

**Cantharidin und Palasonin;
neue Erkenntnisse zu zwei alten Wirkstoffen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctorum rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker

Oliver Fietz

geboren am 07. Dezember 1970 in Porz am Rhein

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Beckert
2. Prof. Dr. W. Boland

Tag der öffentlichen Verteidigung:

für Silke
und
meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Palasonin	1
1.2	Cantharidin	4
	Toxizität	5
	Inhibierung der Proteinphosphatasen	7
	Oxidativer Burst und induzierte pflanzliche Abwehr	10
	Ökologie des Cantharidins	11
	Freies und gesamtes Cantharidin und Palasonin	16
	Biosynthese des Cantharidins	17
2	AUFGABENSTELLUNG	19
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
3.1	Hydrophile Präkursoren von Cantharidin und Palasonin	21
3.2	Enantiomerentrennung von Palasonin	41
	Bestimmung der absoluten Konfiguration von Palasonin	42
	Enantiomerenverhältnisse von Palasonin in Käfern	53
3.3	Biosynthesestudien von Cantharidin mit Larven von <i>Oedemera femorata</i> und <i>Oedemera flavipes</i>	59
3.4	Cantharidin als Elicitor der Duftstoffbioynthese von <i>Phaseolus lunatus</i>	73
	Photoakustikspektroskopie	83
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	89

5	EXPERIMENTELLER TEIL	94
5.1	Geräte und Chemikalien	94
	Geräte	94
	Chemikalien	94
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	95
	Nachweis von Cantharidin und Palasonin	95
	Veresterung von wässrigen Proben mit Diazomethan	95
5.3	Insekten	97
	Sammeln und Haltung der <i>Oedemera</i> -Käfer	97
	Aufzucht und Fütterungsexperimente mit <i>Oedemera</i> -Larven	97
	Herstellen und Analytik der <i>Oedemera</i> -Extrakte	98
	Bestimmung des Markierungsgrads	99
5.4	Pflanzen	102
	Anzucht von <i>Phaseolus lunatus</i>	102
	Elicitierungsexperimente	102
	Herstellen der Testlösungen	102
	Sammeln und Analytik der Duftstoffe	102
	Kinetik der Duftstoffbiosynthese	103
	Inhibierungsexperimente der Duftstoffbiosynthese	103
5.5	Extraktionen und Aufreinigungen	104
	Dicarbonsäure von Palasonin aus den Samen von <i>Butea frondosa</i>	104
	Anionenaustauschchromatographie	105
	Hydrophile-Interaktions-Chromatographie	105
	Dicarbonsäure von Cantharidin aus <i>Oedemera flavipes</i>	106
	Größenausschlußchromatographie	106
	(-)-Palasonin aus den Samen von <i>Butea frondosa</i>	107

5.6	Synthesen	108
	Palasonin, racemisch	108
	Hydrolyse des racemischen Palasonins	109
	(<i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylamin	109
	(<i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimid von (-)-Palasonin	111
	2-Bromanilid von (-)-Palasonin	113
5.7	Struktur- und Frequenzberechnung	114
6	LITERATURVERZEICHNIS	115
7	ANHANG	127
7.1	Abkürzungen	127
7.2	Spektren	129
	¹ H-NMR-Spektren	129
	¹³ C-NMR-Spektren	130
	2D-NMR-Spektren	132
	Massenspektren	134
	IR-Spektren	135
7.3	Markierungsgrad von Cantharidin nach Verfütterung von MVA-d₅ an <i>Oedemera</i>-Larven	138
7.4	Lebenslauf	141
7.5	Veröffentlichungen und Vorträge	141
7.6	Danksagung	143

1 Einleitung

Cantharidin **1** und Palasonin **2** sind zwei strukturell eng verwandte Naturstoffe, deren Vorkommen im Tier- und Pflanzenreich bisher nur getrennt beschrieben war. So ist das Cantharidin **1** aus verschiedenen Insekten bekannt, bei denen diesem Stoff eine große ökologische Bedeutung zugeordnet werden konnte. Als Naturstoff ist Palasonin **2** bisher nur aus Teilen eines Baumes, nämlich *Butea frondosa*, bekannt.

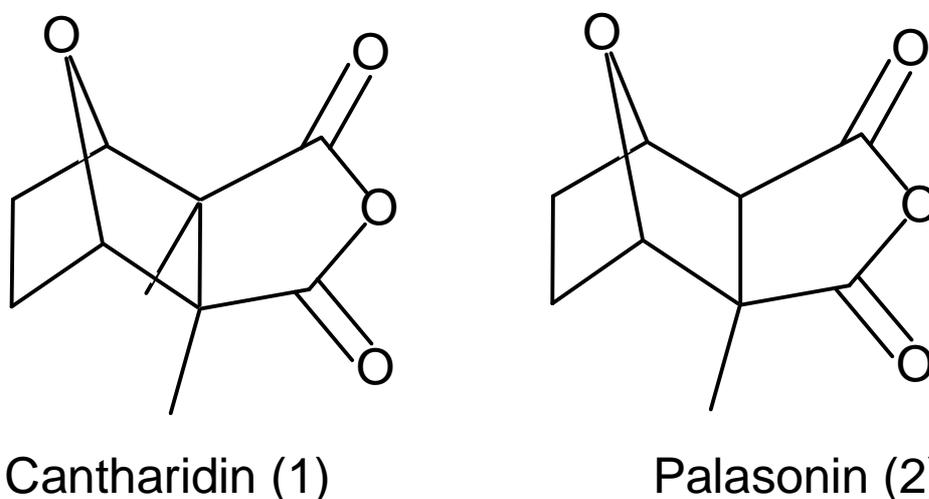


Abbildung 1-1 strukturelle Ähnlichkeit der Naturstoffe Cantharidin **1** und Palasonin **2**

1.1 Palasonin

Butea frondosa ist ein Laubbaum aus der Familie der Fabaceae. Er ist heimisch in den Subhimalayaregionen von Indien, Ceylon und Indochina und kann bis zu 15 m hoch wachsen [1]. Aufgrund seiner auffälligen orangeroten Blüten wird er auch ‚flame of the forest‘ genannt. Da der Baum nicht nur pharmakologisch interessante Inhaltsstoffe besitzt, sondern auch als Wirtspflanze für das gummiproduzierende Insekt *Kerria lacca* kultiviert wird [2], gibt es in den verschiedenen Regionen Süd-Ost-Asiens viele weitere Bezeichnungen, z.B. ‚Dhak‘ in Indien und ‚Palas‘ in Nepal. Synonym wird auch der Name *Butea monosperma* verwendet. Den Samen von *Butea frondosa* wird bereits in der Ayurvedischen Literatur eine pharmakologische Aktivität zugeschrieben. KALEYSA RAJ und KURUP fanden 1967 Palasonin **2** als das anthelmintische Prinzip

in den Samen von *B. frondosa* [3,4]. Anthelmintika sind Mittel gegen Würmer im Magen-Darm-Trakt [5]. Sie isolierten die aktive Substanz; die Aufklärung der Struktur als 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-Derivats gelang jedoch erst 1968 durch BOCHIS und FISCHER [6]. Gleichzeitig untersuchten RAJ und KURUP die Wirkungsweise der Verbindung als Anthelmintikum [7-9]. Der wahrscheinliche Wirkmechanismus beruht auf einem massiven Eingriff in den Energiehaushalt und / oder einer Einschränkung der Beweglichkeit der Parasiten [10].

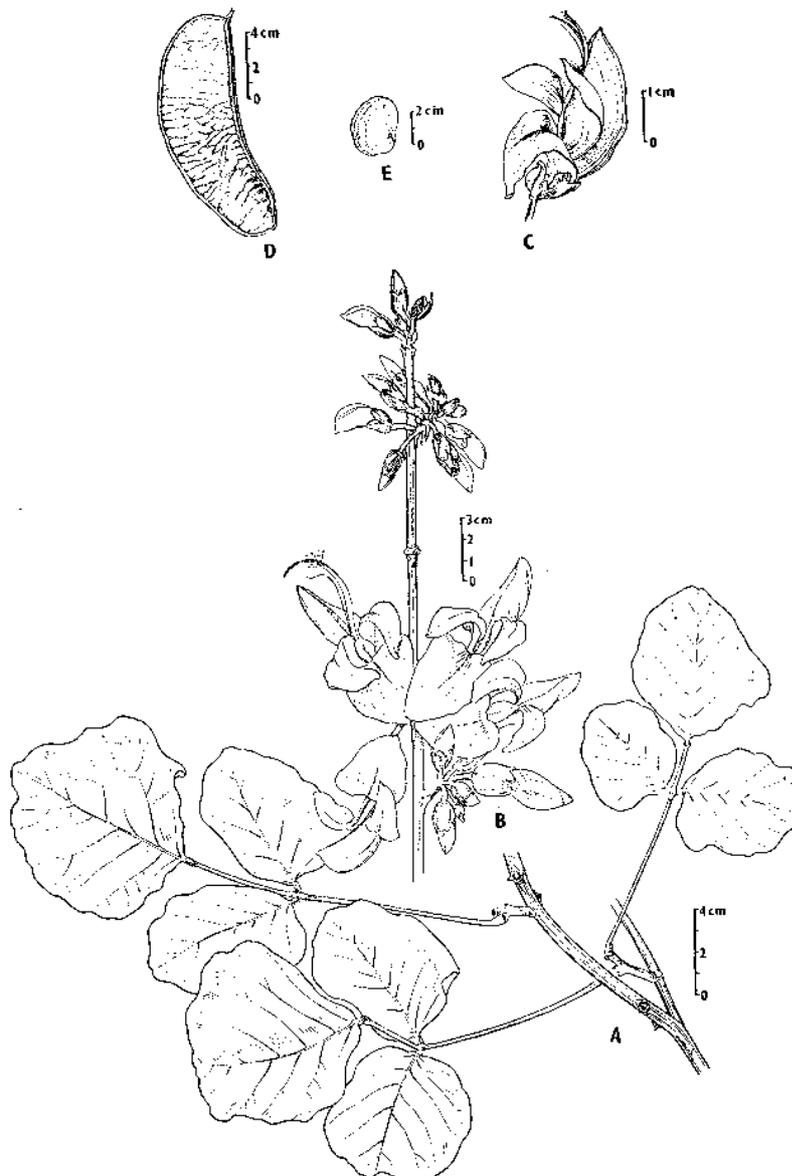


Abbildung 1-2 A: vegetativer Zweig, B: blühender Zweig, C: einzelne Blüte, D: Hülse, E: Samen von *Butea frondosa*; aus [1]

In den Blättern von ausgewachsenen Freilandpflanzen und in jungen Pflänzchen ist praktisch kein Palasonin enthalten; hingegen findet man einen hohen Palasonin-Gehalt auch in den Blüten (245-550%) und in reifenden Früchten (45-180% bezogen auf einen Samen) [11]. In den Samen fanden SCHMID et.al. 3,8 g/kg Palasonin **2**. Darüber hinaus findet man immer wieder neue Untersuchungen über die anticonvulsive, antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung von Butea-Extrakten [12-14]. Weitere Inhaltsstoffe wurden bis heute aus verschiedenen Teilen des Baumes isoliert [15-18]. Von besonderem Interesse sind Lignine aus den Samen [19-22], sowie die farbigen Substanzen Butin **3** und Butein **4** aus den Blüten [23-25].

