Analyse des Zeitpunktes, an dem der Aggregationsfaktor und die Endoperoxide gebildet wurden, zeigte, daß die Konzentrationen der Endoperoxide in der frühen Phase der Inkubation am höchsten lagen, während der Aggregationsfaktor sein Maximum später erreichte^[35] (Fig. 3). Experimente mit Filtraten des Inkubates zeigten, daß der Aggregationsfaktor sehr instabil sein mußte. Wird die Dosis (willkürliche Einheit) logarithmisch gegen die Inkubationszeit bei 37°C aufgetragen, so erhält man eine lineare Abhängigkeit. Die Halbwertszeit des Aggregationsfaktors betrug 33–46 Sekunden. Außerdem wurde ein Faktor mit ähnlichen Eigenschaften aus dem Endoperoxid PGG₂ gebildet. Der instabile Faktor verursachte nicht nur irreversible Aggregation, sondern auch die Freisetzung von Serotonin aus den Blutplättchen.

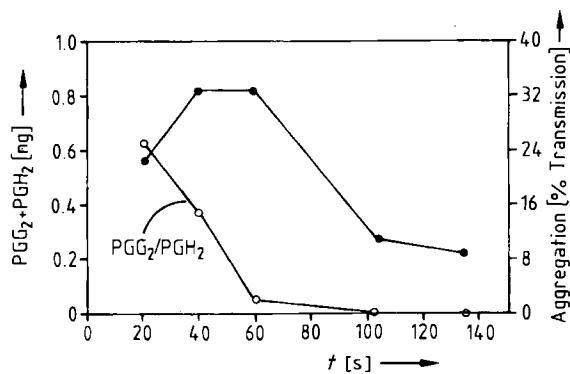


Fig. 3. Maximale Aggregation von 0.1 mL gewaschenen Blutplättchen, die unterschiedlich lang mit 120 ng Arachidonsäure inkubiert worden waren (●—●). Der Gehalt an PGG₂ + PGH₂ in diesen Proben wird ebenfalls gezeigt (○—○). Die verwendete Blutplättchen-Suspension wurde zwei Minuten mit $1.4 \cdot 10^{-5}$ M Indomethacin präinkubiert.

Experimente mit ¹⁸O₂ ergaben, daß Thromboxan B₂ aus PGG₂ durch Umlagerung und nachfolgenden Einbau eines Moleküls H₂O gebildet wird^[33]. Es bestand daher die Mög-

lichkeit, das umgelagerte Zwischenprodukt – falls es nicht allzu kurzlebig war – durch nucleophile Reagentien abzufangen^[36]. Bei Zugabe von 25 Volumina Methanol zu gewaschenen Blutplättchen, die 30 Sekunden mit Arachidonsäure inkubiert worden waren, wurden zwei Derivate gebildet, die weniger polar als Thromboxan B₂ waren; nach der massenspektrometrischen Analyse handelte es sich um Epimere des Methylethers von Thromboxan B₂ (Methylgruppe an der Halbacetal-Hydroxygruppe) (Fig. 4). Die beiden Epimere entstanden auch, wenn zu Blutplättchen, die 30 Sekunden mit PGG₂ inkubiert worden waren, Methanol gegeben wurde. Mit Ethanol anstelle von Methanol bildeten sich die entsprechenden Ethylderivate. Wurden schließlich fünf Volumina einer 5 M Natriumazid-Lösung zu solchen Blutplättchen gegeben, so entstand das entsprechende Azid (Fig. 4). Diese Versuche bewiesen die Existenz eines sehr instabilen Zwischenproduktes bei der Umwandlung von PGG₂ in Thromboxan B₂.

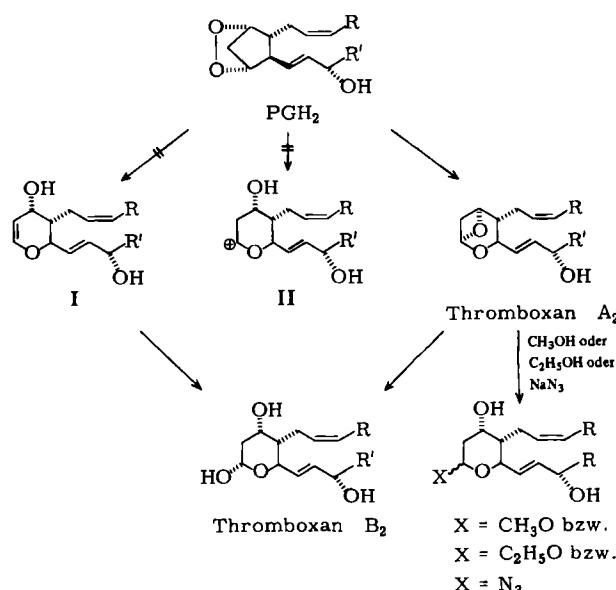


Fig. 4. Umwandlung von PGH₂ in Thromboxan-Derivate. R = (CH₂)₃COOH, R' = (CH₂)₄CH₃.

Um die Halbwertszeit des Zwischenproduktes zu bestimmen, wurden die Blutplättchen 45 Sekunden mit 1-¹⁴C-Arachidonsäure inkubiert und die Reaktion durch Filtration gestoppt. Das klare, blutplättchenfreie Filtrat wurde auf 37°C temperiert; nach bestimmten Zeiten wurde jeweils ein Teil der Lösung entnommen und sofort zu 25 mL Methanol gegeben, in dem Tritium-markiertes monomethyliertes Thromboxan B₂ gelöst war. Man konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der Inkubationszeit und dem Logarithmus des ¹⁴C/³H-Quotienten des gereinigten Methylesters des monomethylierten Thromboxans B₂ beobachten; die so ermittelte Halbwertszeit betrug 32 ± 2 Sekunden.

Figur 4 zeigt die Struktur des instabilen Zwischenproduktes (Thromboxan A₂). Am Acetalkohlenstoffatom sollte ein nucleophiler Angriff möglich sein; mit H₂O ergibt sich dabei Thromboxan B₂, mit CH₃OH, C₂H₅OH und N₃ entstehen die oben erwähnten Derivate von Thromboxan B₂. Zusatz von CH₃O²H zu Blutplättchen, die mit Ara-

chidonsäure inkubiert worden waren, führte zwar zur Bildung von monomethyliertem Thromboxan B₂, doch enthielt dies kein C-gebundenes ²H. Dieser Befund schloß das Vorliegen eines anderen Zwischenproduktes, z. B. eines 3,4-Dihydro-2H-pyran-Derivates (I in Fig. 4), aus. Nach der Halbwertszeit konnte es sich bei dem Zwischenprodukt auch nicht um ein Carbenium-Ion handeln (II in Fig. 4), da diese in wäßrigem Medium wesentlich instabiler sind.

Alle Befunde deuteten darauf hin, daß der Aggregationsfaktor und die RCS auf dieselbe Substanz zurückzuführen waren. Sie entstanden beide aus Arachidonsäure oder PGG₂, ihre Bildung konnte durch Indomethacin blockiert werden, und ihre Halbwertszeiten waren ähnlich. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde vorgeschlagen, daß beide Substanzen mit der instabilen Zwischenstufe aus Blutplättchen identisch seien.

Die neuen „Oxan“-Derivate wurden ihres Ursprungs und ihrer Struktur wegen Thromboxane genannt. Thromboxan A₂ ist eine äußerst instabile bicyclische Verbindung, und Thromboxan B₂ ist das stabile, provisorisch PHD genannte Derivat. Der Index gibt, wie bei der Nomenklatur der Prostaglandine, die Zahl der Doppelbindungen an. Die Struktur von Thromboxan B₂ konnte durch chemische Synthese bestätigt werden^[37-40].