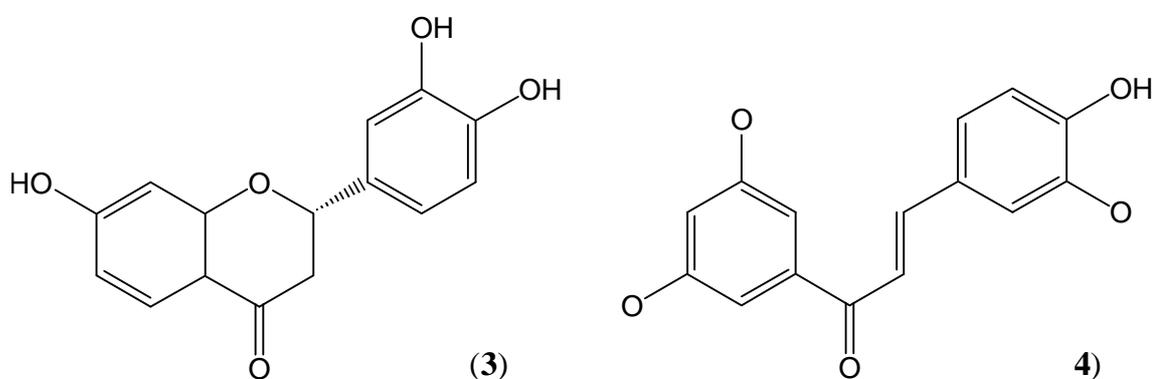


Abbildung 1-3 Butin **3** und Butein **4**, zwei Farbstoffe, die aus den Blüten von *Butea frondosa* isoliert werden konnten

Über die Biosynthese von Palasonin ist noch nichts bekannt. Die vielen Ähnlichkeiten lassen jedoch vermuten, daß Palasonin nach einem vergleichbaren Mechanismus wie Cantharidin **1** als Sesquiterpen-Derivat über Farnesol dargestellt wird. Besonders interessant ist die fehlende Methylgruppe, wodurch Palasonin **2**, im Gegensatz zu Cantharidin **1**, ein chirales Molekül ist. Diese Asymmetrie kann, unter der Annahme eines vergleichbaren Biosyntheseweges, nähere Einsicht in den Mechanismus liefern.

Die Toxizität wird im nächsten Abschnitt im Vergleich zu Cantharidin und anderen homologen Verbindungen beschrieben.

1.2 Cantharidin

Cantharidin ist aufgrund seiner vielfältigen biologischen Aktivitäten schon sehr lange bekannt und die am besten untersuchte Substanz aus der Klasse der 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptane.

Bereits seit über 2000 Jahren werden cantharidinhaltige Käferextrakte mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen hergestellt. Aus dieser Zeit stammt auch der Name Cantharidin, der Käferstoff, abgeleitet aus dem Griechischen cantharis (= Käfer). Eine erste Übersicht über die Kenntnisse zu diesem Naturstoff lieferte HOMOLKA bereits 1886 [26]. Als blasenziehendes Mittel (Vesikantien) wird Cantharidin in der Naturheilkunde als Ausleitverfahren neben dem Aderlaß, Baunscheidtieren, Blutegeln und dem Schröpfen angewandt. In dem Verständnis der Naturheilmediziner sollen mit dem Ausleiten von Gift- und Schlackenstoffen alte und chronische Prozesse gelöst werden, oder das Immunsystem und der Körper zur Abwehr eines anderen Leiden angeregt werden. Diese Behandlungsmethode geht auf PARACELTUS zurück, der es so formulierte: „wo die Natur einen Schmerz erzeugt, dort will sie schädliche Stoffe anhäufen und ausleeren. Wo sie dies nicht selbst fertigbringt, dort mache ein Loch in die Haut und lasse diese heraus.“ Cantharidenpflaster werden unter anderem bei Wirbelsäulenleiden, Tumorschmerzen und Gelenkleiden eingesetzt und bewirken nach wenigen Stunden eine starke Hautreizung (Brennen) und das Bilden einer leukozytenhaltigen Blase, weshalb diese Methode auch als weißer Aderlaß bezeichnet wird. Dieser löst verschiedene Effekte im Grundgewebe aus [27-30]. Seine größte Bekanntheit erlangte der Naturstoff als angebliches Aphrodisiakum unter dem Namen „Spanische Fliege“, das trotz seiner Toxizität immer noch frei erhältlich ist. Eine potenzsteigernde Wirkung konnte wissenschaftlich nicht nachgewiesen werden, vielmehr kommt es über den Harnweg zu einer Reizung des Schwellkörpers, was zu einer Erektion des Penis führt [31]. Aufgrund seiner cytotoxischen Wirkung kann der Verbindung auch eine Wirkung als Anti-Tumor-Mittel zugeschrieben werden [32]. Die therapeutische Breite ist jedoch sehr gering, daher kann Cantharidin in dieser Form nicht klinisch angewendet werden. Um die allgemeine Toxizität bei unverminderter Wirkung herabzusetzen, nutzt man die Struktur als Leitstruktur zur Darstellung neuer Derivate [33-35].

Toxizität

Für Nutztiere stellen die natürlichen Cantharidinquellen (Insekten) eine Gefahr dar. Vor allem Pferde in den USA sind durch Heu gefährdet, in dem Käfer der Gattung *Epicauta* (Meloidae) mitgetrocknet wurden [36]. Eingehendere Untersuchungen zeigten, daß der größte Anteil von Cantharidin nicht von lebenden oder toten Käfern abgegeben wird, sondern diese erst durch das Überfahren mit Traktoren aufgeschlossen werden und das Heu auf diese Weise kontaminiert wird [37,38]. In der Literatur finden sich auch Schadensberichte von Menschen, die eine Cantharidinvergiftung erlitten. In einem Fall verwechselte ein vier Jahre altes Mädchen in Zimbabwe wahrscheinlich einen Ölkäfer der Art *Mylabris dicinta* mit einem eßbaren Käfer (*Eulepida mashona*) [39]. In einem anderen Fall wird von vier jungen Erwachsenen in den USA berichtet, die einen mit ‚Spanischer Fliege‘ versetzten Soft-Drink, wahrscheinlich zur sexuellen Stimulierung, zu sich nahmen [40]. Erste Anzeichen einer Cantharidinvergiftung sind bei allen Patienten starke Leibschmerzen, eine Dunkelfärbung des Urins und Dysurie (Erschwerung des Harnlassens) [5]. Darüberhinaus kann das Gift verschiedene Symptome durch einen gastrointestinalen, dermatologischen, genitourinären, kardiologischen, pulmonaren, hematologischen oder neurologischen Effekt bewirken [40]. Bereits 5 mg oral eingenommenes Cantharidin **2** führen zu einer Vergiftung, und Mengen zwischen 10 und 50 mg sind tödlich. Der LD₅₀-Wert wurde auf 1,0 (±0,2) mg/kg bestimmt (nach 72 h bei intraperitonealer Injektion an männlichen Albino Swiss-Webster Mäusen) [41]. Die geringere Toxizität des Palasonins zeigt sich in den LD₅₀-Werten, die auf 7,5 mg/kg subcutan bei Mäusen, bzw. 50 mg/kg oral bei Ratten, bestimmt wurden [9]. Zu dem gleichen Ergebnis kommt eine weitere Studie, die mehrere Strukturanaloga unter vergleichenden Bedingungen getestet hat [42]. Zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung existieren viele weitere Arbeiten [43-46]. Die Quintessenz aus deren Ergebnissen ist, daß es für die Toxizität des 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-Systems nicht viele Freiheitsgerde gibt. Essentiell für die Wirkung ist die Anwesenheit mindestens einer Carbonylgruppe (als Anhydrid, Lacton oder Dicarboxylat) in *exo*-Stellung und des Sauerstoffs in der Brückenposition. Das Einbringen von weiteren Alkylresten oder anderen funktionellen Gruppen am Sechsring, oder der Veränderung der Etherbrücke, sowie Modifikationen an der *exo*-Anhydrid-Struktur führen fast immer zu einem Verlust der Wirksamkeit.

Als wirksame Grundstruktur kristallisiert sich die des Endothals **5** heraus, welches die Desmethyldicarbonsäure-Variante des Cantharidins darstellt, und auch als Norcantharidin bezeichnet wird.

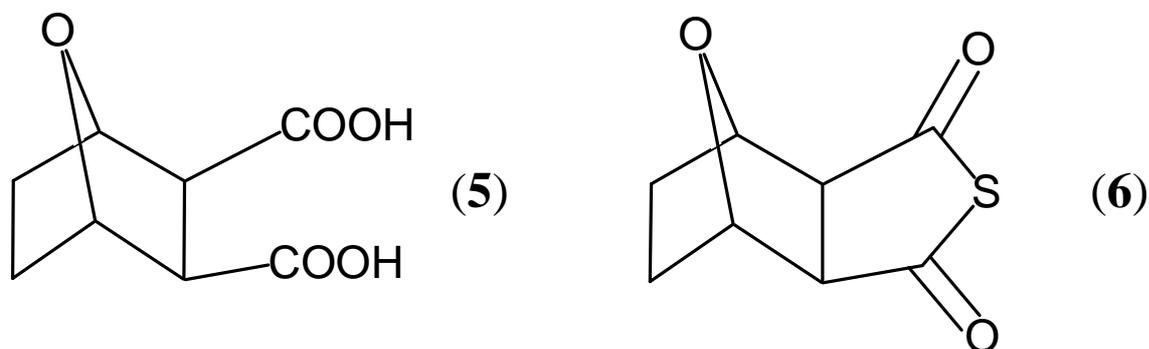


Abbildung 1-4 Das Herbizid Endothal **5** stellt die wirksame Grundstruktur dar, und Endothalthioanhydrid **6** ist die am stärksten toxische Verbindung aus der Klasse der 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptane

Endothal **5** ist ein Herbizid und wird kommerziell unter dem Namen Aquathol[®]K oder Hydrothol 191[®] vertrieben [47,48]. Die herbizide Wirkung wurde an Keimlingen von Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.), an wildem Senf (*Brassica caber*) und an Hühnerhirse (*Echinochloa crusgalli*) getestet [41]. Das einzige Analogon, das im Test mit Mäusen eine höhere Toxizität als Cantharidin zeigt, ist das Endothalthioanhydrid **6**. Dies hat bei intraperitonealer Verabreichung einen LD₅₀-Wert von 0,31 mg/kg [42].

Das toxische Prinzip der 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptane ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich ist jedoch die hohe Komplexbildungstendenz der drei Sauerstofffunktionalitäten dafür verantwortlich [41].

Die Stabilitätskonstanten der Koordinationsverbindungen von Verbindungen des Endothal-Typs mit Metallkationen ist deutlich höher als die von Dicarbonsäuren, wie Bernstein- oder Phtalsäure, und ihre Stabilitätsreihen folgen der Irving-Williams-Serie [49]. Ein Beispiel ist der oktaedrische Komplex **7** von Cobalt mit 5,6-Dichlor-Endothal.