Thromboxan A₂ ist biologisch sehr aktiv: Es induziert die Aggregation von Blutplättchen^[36,40] und wirkt auf die glatte Muskulatur stark gefäßverengend. Das erste untersuchte Gefäß war die Aorta des Kaninchens^[30,32]. Später wurden ähnliche Kontraktionen bei anderen Gefäßen beobachtet, z. B. Koronararterien^[42-46], mesenterialen und coeliachen Arterien^[47,48], umbilicalen Arterien^[23] und an vielen anderen.

Diese doppelte Wirkung von TXA₂ – die Induktion der Vasokonstriktion und der Blutplättchenaggregation – setzt bei Verletzung eines Gefäßes ein. Wahrscheinlich spielt TXA₂ eine Rolle bei normaler Hämostasie in vivo und auch bei pathologischen Situationen mit erhöhter Tendenz zu Gefäßkrämpfen und/oder Thrombose. Über die biologischen Wirkungen und die mögliche Rolle der Thromboxane in vivo sind mehrere Übersichten publiziert^[41,50].

Thromboxan A₂ wirkt außerdem in vitro und in vivo stark kontrahierend auf die Luftwege^[51].

Nach Isolierung der Endoperoxide und Entdeckung des Thromboxans A₂ konnte gezeigt werden, daß die Endoperoxide durch arterielles Gewebe in Produkte mit gegenteiligen Effekten umgewandelt werden^[52]. Man fand, daß es sich dabei um ein Enolether-Derivat handelt^[53]. Diese vasodilatorische und aggregationshemmende Verbindung wurde PGI₂ oder Prostacyclin genannt. Thromboxan A₂ und Prostacyclin bilden wahrscheinlich ein hämostatisches System zur Kontrolle des Tonus der Blutgefäße und der Aggregation von Blutplättchen in vivo. Die Reaktionen der Blutplättchen und der Gefäßwände, die für eine antithrombotische Therapie wichtig sind, werden in Figur 5 zusammengefaßt. Das Hauptinteresse gilt heute der Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Thromboxan-Synthetase (neuere Übersicht siehe^[54]).

5. Entdeckung der Leukotriene

Die Rolle der Prostaglandine bei entzündlichen Vorgängen wurde durch die Entdeckungen von Vane et al. erhellt; sie fanden, daß nicht-steroidale entzündungshemmende Arzneimittel wie Aspirin das Enzym Cyclooxygenase inhibieren, das die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine und Thromboxane katalysiert^[55]. Auch entzündungshemmende Steroide inhibieren die Prostaglandin-Synthese, jedoch nach einem völlig anderen Mechanismus: sie blockieren die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden. Da Aspirin und ähnliche Arzneimittel anders als Steroide wirken, vermuteten wir, daß weitere noch unbekannte Entzündungsmediatoren auf Arachidonsäure zurückzuführen sein könnten.

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Umwandlung der Arachidonsäure in Leukozyten untersucht; dabei entdeckten wir eine neuartige Substanzgruppe, die Leukotriene. Diese scheinen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen und bei entzündlichen Vorgängen zu spielen.

Wurde Arachidonsäure mit polymorphonuclearen (unreifen) Leukozyten inkubiert, so entstand als Hauptmetabolit ein neues Lipoxygenase-Produkt, die (5S)-5-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure (5-HETE)^[56]. Daneben wurden folgende Produkte nachgewiesen: (5S,12R)-5,12-Dihydroxy-6,8,10,14-eicosatetraensäure (Hauptprodukt) (Leukotrien B₄, siehe unten), zwei (5S)-5,12-Dihydroxy-6,8,10,14-eicosatetraensäuren [(E,E,E,Z)-konfiguriert und am C-12 epimer] und zwei isomere 5,6-Dihydroxy-7,9,11,14-eicosatetraensäuren (Fig. 6)^[57,58].

Nach stereochemischen Untersuchungen waren zwei all-trans-konjugierte, C-12-epimere Triensäuren und ein Hauptsomer (12R) mit anderer Konfiguration der Trienheit entstanden; dies warf die Frage nach dem Bildungsmechanismus auf^[58]. Durch Versuche mit ¹⁸O₂ und H₂¹⁸O fanden wir, daß das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe am C-5 dem molekularen Sauerstoff entstammte und das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe am C-12 aus Wasser (Fig. 6)^[59]. Wir nahmen daher an, daß Leukozyten aus Arachidonsäure ein instabiles Zwischenprodukt bilden, das von Wasser, Alkoholen und anderen Nucleophilen angegriffen werden kann; deshalb inkubierten wir Leu-

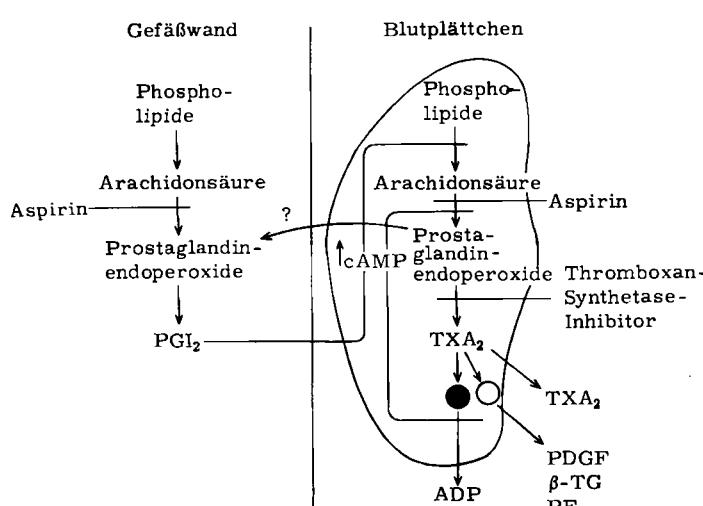
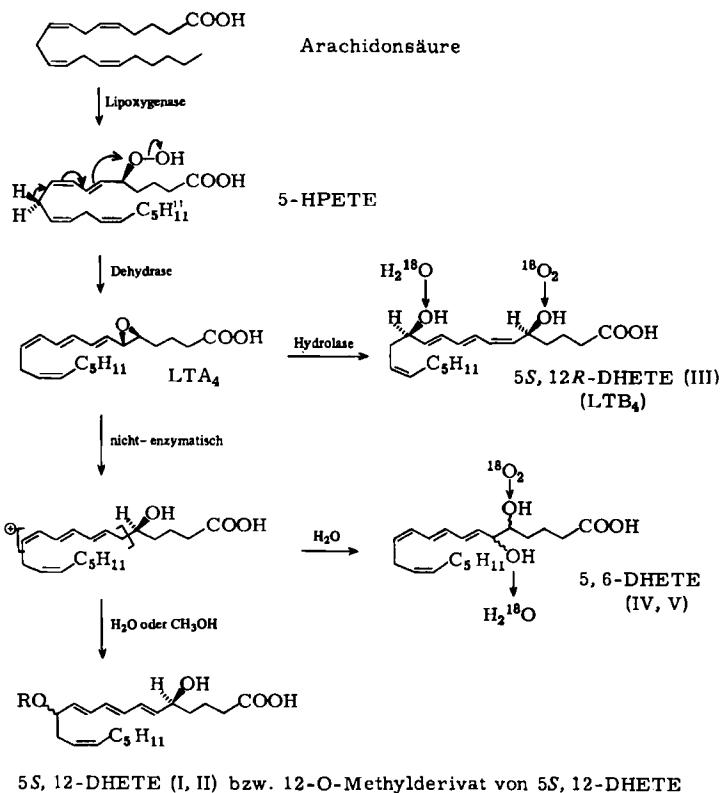