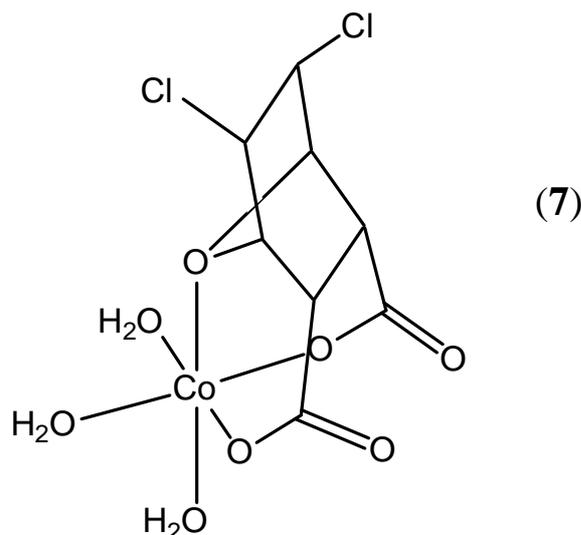


Abbildung 1-5 Darstellung des Komplexbindungsverhaltens der 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptane über drei Sauerstoffatome am Beispiel von 5,6-Dichlor-Endothal an Cobalt

Alle diese Komplexe sind unter natürlichen Bedingungen stabil und die Kristallstrukturen zeigen eine Koordination von zwei Carboxylatsauerstoffatomen zusammen mit der Etherbrücke und dem Metallkation [49-52].

Die Frage, welches die aktive Form ist, ob Dicarbonsäure oder Anhydrid, ist noch nicht geklärt und bis heute Gegenstand der Diskussion [53].

Inhibierung der Proteinphosphatasen

Die molekulare Ursache für die Toxizität ist die Inhibierung von Serin / Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen PP1 und PP2A [54 ,55]. Proteinphosphatasen sind die Gegenspieler der Proteinkinasen, und sie können auf zwei verschiedene Arten eine regulative Funktion ausüben. Zum Einen können sie dämpfend auf eine Proteinkinase-vermittelte Signalübertragung einwirken, indem sie ein durch Proteinphosphorylierung erzeugtes Signal abschwächen und terminieren. Sie können aber auch eine verstärkende

Wirkung in Signalwegen haben. Die Dephosphorylierung eines Signalproteins führt zu dessen Aktivierung und damit zur Verstärkung des Signals [56]

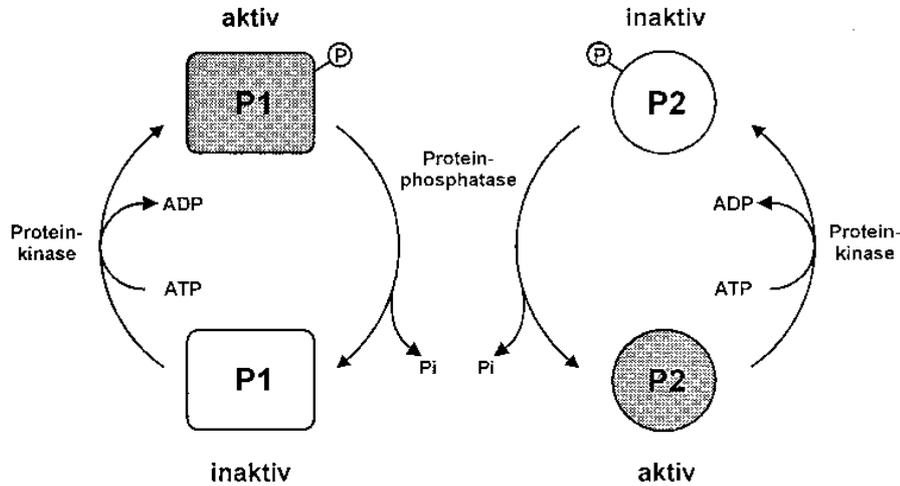


Abbildung 1-6 Die duale Funktion der Proteinkinasen und Proteinphosphatasen [56]

Proteinphosphatasen kommen in allen eukaryontischen Zellen vor, und beeinflussen die Aktivität vieler anderer Enzyme. Somit wirken sie auf viele zentrale Prozesse in der Zelle, wie die Glykogensynthese, die Zellteilung, die Genexpression, die Neurotransmission, die Muskelkontraktion und weitere Vorgänge, die durch second messenger gesteuert werden, regulierend ein [57]. Es sind prinzipiell vier Gruppen von Serin- / Threonin-spezifischen Phosphatasen bekannt, PP1, PP2A, PP2B, und PP2C, die als Heterodimere zumeist aus einer katalytischen Untereinheit und einer Lokalisationsuntereinheit bestehen. Die Proteinphosphatasen sind konservative Enzyme und die katalytischen Untereinheiten von PP1, 2A und 2B sind weitestgehend homolog [56]. Von der PP1 ist die 37,5 kDa schwere katalytische Untereinheit als Aminosäuresequenz und als dreidimensionale Struktur bekannt [58 ,59]. Aus diesen Daten weiß man, daß mindestens zwei Metallionen, wahrscheinlich Manganionen, im aktiven Zentrum lokalisiert sind. Diese können, wie zuvor angedeutet, durch die starke Komplexbildungstendenz der verschiedenen Endothalderivate maskiert werden. Wichtig für einen starken Inhibitor ist, daß er sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen Teil enthält, so daß er eine phosphorylierte Aminosäure nachahmt [60]. Es sind bis heute neben sechs endogenen Proteinen, die die Aktivitäten der PP1 und PP2A regulieren, verschiedene Gruppen von Naturstoffen bekannt, die als Inhibitoren auf

Proteinphosphatasen wirken können [57]. Diese werden als Okadasäure-Klasse von Inhibitoren zusammengefasst, da die Okadasäure **8** als erster Naturstoff mit Inhibitor-Aktivität entdeckt wurde.

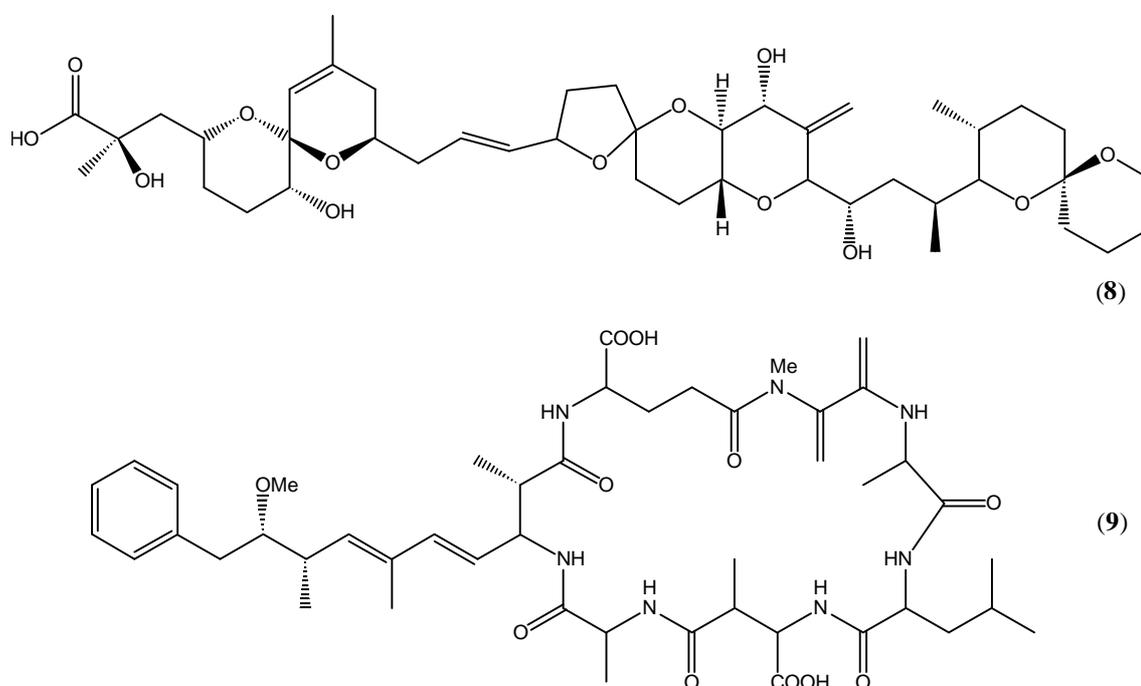


Abbildung 1-7 Die Okadasäure **8** und das Microcystin **9** sind zwei Beispiele von Naturstoffen, die Ser/Thr-spezifische Phosphatasen inhibieren können

Diese Klasse unterteilt man mittlerweile weiter in terpenoide Inhibitoren, zu denen auch das Cantharidin **1** und das Palasonin **2** zählen und die im Vergleich zu den anderen Inhibitoren relativ kleine Moleküle sind. Die Okadasäure **8**, die aus Dinoflagellaten bekannt ist, wird mit dem Tautomycin aus Streptomyces-Arten und weiteren Verbindungen in die Klasse der Polyketid-Inhibitoren eingeordnet. Ferner sind auch cyclische Peptide, wie das Microcystin **9** und das Nodularin, aus Blau- und Grünalgen als Inhibitoren bekannt, die wiederum eine eigene Klasse bilden.

Oxidativer Burst und induzierte pflanzliche Abwehr

Eine weitere interessante Aktivität von Cantharidin **1** ist das Auslösen eines Oxidativen Bursts in Pflanzenzellen. Dies konnte VAN GESTELEN in Tabakzellkulturen (*Nicotinia tabacum* cv. BY-2) und in Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) nachweisen [61,62]. Es gibt keinen Hinweis auf eine biologische Relevanz dieses Effektes; die bekannte Wirkung des Käfergiftes als Phosphataseinhibitor und seine einfache Verfügbarkeit machten es vielmehr zu einem Werkzeug zur Erforschung dieser Abwehrreaktion von Pflanzen.

Der Oxidative Burst in Pflanzen ist ein Teil der induzierten Abwehr von Pflanzen gegen Feinde, z.B. Viren oder Mikroorganismen. Als Alternative zur lokalen Abwehr kann die Pflanze in einer hypersensitiven Reaktion (HR) schnell auf einen Angriff reagieren, in deren Verlauf reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 und das Hydroxylradikal $OH\bullet$ gebildet werden. Diese schädigen das Pathogen direkt, führen aber auch zum gezielten Absterben einzelner Zellen (Apoptose), womit dem Angreifer die Lebensgrundlage entzogen wird [63,64]. In dieser kurzen Zeit synthetisiert die Zelle noch das Phytohormon Salicylsäure **10** (SA), das nach Transport in weiter entfernte Bereiche der Pflanze diese vor dem Angriff eines Pathogens warnt. Die Pflanze kann sich daraufhin durch die Synthese eigener Abwehrsubstanzen (Phytoalexine) schützen [65]. Dieser Vorgang des Anschaltens von Verteidigungsmechanismen nach Schädigung eines anderen Pflanzenteils wird als Systemic Acquired Resistance (SAR) bezeichnet [66,67]. In diesem Zusammenhang werden auch PR-Proteine (Pathogen-Related Proteins) verstärkt gebildet, die zumeist hydrolytische oder fungitoxische Wirkung besitzen [68,69].