Fig. 5. Wechselwirkung zwischen Blutplättchen und Gefäßwand. PDGF = Platelet Derived Growth Factor; β -TG = β -Thromboglobulin; PF₄ = Platelet Factor 4



5S, 12-DHETE (I, II) bzw. 12-O-Methyl-derivat von 5S, 12-DHETE

Fig. 6. Bildung von Dihydroxy-derivaten aus Arachidonsäure über instabile Zwischenprodukte. Herkunft des Sauerstoffs und Abfangexperimente.

kozyten 30 Sekunden mit Arachidonsäure und setzten dann 10 Volumina Methanol, 10 Volumina Ethanol oder 0.2 Volumina 1 N Salzsäure zu. Mit Methanol (und Ethanol) entstanden zwei neue, weniger polare Substanzen im gleichen Anteil, deren UV-Spektren mit denen von Substanz I und II in Figur 6 übereinstimmten; das konjugierte Trien ist all-trans-konfiguriert (IR). Nach der massenspektroskopischen Analyse handelte es sich bei den beiden Substanzen um Isomere, die eine Hydroxygruppe am C-5 und eine Methoxygruppe am C-12 tragen. Da die OH-Gruppen am C-5 (S)-konfiguriert waren, mußte es sich um die C-12-Epimere der (5S)-5-Hydroxy-12-methoxy-(6E,8E,10E,14Z)-eicosatetraensäure handeln (Fig. 6).

Diese Experimente bewiesen, daß Leukozyten einen Metaboliten der Arachidonsäure bilden, der leicht mit Alkoholen reagiert. Unabhängig von den Bedingungen, unter denen die Versuche durchgeführt wurden, war das Verhältnis der Anteile der Verbindungen I und II umgekehrt zu dem der 12-O-Alkylderivate. Daraus konnte geschlossen werden, daß Verbindung I und II und die 12-O-Alkylderivate nicht-enzymatisch aus demselben Zwischenprodukt gebildet werden.

Die Stabilität des Zwischenproduktes wurde bestimmt, indem Leukozyten mit Arachidonsäure 45 Sekunden inkubiert und danach mit einem Volumen Aceton (um das Enzym zu inaktivieren) versetzt wurden. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden bestimmte Anteile der Mischung entnommen und in einen Kolben transferiert, der fünfzehn Volumina Methanol enthielt. Die Halbwertszeit des Zwischenproduktes – als 12-O-Methyl-derivat nachgewiesen – beträgt 3–4 Minuten. Mit der Abnahme der Konzentration des Zwischenproduktes nahmen die Konzentrationen der

Verbindungen I, II, IV und V (Fig. 6) zu, die der Verbindung III und der 5-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure blieben konstant. Wir vermuteten, daß die epimeren 5,12- und 5,6-Dihydroxysäuren (Verbindungen I, II und IV, V) durch nicht-enzymatische Hydrolyse eines gemeinsamen Zwischenproduktes entstehen, Verbindung III jedoch durch enzymatische Hydrolyse dieses Intermediats (Fig. 6). Ähnliche Experimente bei niedrigem und hohem pH-Wert zeigten, daß das Zwischenprodukt im sauren Milieu labil, im alkalischen aber wesentlich stabiler ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die beiden nicht-enzymatisch gebildeten 5,6-Dihydroxy-derivate (IV und V) aus demselben Zwischenprodukt wie die enzymatisch gebildete (5S,12R)-5,12-Dihydroxy-eicosatetraensäure entstanden; ^{18}O aus molekularem Sauerstoff blieb ausschließlich am C-5 dieser Derivate, während ^{18}O aus Wasser in Position C-6 oder C-12 eingeführt wurde. Aufgrund dieser Daten wurde die Struktur (5S)-5,6-Epoxy-7,9,11,14-eicosatetraensäure (Leukotrien A₄, LTA₄) (Fig. 6) für das Zwischenprodukt vorgeschlagen^[59].

In Figur 6 wird die Bildung der Verbindungen I–V aus dem Epoxid-Zwischenprodukt gezeigt. Mit Ausnahme der Verbindung III entstehen alle durch chemische Hydrolyse des Epoxides; der Mechanismus verläuft über ein Carbenium-Ion, an das sich ein Hydroxid-Ion bevorzugt an C-6 und C-12 zu vier isomeren Produkten addiert, die die stabile konjugierte Trien-Struktur enthalten. Die Verbindung III muß enzymatisch gebildet sein, da sie nur durch nicht-denaturierte Zellpräparationen synthetisiert wird und enantiomerenrein ist.

Die Struktur von Leukotriens A₄^[59] konnte durch chemische Synthese bestätigt werden^[60]. Schon früher hatte man gefunden, daß die enzymatisch gebildete (5S,12R)-5,12-Dihydroxysäure eine cis- und zwei trans-Doppelbindungen im konjugierten Trien aufwies. Die Position der cis-Doppelbindung konnte vor kurzem durch Synthese geklärt werden (Δ^6 -Position)^[61]. Das Allylepoxyd-Zwischenprodukt LTA₄ kann frei existieren, da es aus menschlichen polymorphen Leukozyten isoliert wurde^[62]. Die Biosynthese des Epoxides aus der Arachidonsäure (Fig. 6) beginnt mit der Bildung von 5-Hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure (5-HPETE), das durch Dehydrase in das Epoxid umgewandelt wird; danach verliert das Molekül den pro-R-Wasserstoff am C-10, und aus der Hydroperoxygruppe wird ein Hydroxid-Ion eliminiert^[63]. Die Dehydratisierung wird durch ein lösliches Enzym katalysiert, das vor kurzem aus Leukozyten isoliert werden konnte^[64].

6. „Slow Reacting Substance of Anaphylaxis“ (SRS-A)

Im Jahre 1938 wurde ein Faktor im Perfusat von Meerschweinchenlungen, die mit Kobragift behandelt worden waren, gefunden, der glatte Muskulatur stimuliert (SRS = smooth muscle stimulating factor)^[65]. Dieser Faktor wird auch im Verlauf einer immunologischen Antwort freigesetzt^[66]. Man vermutete, daß er eine wichtige Rolle bei Anaphylaxie und anderen Überempfindlichkeitsreaktionen spielt^[67,68]. Erste Charakterisierungsversuche ergaben, daß SRS ein polares Lipid ist, das UV-Absorption zeigt und Schwefel enthält^[69–71]. Versuche mit markierter Ara-

chidonsäure zeigten, daß sie wahrscheinlich in SRS eingebaut wird^[72, 73].

In unserem Laboratorium fanden wir, daß die Behandlung menschlicher Neutrophile mit dem Ionophor A 23 187 eine Synthese der im vorigen Abschnitt beschriebenen 5,12-Dihydroxycarbonsäure LTB₄ zur Folge hat^[58]. Aufgrund der stimulierenden Wirkung des Ionophors auf die SRS^[74] und die LTB₄-Bildung und der UV-Daten entwickelten wir die Hypothese, daß eine biogenetische Beziehung zwischen dem instabilen Epoxid-Zwischenprodukt und SRS besteht.