Neben Salicylsäure **10** sind noch andere Verbindungen bekannt, die eine hormonelle Wirkung in Pflanzen besitzen. Die Jasmonsäure **11** (JA) ist von zentraler Bedeutung, wenn Pflanzen durch Fraß geschädigt werden. Sie vermag spezielle Wound-Response-Gene zu aktivieren, die Proteine codieren, die eine spezifische Abwehr erlauben [70].

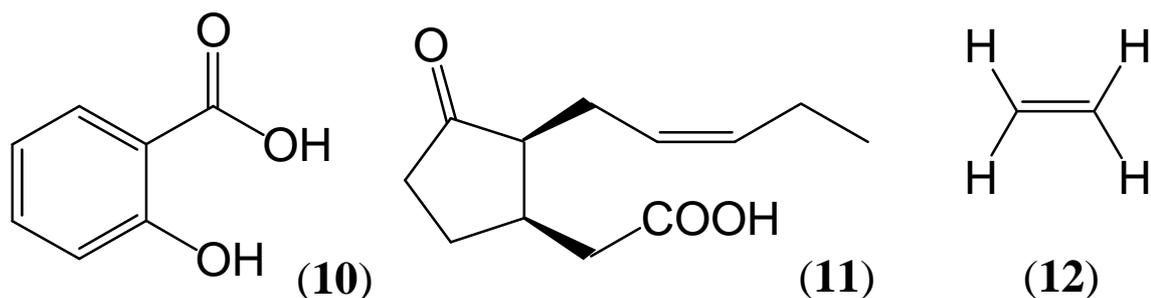


Abbildung 1-8 Phytohormone der induzierten pflanzlichen Abwehr; Salicylsäure **10**, Jasmonsäure **11** und Ethylen **12**

Ein weiteres Beispiel für ein Phytohormon ist das Ethylen **12**, dessen Produktion als allgemeine Stressantwort von fast allen denkbaren biotischen und abiotischen Stressfaktoren induziert wird. Es bewirkt als endogenes Signal, aber auch als gasförmiger Informationsträger eine Vielzahl von Effekten [71]. Besonders anschaulich sind die Seneszenz und beschleunigte Reifung von Früchten, die entweder mit Ethylen begast werden, oder aber in der Nähe von alterndem Obst liegen. Doch nicht ein Phytohormon allein ist für eine spezielle Reaktion verantwortlich, es kristallisiert sich vielmehr heraus, daß es ein verzweigtes Netzwerk der Signalkaskaden gibt, die sich gegenseitig beeinflussen und deren Gesamtheit eine fein abgestufte Antwort ergeben.

Ökologie des Cantharidins

Eine große Rolle spielt Cantharidin in der Ökologie vieler Insekten, welche von DETTNER ausführlich zusammengefasst wurde [72] (und weiterführende Literatur).

Es sind nur zwei Familien von Cantharidinproduzenten bekannt, die Öl- oder Blasenkäfer (*Meloidae*) und die Schein- oder Schenkelbockkäfer (*Oedemeridae*). Die adulten Ölkäfer können bis zu 5 mg Cantharidin **1** enthalten. Dabei sind bei den Meloiden ausschließlich die Männchen befähigt, die toxische Substanz zu produzieren. Diese übertragen einen Großteil des Giftes während der Kopulation mit dem Spermienpaket auf das Weibchen, das schließlich mehrere 100 µg auf jedes Eipaket abgibt. Auf diese Weise ist ein ganzer Lebenszyklus einer Generation gegen Fraßfeinde geschützt. Anders bei den Oedemeriden; dort sind sowohl das Männchen als auch das Weibchen in der Lage Cantharidin biosynthetisch herzustellen und es kommt auch zu keiner Übertragung während der Kopulation. Allerdings ist der Cantharidingehalt mit

max. 30 µg pro Individuum bei diesen Arten wesentlich geringer als bei den Meloiden. Während von Ölkäfern in Deutschland nur vereinzelt berichtet wird, sind Käfer der Gattung *Oedemera* in Deutschland wesentlich häufiger anzutreffen. Man findet verschiedene Arten während der frühen Sommermonate meist auf Blüten in wilden Wiesen, oft neben Bahngleisen [73]. Neben den Produzenten gibt es eine ganze Reihe von Insekten, die durch Cantharidin angelockt werden und dieses aufnehmen können. Für diese hat GÖRNITZ bereits 1937 den Begriff der ‚Canthariphilen‘ geprägt, die in der folgenden Abbildung um die beiden Produzenten herum angeordnet dargestellt sind.

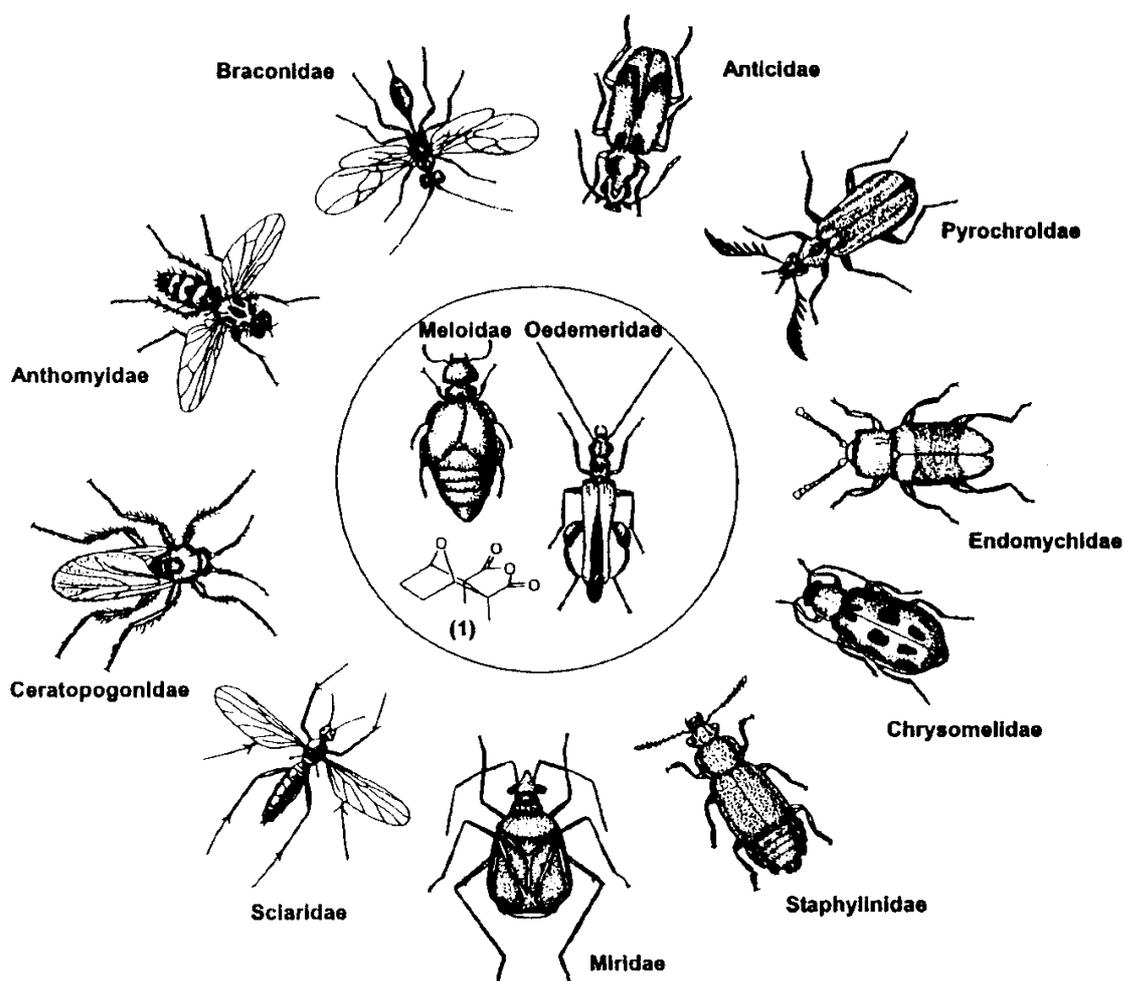


Abbildung 1-9 Um die beiden Familien der Cantharidinproduzenten sind verschiedene canthariphile Insekten dargestellt [74]

Die Feuerkäfer (Pyrochroidae) sind eine Familie von canthariphilen Insekten. Für diese ist über die Lockwirkung hinaus eine eigene Ökologie um das Cantharidin **1** beschrieben. Männliche Tiere sind in der Lage sogar kristallines Cantharidin wahrzunehmen. Sie nehmen dieses auf, und es kommt zu einem Balzritual, in dem das Cantharidin **1** eine zentrale Rolle spielt.

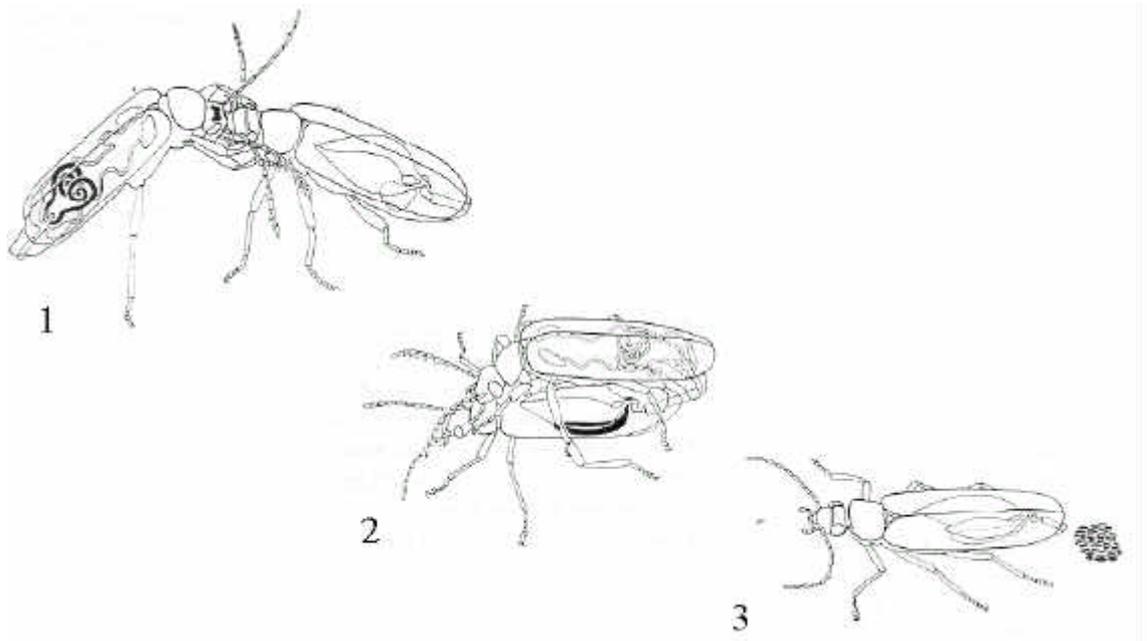


Abbildung 1-10 Balzritual mit der Kopf-an-Kopf-Stellung (1), Übertragung von Cantharidin (schwarz) mit dem Spermienpaket (2) und auf die Eigelege (3) bei Feuerkäfern (Pyrochroidae) [75]

Mit ihrer Gabe beladen, präsentieren sie sich den Weibchen. Diese prüfen bei einer Kopf-an-Kopf-Stellung die Menge der terpenoiden Substanz in einer drüsigen Kopfgrube bei den Männchen. Findet das Weibchen eine ausreichende Menge, so erlaubt es dem Männchen die Kopulation, und dies überträgt die Hauptmenge der toxischen Substanz, analog zu den Meloiden, mit dem Spermienpaket auf das Weibchen, das wiederum den größten Teil an die Eier weitergibt. Somit ist das Cantharidin für die Feuerkäfer nicht nur eine Substanz, die sie zur chemischen Verteidigung einsetzen, sondern darüberhinaus hat es die Aufgabe eines Sexualpheromons und ist ein Fitness-Indikator.

Die Canthariphilie von Gnitzen (Ceratopogonidae) wurde in einer Dissertation von FRENZEL eingehend untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß verschiedene Arten der Gattung Atrichipogon in Cantharidinfallen gefangen werden konnten, wobei keine signifikante Bevorzugung durch Männchen oder Weibchen festzustellen war. In einer Struktur-Wirkungs-Studie wurden verschiedene Analoga auf ihre Attraktivität für die Gnitzen getestet [76].

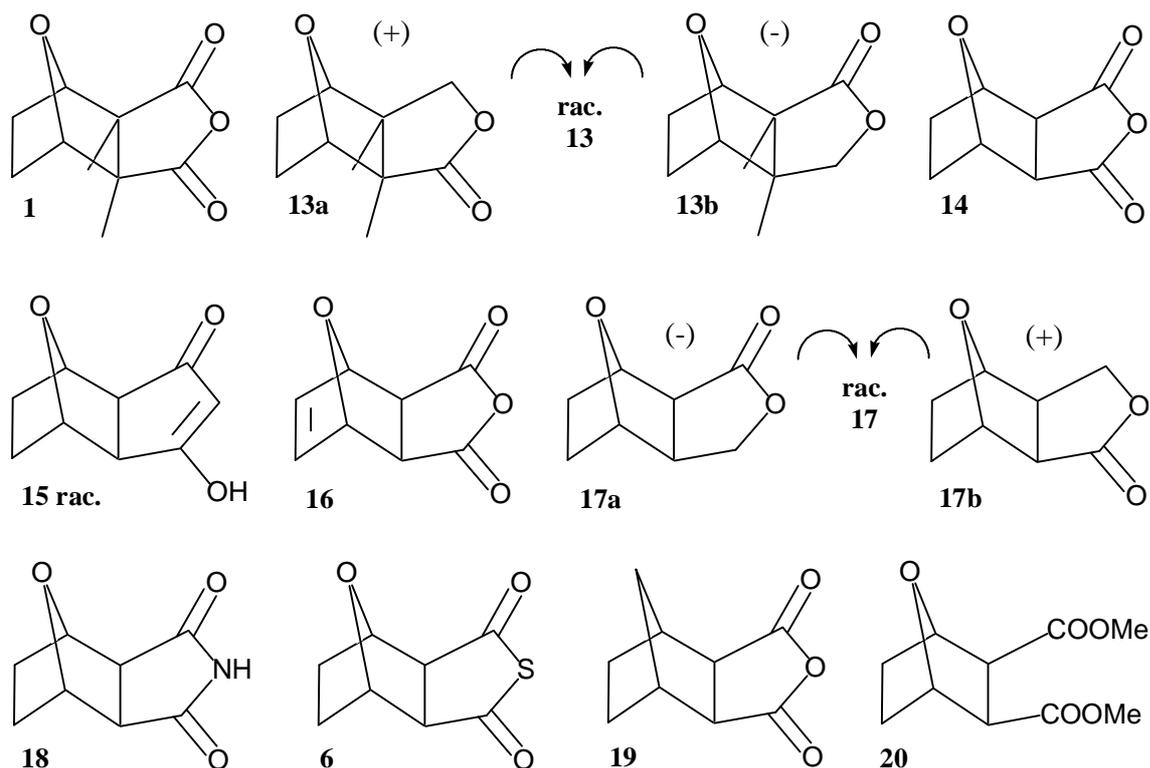


Abbildung 1-11 Cantharidin-Analoga, die auf ihre Lockwirkung auf Gnitzen getestet wurden

Ein typisches Bild für die Attraktivität ist in Abbildung 1-12 dargestellt. Diese Graphik zeigt sehr deutlich, daß das Cantharidin die wirksamste Struktur darstellt. Lediglich das Lacton **13** übt eine geringe Attraktivität auf die Gnitzen aus, wobei keine signifikante Bevorzugung eines Enantiomeren festzustellen ist. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß auch die Verbindungen **14**, **15**, **17**, **17a**, **17b**, **18**, **6** und **20** eine gewisse, im Vergleich zu **1** jedoch schwächere Attraktivität besitzen. Palasonin **2**, oder andere Verbindungen des Typs mit nur einer angularen Methylgruppe wurden in dieser Struktur-Wirkungsstudie nicht getestet.

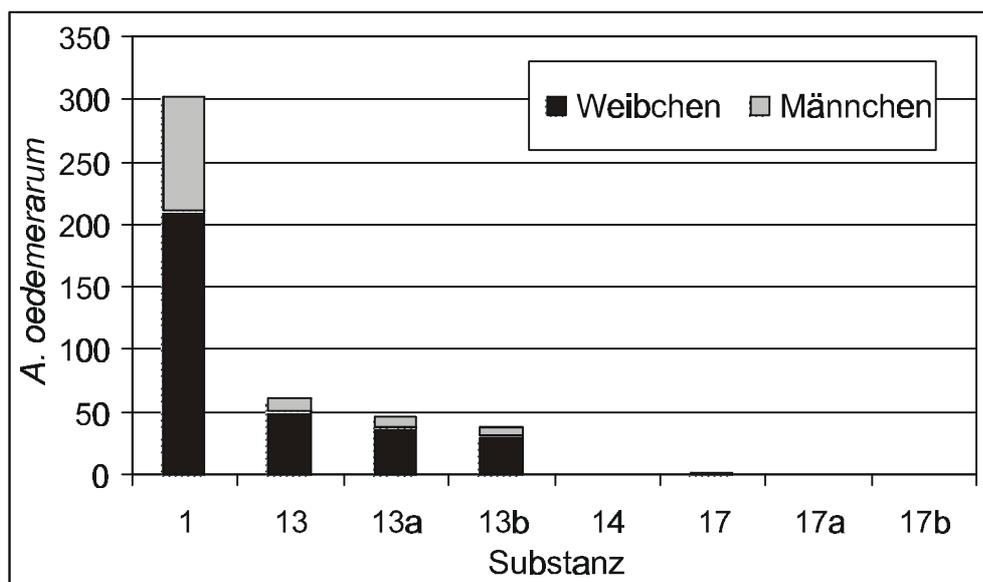


Abbildung 1-12 Summarisches Ergebniss der Attraktivität von Cantharidin und verschiedener Analoga auf *A. oedemerarum* im Feldversuch (III Mistelbach 22.7.-13.9. '91) [76]

Vergleichbar zu den Ergebnissen der Toxizitätsuntersuchungen wurde auch hier festgestellt, daß das 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-Grundgerüst mit den zwei *exo*-ständigen Carbonylfunktionen und die angularen Methylgruppen wesentlich für die biologische Wirkung sind. Man kann sagen, die Strukturen sind für die Canthariphilen um so interessanter, je toxischer sie sind. Im Falle der Gnitzen ist jedoch noch kein Vorteil nachgewiesen, weder im Paarungsverhalten, noch sind die Mengen, die in Freilandtieren gefunden werden, hinreichend, um Räuber abzuschrecken.

Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich aus neuesten Beobachtungen von DETTNER (mündl. Mitteilung), der in Eiern von *Hycleus*-Arten nur Palasonin **2**, das bisher nur aus der Pflanze *Butea frondosa* bekannt war (s. Kap. 1.1), aber kein Cantharidin **1** nachweisen konnte. Zum Einen zeigt dies, daß die beiden ähnlichen Verbindungen tatsächlich sehr eng miteinander verwandt sind. Darüberhinaus könnte dies auch einen ökologischen Hintergrund haben. Denn das sehr toxische Cantharidin ist auch am attraktivsten für die canthariphilen Insekten, so daß die Eier nicht wirklich wirksam geschützt sind, sondern daß sogar Fraßfeinde angelockt werden können. Da das Palasonin immer noch sehr toxisch ist, nach den Ergebnissen der Struktur-Wirkungsstudie wahrscheinlich aber weniger attraktiv, könnte dies in der Summe eine effektivere Verteidigung bewirken.

Freies und gesamtes Cantharidin und Palasonin

Eine weitere Gemeinsamkeit von Cantharidin **1** aus Insekten und von Palasonin **2** aus *Butea frondosa* liegt darin, daß die Anhydride nicht direkt mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar sind. Beide Moleküle liegen in einer wasserlöslichen Form vor, aus der erst durch eine saure Aufarbeitung (6 N HCl, 100° C) das Anhydrid entsteht, das dann in Chloroform löslich ist. Bei den untersuchten Individuen von *Hycleus lunata* (Meloidae) fand SEIDL, daß durchschnittlich nur 13 % der gesamten Cantharidinmenge durch direkte Chloroform-Extraktion erfaßt wurde [77]. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen auch McCORMICK und CARREL, die den Gehalt von Cantharidin in *Epicauta pestifera* aus der Familie der Meloiden untersuchten [78]. Auch in canthariphilen Insekten findet sich neben freiem Cantharidin, das direkt durch organische Lösungsmittel extrahiert werden kann, auch ein Teil, der erst wässrig extrahiert und sauer aufgeschlossen werden muß [76,79]. Dies läßt vermuten, daß es sich bei der wasserlöslichen Form um ein polares Cantharidin-Derivat handeln könnte. Das gleiche gilt für das Palasonin **2**. Auch hier kann durch Extraktion mit Chloroform nur etwa 1 % direkt extrahiert werden. Der größte Teil liegt ebenfalls in einer wasserlöslichen Form vor, aus der das Anhydrid erst durch saure Aufarbeitung freigesetzt wird und mit Chloroform extrahiert werden kann [74,80].

Warum die Anhydride nicht frei, sondern gebunden vorliegen, könnte durch seine cytotoxischen Eigenschaften erklärt werden. Vor allem das Cantharidin kann in fast allen Kompartimenten und auch in der Hämolymphe der Insekten nachgewiesen werden, wo es die PP2A inhibieren könnte. Eine Veränderung der chemischen Struktur setzt jedoch die Wirkung drastisch herab, wie zuvor in den Ausführungen zur Toxizität (S. 5) beschrieben wurde. Darüberhinaus ist noch zu berücksichtigen, daß ein hydrophiles Derivat in der wässrigen Hämolymphe viel besser transportiert werden kann.