Wir fanden, daß bestimmte, mit dem Calcium-Ionophor A 23 187 stimulierte Mastocytoma-Zellen aus Mäusen (CXBGABMCT-1) für die Produktion relativ großer Mengen SRS geeigneter waren als früher beschriebene Systeme^[75]. Die SRS wurde durch HPLC gereinigt; sie hatte ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und verursachte typische Kontraktionen des Ileums von Meerschweinchen; durch FPL-55 712 konnte diese Wirkung zurückgedrängt werden^[75]. Die UV-Absorption ähnelte denen der Dihydroxysäuren, nur war das Maximum um 10 nm langwellig verschoben; dies war in Einklang mit einem Schwefelsubstituenten in α -Stellung zum konjugierten Trien. Sowohl markierte Arachidonsäure als auch Cystein wurden in das Produkt eingebaut.

Die SRS konnte mit Raney-Nickel zur 5-Hydroxyeicosansäure hydriert werden; demnach mußten das Arachidonsäurederivat und Cystein durch eine Thioetherbindung verknüpft sein (Fig. 7). Dieser Befund stützte die Hypothese, nach der eine Beziehung zwischen dem Lipooxygenase-Weg in Leukozyten und der SRS besteht. Die Lage der Doppelbindungen in der SRS wurden durch reduktive Ozonolyse bestimmt. Da 1-Hexanol eines der Produkte war, mußte die Δ^{14} -Doppelbindung der Arachidonsäure erhalten geblieben sein. Bei der Lokalisierung der Trieneinheit halfen uns frühere Untersuchungen in unserem Laboratorium: Arachidonsäure und solche verwandten Fettsäuren, die zwei durch eine Methylengruppe getrennte *cis*-Doppelbindungen in den Positionen ω 5 und ω 9 enthalten, werden unter Isomerisierung der Doppelbindung von ω 6 nach ω 7 oxygeniert. Die Inkubation der SRS

mit Lipooxygenase führte zur Isomerisierung der Δ^{14} -Doppelbindung, so daß ein konjugiertes Tetraen entstand; dies ging mit einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um 30 nm einher. Demnach mußte SRS eine $\Delta^{11}-cis$ -Doppelbindung und zusätzliche Doppelbindungen in Position Δ 7 und Δ 9 enthalten. Nach all diesen Befunden ist SRS ein Derivat der 5-Hydroxy-7,9,11,14-eicosatetraensäure mit einem Cystein-enthaltenden Substituenten, der thioetherartig am C-6 gebunden ist. Da man nach Entschwefelung kein Alanin isolieren konnte, mußte Cystein derivatisiert sein. Der Cystein-enthaltende Substituent wurde RSH genannt^[75-77]. Nach einer Aminosäureanalyse der durch Säure hydrolysierten SRS enthielt diese neben Cystein je ein Äquivalent Glycin und Glutaminsäure. Endgruppenbestimmung (Dansyl-Methode und Hydrazinolyse) und Sequenzanalyse (Dansyl-Edman-Abbau) zeigten, daß es sich bei dem Peptid um γ -Glutamyl-cysteinyl-glycin (Glutathion) handelte. Die SRS aus Mastocytomazellen von Mäusen war also 6-S-Glutathionyl-5-hydroxy-7,9,11,14-eicosatetraensäure, bezeichnet als Leukotrien C₄ (LTC₄) (Fig. 7)^[78]. Der Vergleich mit synthetischem Material bestätigte diese Struktur. Damit hatte man erstmals die Struktur einer SRS-A bestimmt^[78]. In dieser Veröffentlichung wurde auch über die Reinigung des entsprechenden Cysteinyl-glycin-Derivates (LTD₄) und des Cysteinyl-Derivates (LTE₄) berichtet. Diese Verbindungen wurden später aus natürlichen Geweben isoliert (siehe unten). Die vorgeschlagene Stereochemie von LTC₄ wurde durch Totalsynthesen von LTC₄ und Stereoisomeren davon durch Corey et al. bestätigt^[79]. LTC₄ ist demnach korrekt als (5S,6R)-6-S-Glutathionyl-5-hydroxy-(7E,9E,11Z,14Z)-eicosatetraensäure zu bezeichnen^[80].

Spätere Untersuchungen mit einem anderen Zelltypus, den RBL-1-Zellen, ergaben, daß der Hauptanteil der SRS vom LTD₄ [(5S,6R)-6-S-Cysteinyl-glycin-5-hydroxy-(7E,9E,11Z,14Z)-eicosatetraensäure] gestellt wird^[80].

Nach der Strukturbestimmung von SRS aus Mastocytomazellen^[75, 78] und der Synthese von LTC₄, LTD₄ und LTE₄^[78] wurden alle diese Cystein-enthaltenden Leukotriene (Fig. 8) in verschiedenen biologischen Systemen gefunden, indem man sie mit synthetischem Material ver-

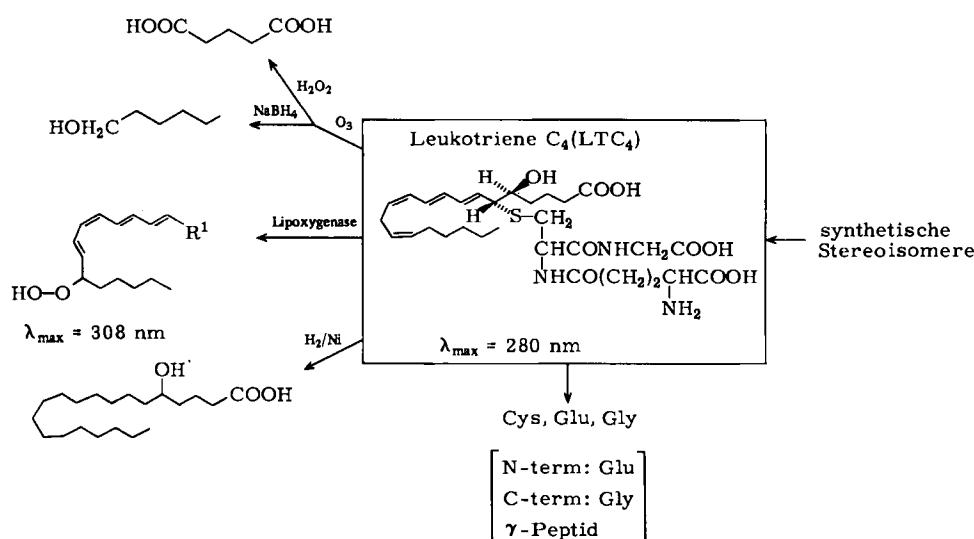


Fig. 7. Einige Umwandlungen von SRS zur Aufklärung seiner Struktur.

glich oder partiell durch chemische und physikalische Methoden charakterisierte (Tabelle 1). SRS-A ist nach allen Befunden eine Mischung aus Cystein-haltigen Leukotrienen, z. B. der Stammverbindung LTC₄ und seiner Metaboliten LTD₄ und LTE₄.

Sowohl in Mastocytomazellen als auch in menschlichen Leukozyten, die mit BW 755, einem Inhibitor des Arachidonsäuremetabolismus, vorbehandelt worden waren, konnte die Bildung von LTC₄ aus LTA₄ durch enzymatische Additionen von Glutathion gezeigt werden^[81]. Durch diese Untersuchungen wurde der ursprünglich vorgeschlagene Syntheseweg der SRS bestätigt, z. B. die Bildung von LTA₄ aus Arachidonsäure über 5-HPTE und die Addition von Glutathion an LTA₄ unter Öffnung des Epoxids am allylischen C-6 zum LTC₄^[75].

Die biologische Bedeutung des Biosyntheseweges und die umständliche systematische Nomenklatur machten die Einführung von Trivialnamen für diese Verbindungen notwendig^[76]. Man wählte den Namen „Leukotriene“, weil sie in Leukozyten entdeckt wurden und als gemeinsames Merkmal ein konjugiertes Triensystem enthalten. Leukotriene werden alphabetisch benannt: Leukotrien A ist eine 5,6-Epoxy-(7E,9E,11Z)-, Leukotrien B eine (5S,12R)-5,12-Dihydroxy-(6Z,8E,10E)-, Leukotrien C eine (5S,6R)-5-S-Glutathionyl-5-hydroxy-(7E,9E,11Z)- und Leukotrien E eine (5S,6R)-6-S-Cysteinyl-5-hydroxy-(7E,9E,11Z)-eicosapolyensäure. Da mehrere Eduktsäuren, die eine Δ⁵-Doppelbindung enthalten (wie z. B. die 5,6,11-Eicosatriensäure, Arachidonsäure und die 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure), in Leukotriene umgewandelt werden können, die drei, vier oder fünf Doppelbindungen enthalten, wird im Index die Zahl der Doppelbindungen angegeben^[82]. Leukotrien A₄ ist also das Epoxy-Derivat der Arachidonsäure, das weiter zu LTB₄, LTC₄ und LTE₄ reagieren kann.

Leukotrien C₄ wird durch enzymatische Eliminierung von Glutaminsäure durch die γ-Glutamyl-Transpeptidase (GGTP) zu Leukotrien D₄ metabolisiert^[80]. Die verbleibende Peptidbindung im Leukotrien D₄ wird durch die renale Dipeptidase hydrolysiert, und es entsteht das Leukotrien E₄^[83]. Vor kurzem wurde gezeigt, daß auch LTE₄ als Acceptor für die γ-Glutaminsäure dienen kann; dabei bildet sich das γ-Glutamyl-cysteinyl-Derivat LTF₄^[84,85] (Fig. 8).

Zusätzlich zur 5-Lipoxygenase enthalten Präparationen von Leukozyten auch Enzyme, die die Einführung von Sauerstoff an C-12 und C-15 katalysieren^[86]. Kürzlich fand man Hinweise darauf, daß Leukotriene nach Oxygenierung dieser Positionen gebildet werden^[87-91].

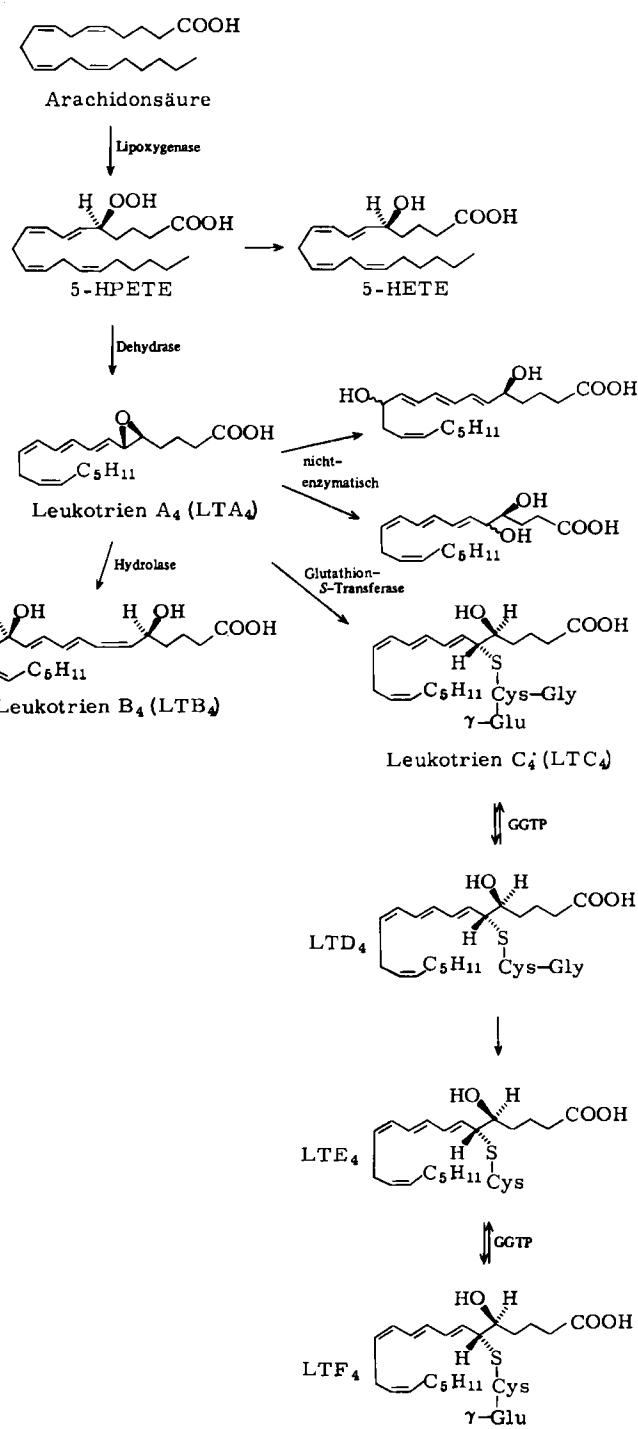


Fig. 8. Bildung der Leukotriene aus Arachidonsäure über den 5-Lipoxygenase-Weg.

Tabelle 1. Identifizierung von Leukotrienen verschiedener Herkunft.

Herkunft	LTA ₄	LTB ₄	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄	Lit.
Leukozyten aus Kaninchenbauchfell	+	+				[57, 59]
Leukozyten aus Menschenblut	+	+	+			[86, 119, 120]
Mastocytomazellen aus Mäusen	+		+			[75, 77, 121]
Basophile Leukämiezellen aus Ratten				+	+	[80, 122, 123]
Zellen aus Rattenbauchfell				+	+	[124-126]
Ratten-Leukozyten	+					[127, 128]
Ratten-Makrophagen	+					[129]
Mäuse-Makrophagen			+			[130]
Menschenlunge			+	+		[131]
Meerschweinchenglunge			+			[132]
Katzenpfote			+	+		[133]

7. Biologische Wirkungen der Leukotriene

Durch Versuche mit gereinigten Leukotrienen erhielt man detaillierte Informationen über die Wirkungen dieser Substanzgruppe in den verschiedenen biologischen Systemen. Die Cystein-haltigen Leukotriene (LTC_4 , LTD_4 und LTE_4) bewirken starke Bronchokonstriktion in vielen Arten und auch im Menschen; sie haben spezifische Wirkungen auf die peripheren Luftwege^[92-99] und sind außerdem stark gefäßverengend; sie haben einen negativen inotropen Effekt auf die Kontraktionen des Herzens^[100].

In neuen Untersuchungen mit Bronchien von atopischen Patienten, die gegen Birkenpollen allergisch reagierten^[101], konnte die Bedeutung von Leukotrienen als Mediatoren bei Anaphylaxie aufgeklärt werden. Die Behandlung der Präparationen mit dem Histamin-Antagonisten Mepyramin und dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin konnte die Antwort auf das spezifische Allergen nicht reduzieren. Benoxaprofen und ein Prostacyclin-Derivat (U-60257), die beide die Leukotrien-Synthese blockieren, inhibierten die anaphylaktischen Kontraktionen der Bronchien von Astmatikern, die auf Birkenpollen allergisch reagierten. Auf eine Inkubation des atopischen Lungengewebes mit dem Antigen folgte die Freisetzung von LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 , die mit dem Prostacyclin-Derivat U-60257 verhindert werden konnte^[101]. Wahrscheinlich sind also die Cystein-haltigen Leukotriene die Hauptmediatoren der Anaphylaxie in den Luftwegen. Auch der Befund, daß Ascaris-induziertes Asthma in Affen durch Inhibition der Leukotrien-Synthese erleichtert wird, zeigt, daß Leukotrien-Antagonisten oder Inhibitoren der Synthese von Leukotrienen von großem therapeutischem Wert bei der Behandlung von Bronchialasthma sein können^[102].