Dabei könnte es sich nach McCORMICK und CARREL um ein Protein-Komplex handeln. Untersuchungen von RATH von Larvenextrakten von *Pyrochroa coccinea* haben ergeben, daß eine Bindung des Cantharidins an ein Protein ausgeschlossen werden kann. Für RATH kommt hingegen ein Zucker als Bindungspartner in Betracht [81]. Dies stellt wiederum eine Analogie zu den Iridoiden dar, deren Transport- und

Speicherform ebenfalls ein Glucosid ist [82,83]. Trotz intensiver Bemühungen konnte aber auch DÜTEMEYER kein Konjugat von Palasonin oder Cantharidin isolieren und identifizieren [74].

Biosynthese des Cantharidins

Sowohl die Symmetrie von **1** mit einer internen Spiegelebene, als auch die formale Monoterpenstruktur lassen eine symmetrische Kondensation und Modifikation von zwei Isopreneinheiten vermuten [84]. Dies ist aber nicht der Fall. Durch verschiedene Experimente mit radioaktiv markierten Vorstufen konnte gezeigt werden, daß Cantharidin trotz seiner C₁₀-Struktur aus Farnesol **21** in einer nichtsymmetrischen Cyclisierung gebildet wird, und somit ein Sesquiterpenabkömmling ist. Die Biosynthese von Cantharidin in Käfern ist von McCORMICK und CARREL [85], sowie von SCHMID [86] eingehend untersucht worden, doch konnte sie bis heute in den wesentlichen Schritten nicht aufgeklärt werden. Farnesol **21** entsteht über den schon länger bekannten Biosyntheseweg aus Mevalolacton, wie durch Inkorporierungsexperimente mit [2-¹⁴C]-Mevalonat und Inhibierung mit 6-Fluor-Mevalonat gezeigt werden konnte [86,87]. Die weiteren Schritte sind nicht bekannt, aus den bisherigen Studien läßt sich jedoch zumindest ein eindeutiges Verknüpfungsschema ableiten.

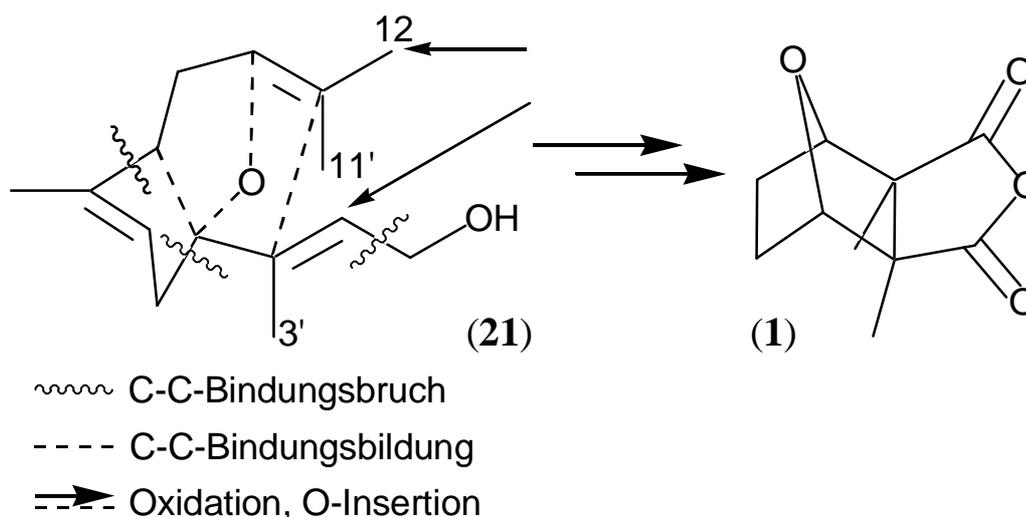


Abbildung 1-13 Biosynthese des Cantharidin **1** aus Farnesol **21**

Nach einer Reihe von C-C-Bindungsbildungen und -brüchen, sowie Oxidationen und Sauerstoffinsertionen erhält der Käfer seine Abwehrsubstanz. Drei der vier Sauerstoffatome, nämlich zwei des Anhydridrestes und der Ethersauerstoff stammen aus der Luft und werden durch mehrfache Oxidationen von Farnesol **21** ins Molekül eingebracht. Der vierte Sauerstoff stammt aus dem Wasser des Cytosols [88]. Während eine angulare Methylgruppe des Cantharidins als C3' im Farnesol bereits vorgebildet ist, kommt es bei der anderen angularen Methylgruppe zu einem jeweils 50%igen Einbau der Methylgruppen C11' und C12 von Farnesol **21**. Der jeweils andere Kohlenstoff wird oxidiert und geht in die Anhydridfunktion ein. Die zweite Carbonylgruppe entsteht nach Entfernen des C1-Kohlenstoffs durch Oxidation und Decarboxylierung und anschließende weitere Oxidation des C2 zum Carboxylat.

Somit weiß man welches Kohlenstoffatom des Farnesols **21** in welche Position des Cantharidingerüsts übergeht. In welcher Reihenfolge die Reaktionen ablaufen, ist jedoch noch nicht bekannt. Prinzipiell läßt sich eine Analogie zur Iridoid-Biosynthese erkennen, bei der Geraniol in ω -Position oxidiert wird und letztlich ebenfalls eine vicinale Dicarbonylverbindung mit cyclischem Grundgerüst entsteht [89,90].

2 Aufgabenstellung

DETTNER fand in einigen Proben von Produzenten und Canthariphilen neben Cantharidin **1** auch Palasonin **2** als natürliche Verbindung (mündl. Mitteilungen). Dies deutet auf eine sehr enge biosynthetische Verwandtschaft dieser beiden Verbindungen hin. Um festzustellen, ob die Biosynthese in der Pflanze und in den Käfern über einen vergleichbaren Weg erfolgt, und ob Palasonin **2** eventuell durch Demethylierung aus Cantharidin **1** dargestellt wird, sollten die Enantiomerenverhältnisse von **2** aus der Pflanze und aus Insekten vergleichend untersucht werden. Hierzu sollte eine chirale Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse aus biologischen Proben etabliert werden. Für die Zuordnung der absoluten Konfiguration zu den beiden Enantiomeren wurde eine Kristallstrukturanalyse angestrebt.

Zuvor sollte die Struktur der hydrophilen Präkursoren von Cantharidin **1** und Palasonin **2** aufgeklärt werden. Beide Naturstoffe zeigen neben der strukturellen Homologie ein vergleichbares Reaktionsprofil. Der größte Teil kann sowohl aus den Pflanzen als auch aus den Insekten nicht direkt durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, sondern ist wasserlöslich und liegt erst nach Erhitzen der salzsauren Lösungen als Anhydrid vor, das dann im organischen Extrakt nachgewiesen werden kann. Hierdurch bietet sich vielleicht die Möglichkeit einer internen „Detoxifizierung“ der pharmakologisch aktiven Verbindungen durch das Vorliegen einer Speicher- und Transportform.

Ein weiteres Ziel der Arbeit sollte es sein, die unbekannt Schritte der Biosynthese vom Farnesol **21** zum Cantharidin **1** näher zu untersuchen. Dazu waren Einbauexperimente mit markierten Vorstufen an Cantharidinproduzenten geplant. Aus vorherigen Arbeiten [74] war bereits bekannt, daß Einbauexperimente mit adulten Oedemeriden nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führten. Deshalb wurde angestrebt, die Experimente an den Larven durchzuführen, da diese aufgrund des Wachstums eine höhere Stoffwechselrate besitzen. Hierbei galt es als erstes zu beurteilen, ob die Biosynthese des Cantharidins bei den Oedemeriden nach dem gleichen Mechanismus erfolgt wie bei den Meloiden, an denen alle bisherigen Untersuchungen durchgeführt wurden. Durch den Einsatz von mehrfach deuterierten

Präkursoren sollte darüberhinaus der Verbleib der Wasserstoffatome über die unbekannt Schritte beobachtet werden. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Oxidationsstufen und auf Intermediate möglich sein, um einen näheren Einblick in die mechanistische Abfolge zu erhalten. Ausserdem sollte untersucht werden, ob die Biogenese des strukturell ähnlichen Palasonins **2** nach dem gleichen Mechanismus erfolgt, denn aufgrund seiner Chiralität könnte es als asymmetrische Sonde einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Cyclisierung und Modifikation des Farnesols **21** zu den 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptanen liefern.

Aktuelle Arbeiten beschreiben, daß Cantharidin **1** einen Oxidativen Burst in Pflanzenzellen auslöst und somit einen Abwehrmechanismus in Gang setzt. Diese Reaktion sollte am Beispiel der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) näher untersucht werden. Durch Vergleich mit anderen Elicitoren sollten die Signalkaskaden und deren Interaktion bestimmt werden, um daraus weitere Information zum Verständnis der pflanzlichen Abwehr zu gewinnen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Hydrophile Präkursoren von Cantharidin und Palasonin

Cantharidin **1** ist eine stark toxische Substanz, die die Serin/Threonin-spezifische Proteinphosphatase 2A (PP2A), ein sehr konservatives und zentrales Enzym zur Regulation des Primärmetabolismus, zu inhibieren vermag [54,55]. Einige Insekten (Canthariphile und Cantharidinproduzenten) und wenige insektenfressende Säugetiere (Igel, Fledermäuse, Reptilien und Amphibien) sind jedoch in der Lage, hohe Dosen des Giftes zu tolerieren [28]. Dazu müssen diese Tiere einen besonderen Schutzmechanismus entwickelt haben, da das Gift in allen Körperkompartimenten nachgewiesen werden kann [77,88]). Ferner stellt man fest, daß nur ein geringer Teil des Cantharidins direkt durch organische Lösungsmittel extrahierbar ist. Der größte Teil kann nur wässrig extrahiert und aus salzsaurer Lösung unter rigiden Bedingungen (6 N HCl, 120° C, 4 h) freigesetzt werden, so daß er dann in der organisch löslichen Form als Anhydrid vorliegt [91]. Eine Möglichkeit ist das Vorliegen eines Konjugates, das eine nichttoxische Speicher- und Transportform darstellen könnte und von dem ein Rest bei Bedarf enzymatisch abgetrennt werden könnte. RATH kommt im Rahmen seiner Diplomarbeit zu dem Schluß, daß es sich vermutlich um einen kovalent gebundenen Zuckerrest handeln sollte, da durch die Zugabe von Cellulase, einem unspezifischen Glucosidasengemisch, Cantharidin aus wässrigen Extrakten von Feuerkäferlarven (*Pyrochroa coccinea* L.) freigesetzt werden kann [81]. In weiteren Arbeiten von DÜTEMEYER konnte jedoch keine spezifische Glucosidase gefunden werden. Auch läßt sich die hydrophile Vorstufe nicht durch typische Färbereagenzien für Kohlenhydrate auf Dünnschichtchromatogrammen detektieren [74]. Durch eine Modifikation des Anhydridsystems würde die Toxizität von Cantharidin erheblich herabgesetzt und gleichzeitig erhielte man eine wesentlich polarere Verbindung, aus der nur durch Hydrolyse wieder Cantharidin freigesetzt werden könnte [41,92]. Ebenso wäre auch eine Diamid- oder Imidstruktur, etwa zu einem Aminosäurekonjugat denkbar.