Wurden LTC_4 und LTD_4 einem Meerschweinchen intradermal injiziert, dann verursachten sie Extravasation (Ausbreitung von mit Evans Blau gefärbtem Blut)^[92, 96, 98]. Neuere mikroskopische Untersuchungen der Backe lebender Hamster zeigten, daß diese Leukotriene spezifische Wirkungen auf die Permeabilität der post-capillaren Venulen haben^[103, 104]. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt, daß sowohl LTC_4 als auch LTD_4 einen signifikanten Anstieg der Gefäßpermeabilität schon bei wesentlich geringerer Konzentration als Histamin induzieren. Leukotrien C_4 wirkt etwa 5000mal stärker als Histamin. Die Cystein-haltigen Leukotriene scheinen die Gefäßpermeabilität durch direkte Wirkung auf die Gefäßwände zu erhöhen, da der Effekt sofort eintritt und keine Freisetzung von Histamin oder Prostaglandinen oder die Beteiligung von polymorphen Leukozyten nötig ist. In höheren Konzentrationen verursacht Leukotrien B_4 Austreten von Plasma aus den Gefäßen. Diese Wirkung setzt zögernd ein und benötigt sich anhaftende Leukozyten. Bei submaximaler Gabe von Leukotrienen verstärken Vasodilatoren das Austreten von Plasma; das wurde bei PGE_2 und LTD_4 in Meerschweinchen^[105] und von PGE_2 und LTB_4 in Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten beobachtet^[106, 107].

LTB_4 verursachte in der Hamsterbacke bei ähnlichen Konzentrationen wie LTC_4 eine extreme Zunahme der Leukozyten-Adhäsion an das Endothel von kleinen Venulen^[104]. Daß LTB_4 eine erhöhte Adhäsionstendenz menschlicher Leukozyten bewirkt, wurde auch in vitro an Röhren mit Nylon-Fasern gefunden^[108].

Während der Superfusion mit LTB_4 (6-10 min) erhöhte sich die Zahl der weißen Zellen im Interstitium. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den chemotaktischen Eigenschaften von LTB_4 . Diese wurden in vitro mit der Boyden-Technik beobachtet^[109-112].

In vivo wurde dieser Effekt durch Bestimmung der Akkumulation weißer Zellen in der Bauchhöhle von Meerschweinchen nach intraperitonealer Injektion von LTB_4 nachgewiesen^[113]. Diese Untersuchungen deuteten darauf hin, daß LTB_4 eine Vermittlerrolle bei der Wanderung von Leukozyten aus dem Blut an Entzündungsherde spielt. Neuere Arbeiten zeigten, daß LTB_4 Neutrophile aktiviert: In nanomolaren Konzentrationen führt LTB_4 in Zellen zu schneller Aggregation, Degranulation, Superoxid-Bildung und Mobilisierung von membrangebundenem Calcium^[114-116].

Die entzündungshemmenden Steroide wirken via Inhibition der Freisetzung von Arachidonsäure; Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Aspirin verhindern dagegen die Umwandlung dieser Säure in Prostaglandine und Thromboxane (Fig. 9). Die Steroid-induzierte Inhibition der Ara-

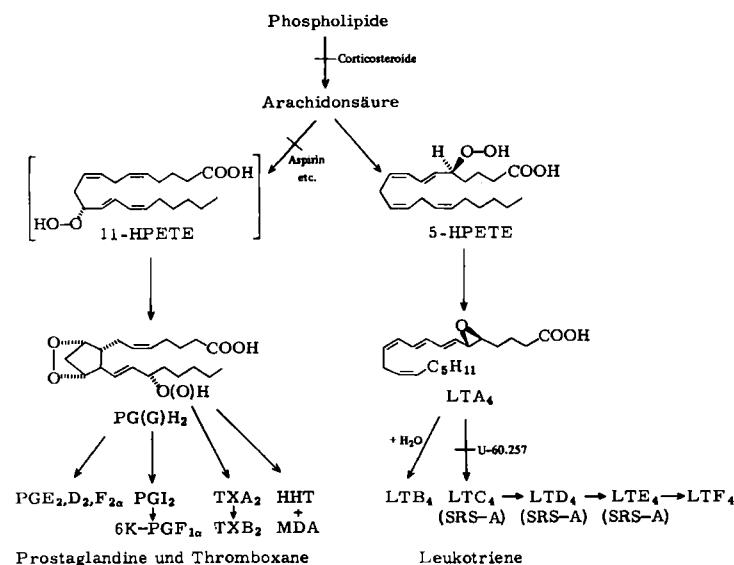


Fig. 9. Bildung von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen aus Phospholipiden.

chidonsäure-Freisetzung beruht auf der Bildung von Peptid-Inhibitoren der Phospholipase A₂; damit wird nicht nur die Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen, sondern auch die von Leukotrienen und anderen oxygierten Derivaten blockiert^[117, 118]. Einige therapeutische Wirkungen der Steroide, die bei Aspirin und ähnlichen Substanzen nicht zu finden sind, könnten auf die Inhibition der Leukotrien-Synthese zurückgeführt werden. Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über den Arachidonsäuremetabolismus und die biologischen Wirkungen der Metaboliten bieten die Möglichkeit, neue und spezifische Therapeutika zu entwickeln.

Ich danke allen meinen Mitarbeitern für die wichtigen Beiträge, die sie für die hier beschriebene Arbeit geleistet haben. Unsere Forschung wurde vom Schwedischen medizinischen