In der Aufgabenstellung (S.19) wurde bereits auf die strukturellen und chemischen Ähnlichkeiten zwischen Cantharidin und Palasonin eingegangen. Da letzteres ebenfalls

als hydrophile Vorstufe in seiner natürlichen Quelle vorliegt, sollte diese zunächst isoliert und charakterisiert werden. Mit diesem Ergebnis sollte das Vorliegen eines homologen Cantharidin-Präkursors in den schwieriger zu bearbeitenden Insekten untersucht werden. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, daß mit den Samen von *Butea frondosa* eine jahreszeitlich unabhängige Quelle für natürliches Palasonin zur Verfügung steht, aus der jederzeit größere Mengen des Präkursors extrahiert werden können.

Nach Entfetten der fein gemörsterten Samen durch Soxhlet-Extraktion mit Ethylacetat, wurde das postulierte Konjugat aus dem Rückstand wässrig extrahiert. Durch Methanolfällung und anschließender Ultrafiltration bis zu einer Molekulargewichtsausschlußgrenze (MWCO) von 500 Da wurde versucht, den größten Teil der mitgelösten Proteine zu entfernen. Das „Konjugat“ konnte stets im Filtrat nachgewiesen werden, während die Rückstände kein Palasonin enthielten. Der Test erfolgte nach der standardisierten Arbeitsvorschrift (s. Seite 95) durch Freisetzung von Palasonin **2** mittels saurer Aufarbeitung und Nachweis mittels GC-MS aufgrund seiner Retentionszeit und des charakteristischen Massenspektrums. Die Fragmentierung von **2** verläuft analog zu der des Cantharidins **1**, die in Abbildung 3-39 dargestellt ist.

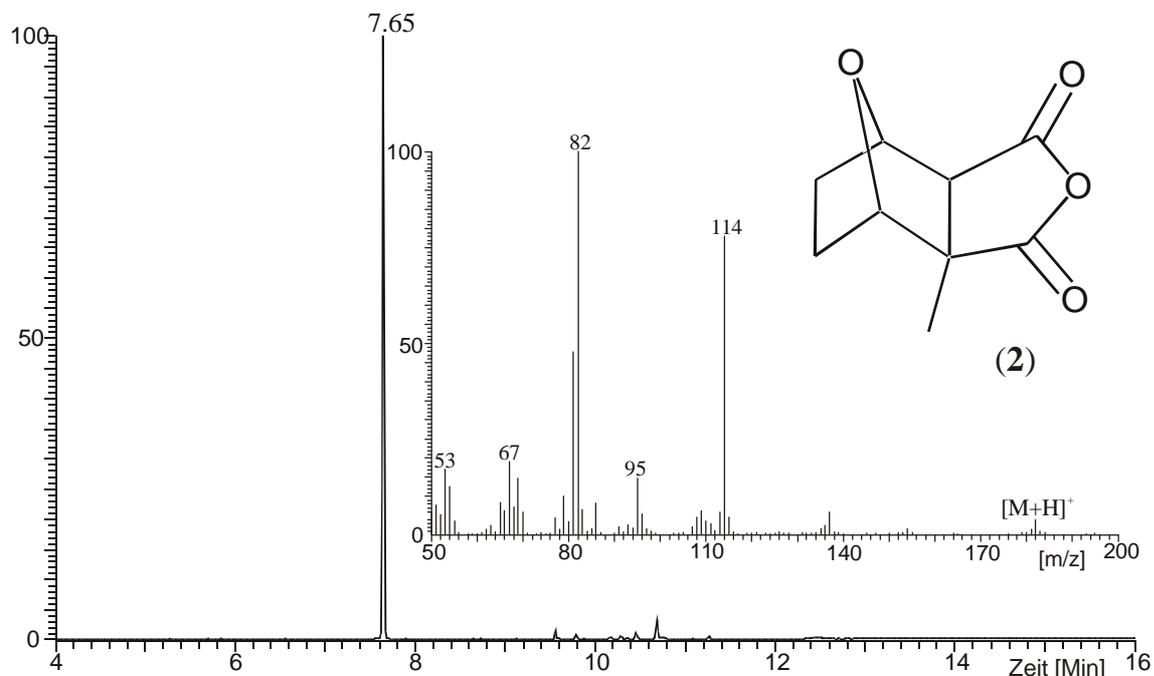


Abbildung 3-1 Charakteristisches GC/MS-Profil von Palasonin **2** aus dem Samen von *B. frondosa*

Dieser indirekte Nachweis ist ein rein qualitativer Test, da eine quantitative Freisetzung nicht gewährleistet ist. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, daß sowohl die Konzentration der Salzsäure, als auch die Reaktionsdauer einen sehr großen Einfluß auf die Palasoninausbeute haben [80].

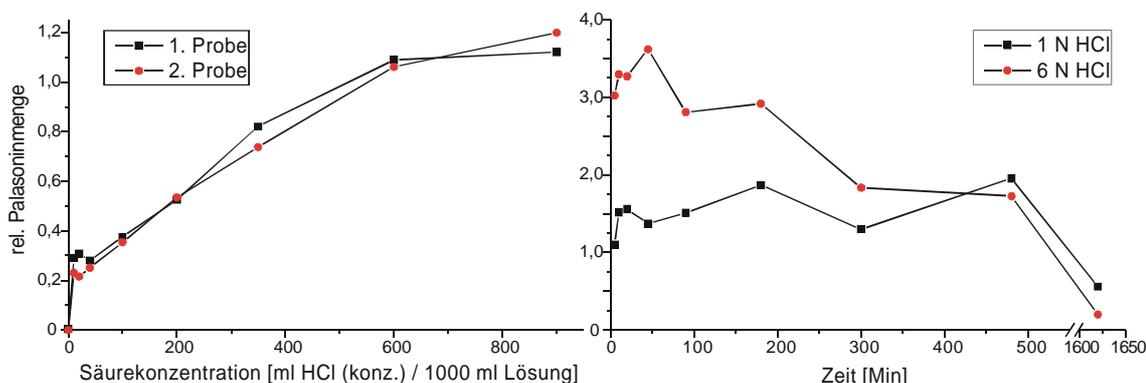


Abbildung 3-2 Quantitative Untersuchung zur Freisetzung von Palasonin 2 aus einem wässrigen *Butea*-Extrakt in Abhängigkeit von der Säurekonzentration und der Reaktionsdauer

Ein guter Kompromiss für eine möglichst hohe Palasoninausbeute bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit und geringer Streuung innerhalb einer Messreihe wurde bei einer sauren Aufarbeitung mit 1 N HCl und 30 Min. bei 110° C erreicht (s. S. 95). Die Nachweisgrenze hängt in erster Linie von der Leistungsfähigkeit des GC/MS-Systems ab und liegt in einer Größenordnung von kleiner 1 µg/ml Palasonin in Chloroform. Dies stellt kein analytisches Problem dar, denn diese Konzentration kann durch Verwenden einer größeren Probenmenge, Aufkonzentration der organischen Lösung und Messen im splitless-Modus, sowie im Single-Ion-Monitoring (SIM) gesteigert werden.

Die weitere Auftrennung des extrahierten Präkursors wurde durch verschiedene chromatographische Schritte erreicht. Zum Ersten war dies die Anionenaustauschchromatographie, die bei einem pH-Wert von 7,2 mit einem Salzgradienten von 20 mM auf 1 M Ammoniumacetat durchgeführt wurde. Wie in Abbildung 3-3 dargestellt, eluiert die wasserlösliche Form nach etwa 11 Minuten in Fraktion 12 bei einer Acetatkonzentration von etwa 300 mM. Nach der üblichen Aufarbeitung konnte in keiner weiteren Fraktion Palasonin nachgewiesen werden. Dieses Ergebniss läßt auf saure Gruppen in der gesuchten Struktur schliessen.

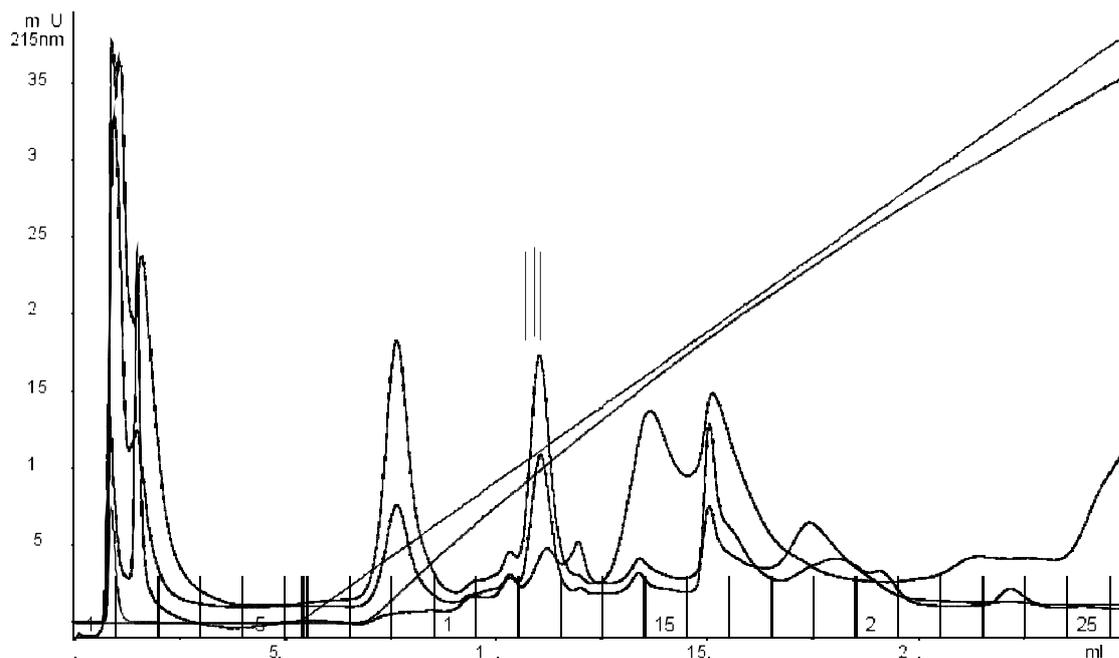


Abbildung 3-3 Anionenaustauschchromatographie eines wässrigen Butea-Extrakt an Resorce Q 2 ml; Detektion bei 215, 254 und 280 nm, sowie der Leitfähigkeit

Der nächste Aufreinigungsschritt war eine hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), eine Technik, die sich zur Trennung von Kohlenhydraten, Peptiden und Aminosäuren etabliert hat und mittlerweile auf viele polare Verbindungen unterschiedlicher Molekülgröße ausgeweitet wurde [93,94]. Bei Kopplung dieser Form der Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, polare Verbindungen zu finden, die unter reversed-phase-Bedingungen nicht getrennt werden und im Durchlauf eluieren, aber auch zu polar für eine Trennung unter straight-phase-Bedingungen sind [95]. Diese Technik verwendet mittelpolare Säulenmaterialien, wie z.B. Diol-, Amino- oder Cyano-Phasen, die mit einem reversed-phase-Laufmittelgemisch (MeCN/H₂O) mit überwiegend organischem Anteil betrieben werden. Die Elutionsreihenfolge entspricht der Hydrophilie der Verbindungen und ist somit entgegengesetzt zur reversed-phase-Trennung. Die Theorie beschreibt den chromatographischen Prozeß wie folgt: Der geringe Anteil Wasser bildet eine flüssigstationäre Phase mit den polaren Kopfgruppen des Säulenmaterials, an der die Substanzen aufgrund ihrer Polarität und Löslichkeit zwischen wässriger stationärer Phase und organisch/wässriger mobilen Phase retardieren [96]. Durch Verwendung eines Lichtstredetektors, mit dem auch nicht UV-aktive Substanzen erfasst werden, konnte an einer Diol-Phase ein Trennprotokoll entwickelt werden, das nur eine Fraktion

von 15,89 bis 17,86 Min. enthält, aus der bei saurer Aufarbeitung Palasonin freigesetzt werden kann.