Eingegangen am 31. Mai 1983 [A 471]
Übersetzt von Christiane Koszka, Wien

- [1] S. Bergström, B. Samuelsson, *Annu. Rev. Biochem.* 34 (1965) 101.
- [2] B. Samuelsson, *Angew. Chem.* 77 (1965) 445; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 4 (1965) 410.
- [3] S. Bergström, *Angew. Chem.* 95 (1983) Nr. 11, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) Nr. 11.
- [4] S. Bergström, H. Danielsson, B. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta* 90 (1964) 207.
- [5] D. A. van Dorp, R. K. Beertuis, D. H. Nugteren, H. Vonkeman, *Biochim. Biophys. Acta* 90 (1964) 104.
- [6] D. H. Nugteren, D. A. van Dorp, *Biochim. Biophys. Acta* 98 (1965) 645.
- [7] R. Ryhage, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 (1965) 279.
- [8] B. Samuelsson, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 3011.
- [9] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5329.
- [10] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5344.
- [11] B. Samuelsson, *Progr. Biochem. Pharmacol.* 1967.
- [12] M. Hamberg, *Eur. J. Biochem.* 6 (1958) 135.
- [13] D. H. Nugteren, R. K. Beertuis, D. A. van Dorp in S. Bergström, B. Samuelsson: *Nobel Symposium 2. Prostaglandins*, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967, S. 45.
- [14] B. Samuelsson, E. Granström, M. Hamberg in S. Bergström, B. Samuelsson: *Nobel Symposium 2. Prostaglandins*, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967, S. 50.
- [15] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 2349.
- [16] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5344.
- [17] D. H. Nugteren, R. K. Beertuis, D. A. van Dorp, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 85 (1966) 405.
- [18] E. Granström, W. E. M. Lands, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4104.
- [19] M. Hamberg, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 899.
- [20] M. Hamberg, J. Svensson, T. Wakabayashi, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 345.
- [21] D. H. Nugteren, E. Hazelhof, *Biochim. Biophys. Acta* 326 (1973) 448.
- [22] M. Hamberg, P. Hedqvist, K. Strandberg, J. Svensson, B. Samuelsson, *Life Sci.* 16 (1975) 451.
- [23] T. Tuvemo, K. Strandberg, M. Hamberg, B. Samuelsson, *Acta Physiol. Scand.* 96 (1976) 145.
- [24] B. Samuelsson, M. Hamberg in H. J. Robinson, J. R. Vane: *Prostaglandin Synthetase Inhibitors*, Raven Press, New York 1974, S. 107.
- [25] B. B. Vargaftig, P. Zirinis, *Nature London New Biol.* 244 (1973) 114.
- [26] M. J. Silver, J. B. Smith, C. Ingberman, J. J. Kocsis, *Prostaglandins* 4 (1973) 863.
- [27] A. L. Willis, *Science* 183 (1974) 325.
- [28] A. L. Willis, *Prostaglandins* 5 (1974) 1.
- [29] A. L. Willis, F. M. Vane, D. C. Kuhn, C. G. Scott, M. Petrin, *Prostaglandins* 8 (1974) 453.
- [30] P. J. Piper, J. R. Vane, *Nature London* 223 (1969) 29.
- [31] R. J. Gryglewski, J. R. Vane, *Br. J. Pharmacol.* 45 (1972) 37.
- [32] J. Svensson, M. Hamberg, B. Samuelsson, *Acta Physiol. Scand.* 94 (1975) 222.
- [33] M. Hamberg, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3400.
- [34] D. H. Nugteren, *Biochim. Biophys. Acta* 380 (1975) 299.
- [35] B. Samuelsson in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 1, Raven Press, New York 1976, S. 1.
- [36] M. Hamberg, J. Svensson, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2994.
- [37] N. A. Nelson, R. W. Jackson, *Tetrahedron Lett.* 1976, 3275.
- [38] R. C. Kelly, I. Schettler, S. J. Stein, *Tetrahedron Lett.* 1976, 3279.
- [39] W. P. Schneider, R. A. Morge, *Tetrahedron Lett.* 1976, 3283.
- [40] E. J. Corey, M. Schibasaki, J. Knolle, *Tetrahedron Lett.* 1977, 1625.
- [41] S. Moncada, J. R. Vane, *Pharmacol. Rev.* 30 (1979) 293.
- [42] E. F. Ellis, O. Oelz, L. J. Roberts II, N. A. Payne, B. J. Sweetman, A. S. Nies, J. A. Oates, *Science* 193 (1976) 1135.
- [43] P. Needleman, O. S. Kulkarni, A. Raz, *Science* 195 (1977) 4090.
- [44] J. Svensson, M. Hamberg, *Prostaglandins* 12 (1976) 943.
- [45] Z. Terashita, H. Fukkui, K. Nishikawa, M. Hirat, S. Kikuchi, *Eur. J. Pharmacol.* 53 (1978) 49.
- [46] H. H. Wang, P. S. Kulkarni, K. E. Eakins, *Eur. J. Pharmacol.* 66 (1980) 31.
- [47] S. Bunting, S. Moncada, J. R. Vane, *Br. J. Pharmacol.* 57 (1976) 462.
- [48] S. Moncada, S. H. Ferreira, J. R. Vane in J. C. Frölich: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 5, Raven Press, New York 1978, S. 211.
- [49] T. Tuvemo, K. Strandberg, H. Hamberg, B. Samuelsson in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 1, Raven Press, New York 1976, S. 425.
- [50] R. J. Gryglewski, A. Dembinska-Kiec, R. Korbut, *Acta Biol. Med. Ger.* 37 (1978) 715.
- [51] J. Svensson, K. Strandberg, T. Tuvemo, M. Hamberg, *Prostaglandins* 14 (1977) 425.
- [52] S. Moncada, R. J. Gryglewski, S. Bunting, J. R. Vane, *Nature London* 263 (1976) 663.
- [53] R. A. Johnson, D. R. Morton, J. H. Kinner, R. R. Gorman, J. C. McGuire, F. F. Sun, N. Whittaker, S. Bunting, J. Salmon, S. Moncada, J. R. Vane, *Prostaglandins* 12 (1976) 915.
- [54] E. Granström, U. Diczfalusy, M. Hamberg, G. Hansson, C. Malmsten, B. Samuelsson in J. A. Oates: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 10, Raven Press, New York 1982, S. 15.
- [55] J. R. Vane in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 2, Raven Press, New York 1976, S. 791.
- [56] P. Borgeat, M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 7816.
- [57] P. Borgeat, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 2643.
- [58] P. Borgeat, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 7865.
- [59] P. Borgeat, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3213.
- [60] O. Rådmark, C. Malmsten, B. Samuelsson, D. A. Clark, G. Giichi, A. Marfat, E. J. Corey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9 (1980) 954.
- [61] E. J. Corey, A. Marfat, G. Goto, F. Brion, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1981) 7984.
- [62] O. Rådmark, C. Malmsten, B. Samuelsson, G. Goto, A. Marfat, E. J. Corey, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11828.
- [63] A. Panossian, M. Hamberg, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* 150 (1982) 511.
- [64] O. Rådmark, T. Shimizu, unveröffentlicht.
- [65] W. Feldberg, C. H. Kellaway, *J. Physiol. London* 94 (1938) 187.
- [66] C. H. Kellaway, E. R. Trethewie, *Q. J. Exp. Physiol.* 30 (1940) 121.
- [67] K. F. Austen, *J. Immunol.* 121 (1978) 793.
- [68] W. E. Brocklehurst, *J. Physiol. London* 120 (1953) 16 P.
- [69] H. R. Morris, G. W. Taylor, P. J. Piper, O. Sirois, J. R. Tippins, *FEBS Lett.* 87 (1978) 203.
- [70] R. P. Orange, R. C. Murphy, M. L. Karnovsky, K. F. Austen, *J. Immunol.* 110 (1973) 760.
- [71] K. Strandberg, B. Uvnäs, *Acta Physiol. Scand.* 82 (1971) 359.
- [72] M. K. Bach, J. R. Brashler, R. R. Gorman, *Prostaglandins* 14 (1977) 21.
- [73] B. A. Jakschik, S. Falkenheim, C. W. Parker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4577.
- [74] M. C. Conroy, R. P. Orange, L. M. Lichtenstein, *J. Immunol.* 116 (1976) 1677.
- [75] R. C. Murphy, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4275.
- [76] B. Samuelsson, P. Borgeat, S. Hammarström, R. C. Murphy, *Prostaglandins* 17 (1979) 785.
- [77] B. Samuelsson, P. Borgeat, S. Hammarström, R. C. Murphy in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 6, Raven Press, New York 1980, S. 1.
- [78] S. Hammarström, R. C. Murphy, B. Samuelsson, D. A. Clark, C. Mioskowski, E. J. Corey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91 (1980) 1266.
- [79] S. Hammarström, B. Samuelsson, D. A. Clark, G. Goto, A. Marfat, C. Mioskowski, E. J. Corey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 (1980) 946.
- [80] L. Örning, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2014.
- [81] O. Rådmark, C. Malmsten, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* 110 (1981) 213.
- [82] B. Samuelsson, S. Hammarström, *Prostaglandins* 19 (1980) 645.
- [83] K. Bernström, S. Hammarström, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9579.
- [84] M. E. Anderson, R. D. Allison, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1088.
- [85] N. Uehara, K. Ormstad, S. Orrenois, L. Örning, S. Hammarström in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 11, Raven Press, New York 1983, im Druck.
- [86] P. Borgeat, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2148.
- [87] W. Jubiz, O. Rådmark, J. Å. Lindgren, C. Malmsten, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 (1981) 976.
- [88] J. Å. Lindgren, B. Samuelsson, unveröffentlicht.
- [89] U. Lundberg, O. Rådmark, C. Malmsten, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* 126 (1981) 127.
- [90] O. Rådmark, U. Lundberg, W. Jubiz, C. Malmsten, B. Samuelsson in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 9, Raven Press, New York 1982, S. 61.
- [91] R. L. Maas, A. R. Brash, J. A. Oates in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 9, Raven Press, New York 1982, S. 29.
- [92] S.-E. Dahlén, P. Hedqvist, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Nature London* 288 (1980) 484.

- [93] P. Hedqvist, S.-E. Dahlén, L. Gustafsson, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Acta Physiol. Scand.* **110** (1980) 331.
- [94] R. A. Lewis, F. K. Austen, J. M. Drazen, M. A. Soter, J. C. Figueiredo, E. J. Corey in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 9, Raven Press, New York 1982, S. 137.
- [95] R. A. Lewis, C. W. Lee, L. Levine, R. A. Morgan, J. W. Weiss, J. M. Drazen, H. Oh, D. Hoover, E. J. Corey, K. F. Austen in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 11, Raven Press, New York 1983, im Druck.
- [96] P. J. Piper, J. R. Tippins in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 9, Raven Press, New York 1982, S. 183.
- [97] G. Smedegård, P. Hedqvist, S.-E. Dahlén, B. Revenås, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Nature London* **295** (1982) 327.
- [98] J. M. Drazen, F. K. Austen, R. A. Lewis, D. A. Clark, G. Goto, A. Marfat, E. J. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 4345.
- [99] J. W. Weiss, J. M. Drazen, N. Coles, E. R. McFadden, P. W. Weller, E. J. Corey, R. A. Lewis, K. F. Austen, *Science* **216** (1982) 196.
- [100] R. Levi, J. A. Burke, E. J. Corey in B. Samuelsson, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 9, Raven Press, New York 1982, S. 215.
- [101] G. Hansson, T. Björck, S.-E. Dahlén, P. Hedqvist, E. Granström, B. Dahlén in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 11, Raven Press, New York 1983, im Druck.
- [102] M. K. Bach, J. R. Brashler, F. A. Fitzpatrick, R. L. Griffin, S. S. Iden, H. G. Johnson, M. L. McNee, J. C. McGuire, H. W. Smith, R. J. Smith, F. F. Sun, M. A. Wasserman in B. Samuelsson, P. Ramwell, R. Paoletti: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Vol. 11, Raven Press, New York 1983, im Druck.
- [103] W. Dawson, J. R. Boot, J. Harvey, J. R. Walker, *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* **5** (1982) 61.
- [104] S.-E. Dahlén, P. Hedqvist, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Nature London* **288** (1980) 484.
- [105] M. J. Peck, P. J. Piper, T. J. Williams, *Prostaglandins* **20** (1980) 863.
- [106] M. A. Bray, F. M. Cunningham, A. W. Ford-Hutchinson, M. J. H. Smith, *Br. J. Pharmacol.* **72** (1981) 483.
- [107] C. V. Wedmore, T. J. Williams, *Nature London* **289** (1981) 658.
- [108] J. Palmblad, C. L. Malmsten, A.-M. Udén, O. Rådmark, L. Engstedt, B. Samuelsson, *Blood* **58** (1981) 658.
- [109] A. W. Ford-Hutchinson, M. A. Bray, M. V. Doig, M. E. Shipley, M. J. H. Smith, *Nature London* **286** (1980) 264.
- [110] C. L. Malmsten, J. Palmblad, A.-M. Udén, O. Rådmark, L. Engstedt, B. Samuelsson, *Acta Physiol. Scand.* **110** (1980) 449.
- [111] R. M. J. Palmer, R. J. Stephney, G. A. Higgs, K. E. Eakins, *Prostaglandins* **20** (1980) 411.
- [112] E. J. Goetzl, W. C. Pickett, *J. Immunol.* **125** (1980) 1789.
- [113] M. J. H. Smith, A. W. Ford-Hutchinson, M. A. Bray, *J. Pharm. Pharmacol.* **32** (1980) 517.
- [114] C. N. Serhan, J. Fridovich, E. J. Goetzl, P. B. Dunham, G. Weissmann, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 4746.
- [115] S. J. Feinmark, J. Å. Lindgren, H.-E. Claesson, C. Malmsten, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* **136** (1981) 141.
- [116] C. N. Serhan, A. Radin, J. E. Smolen, H. Korchak, B. Samuelsson, G. Weissmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107** (1982) 1006.
- [117] G. J. Blackwell, R. Carnuccion, M. Di Rosa, R. J. Flower, L. Parente, P. Persico, *Nature London* **287** (1980) 147.
- [118] F. Hirata, E. Shiffmann, K. Venkatasubramanian, D. Salomon, J. Axelrod, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 2533.
- [119] O. Rådmark, C. L. Malmsten, B. Samuelsson, G. Goto, A. Marfat, E. J. Corey, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 11828.
- [120] G. Hansson, O. Rådmark, *FEBS Lett.* **122** (1980) 87.
- [121] S. Hammarström, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* **122** (1980) 83.
- [122] H. R. Morris, G. W. Taylor, P. J. Piper, M. N. Samhoun, J. R. Tippins, *Prostaglandins* **19** (1980) 185.
- [123] C. W. Parker, S. F. Falkenheim, M. M. Huber, *Prostaglandins* **20** (1980) 863.
- [124] M. K. Bach, J. R. Brashler, S. Hammarström, B. Samuelsson, *J. Immunol.* **125** (1980) 115.
- [125] M. K. Bach, J. R. Brashler, S. Hammarström, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93** (1980) 1121.
- [126] R. A. Lewis, J. M. Drazen, K. F. Austen, D. A. Clark, E. J. Corey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96** (1980) 271.
- [127] A. W. Ford-Hutchinson, M. A. Bray, F. M. Cunningham, E. M. Davidson, M. J. H. Smith, *Prostaglandins* **21** (1981) 143.
- [128] M. I. Siegel, R. T. McConnell, R. W. Bonser, P. Cuatrecasas, *Prostaglandins* **21** (1981) 123.
- [129] M. V. Doig, A. W. Ford-Hutchinson, *Prostaglandins* **20** (1980) 1007.
- [130] C. A. Rouzer, W. H. Scott, Z. A. Cohn, P. Blackburn, J. M. Manning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 4928.
- [131] R. A. Lewis, K. F. Austen, J. M. Drazen, D. A. Clark, A. Marfat, E. J. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 3710.
- [132] H. R. Morris, G. W. Taylor, P. J. Piper, J. R. Tippins, *Nature London* **285** (1980) 104.
- [133] J. Hoglum, J.-K. Pai, V. Atrache, K.-E. Sok, C. J. Sih, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 5688.