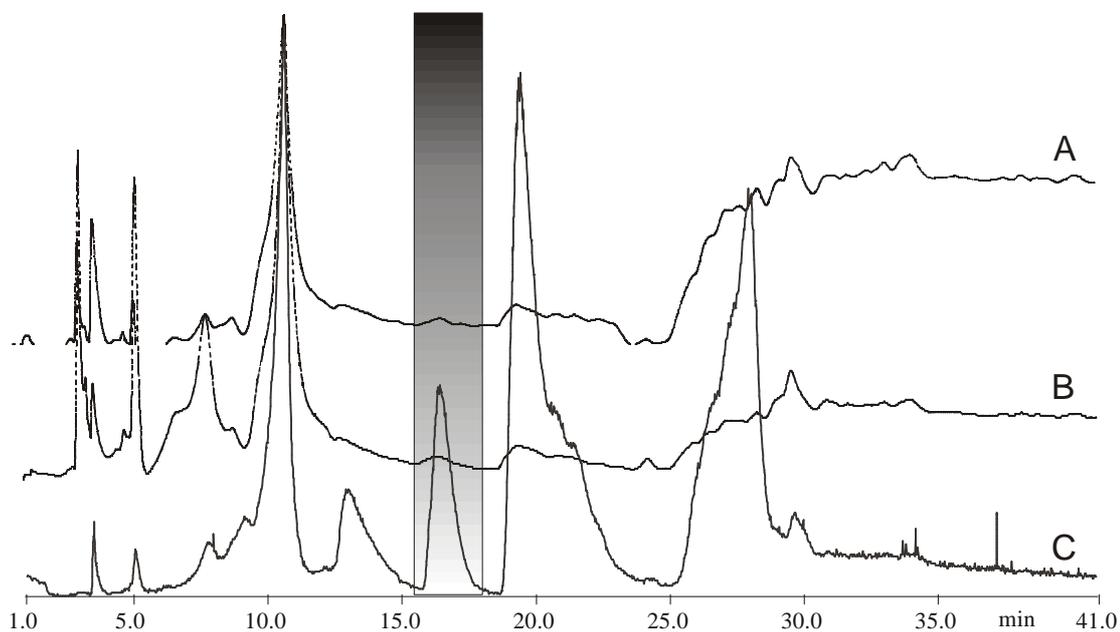


Abbildung 3-4 Chromatographie eines wässrigen Butea-Extrakts an Merck Diol-100 5µm;
A: 190 nm B: 215 nm, C: EMD

Überträgt man diese Methode auf ein LC-MS, so erhält man nach Optimierung der APCI-MS-Bedingungen zur selben Retentionszeit ein Massenspektrum, das Fragmente aufweist, die aus dem CI-Massenspektrum von Palasonin mit Methan bekannt sind, nämlich das $[M+H]^+$ -Ion der Masse 183, sowie die Fragmentionen der Masse 155 und 137. Der Basispeak mit $m/z = 218$ entspricht dem Addukt der freien Dicarbonsäure mit einem Ammoniumion aus dem Laufmittel.

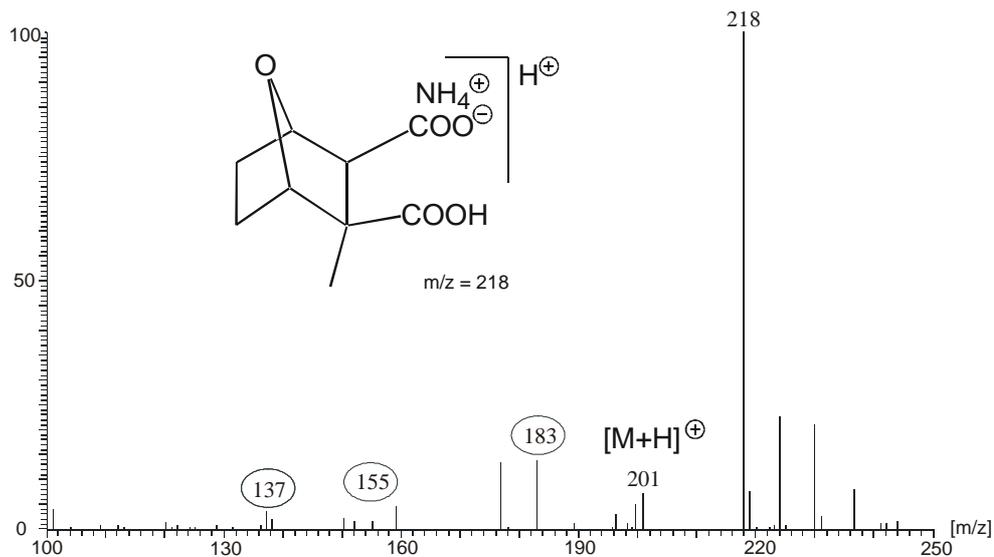


Abbildung 3-5 APCI-MS zur Retentionszeit des Palasonin-Konjugates im Positiv-Ionen-Modus

Handelt es sich bei den detektierten Verbindungen tatsächlich um Komplexe der Palasonindicarbonsäure, so sollte diese sehr spezifisch auch im Negativ-Ionen-Modus detektiert werden können.

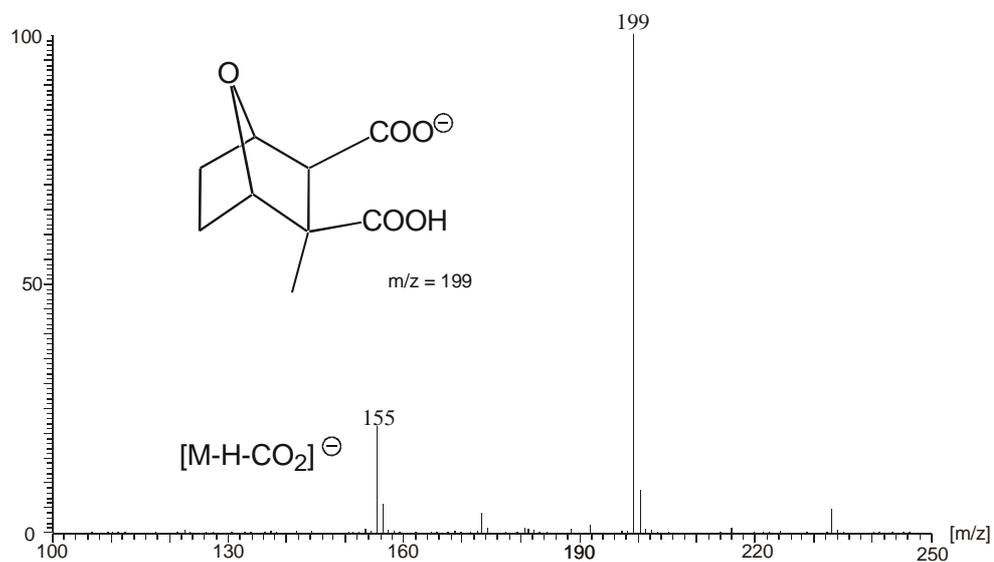


Abbildung 3-6 APCI-MS zur Retentionszeit des Palasonin-Konjugates im Negativ-Ionen-Modus

Tatsächlich findet man zur gleichen Retentionszeit das Ion der Masse 199 im Chromatogram, das der einfach deprotonierten Disäure entspricht. Auch das charakteristische Ion ($m/z = 155$) kann man aufgrund von MS/MS-Experimenten eindeutig dem $[M-H]^-$ -Ion zuordnen, wobei die Massendifferenz von 44 amu einer Decarboxylierung entspricht.

Diese Daten deuten darauf hin, daß es sich bei dem hydrophilen Präkursor des Palasonins nicht um ein Konjugat handelt, sondern dass die freie Dicarbonsäure aus den Samen extrahiert wird. Diese sollte nach Derivatisierung mit Diazomethan direkt als Dimethylester nachweisbar sein. Versucht man die aufgereinigte Probe nach Gefriertrocknung mit Diazomethan umzusetzen, so erhält man allerdings kein Produkt, das sich durch Dichlormethan extrahieren läßt. Nach saurer Hydrolyse der wässrigen Phase des Derivatisierungsgemisches konnte jedoch Palasonin detektiert werden, womit sichergestellt war, daß diese Probe auch tatsächlich die wässrig extrahierbare Vorstufe des Palasonins enthält. Um zu überprüfen, ob und wie die offene Dicarbonsäurestruktur mit Diazomethan reagiert, wurden die käuflichen Strukturanaloga Cantharidinsäure, die Dicarbonsäure des Cantharidins, und Endothal **5** mit dem Derivatisierungsreagenz versetzt. Auf diese Weise sollte ein Standard für die Erkennung des Dimethylesters im Massenspektrometer hergestellt werden, da sich alle drei Strukturen lediglich durch eine angulare Methylgruppe unterscheiden. Endothal **5** bildete den Dimethylester, während die Cantharidinsäure scheinbar nicht mit Diazomethan reagiert, denn man erhält nur das Cantharidin in seiner Anhydridform. Das bedeutet, daß wir aus drei unterschiedlichen Proben drei verschiedene Ergebnisse für die Reaktivität der Dicarbonsäuren erhalten haben. Diese Beobachtung stellt auch die Existenz der Dicarbonsäure als den hydrophilen Präkursor des Palasonins in Frage, denn für diese sollte man ein ähnliches Verhalten wie für eine der beiden Modellsubstanzen Cantharidinsäure oder Endothal erwarten.

Um diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse zu überprüfen wurde Palasonin und daraus die Dicarbonsäure synthetisch dargestellt.

Das racemische Palasonin ist nach der Hochdruckmethode von DAUBEN et.al. relativ leicht synthetisch zugänglich [97]. In dieser wird Citraconsäureanhydrid **22** mit 1.1 eq Furan **23** in einer Diels-Alder-Reaktion unter 8 kbar Druck in 4 Tagen umgesetzt.

Aus den beiden farblosen Flüssigkeiten entstand das Addukt **24** als farbloser Feststoff. Die nachfolgende katalytische Hydrierung wurde ohne weitere Aufreinigung des Diels-Alder-Produktes durchgeführt, da es sonst äußerst leicht zur Rückreaktion kommen kann [97].

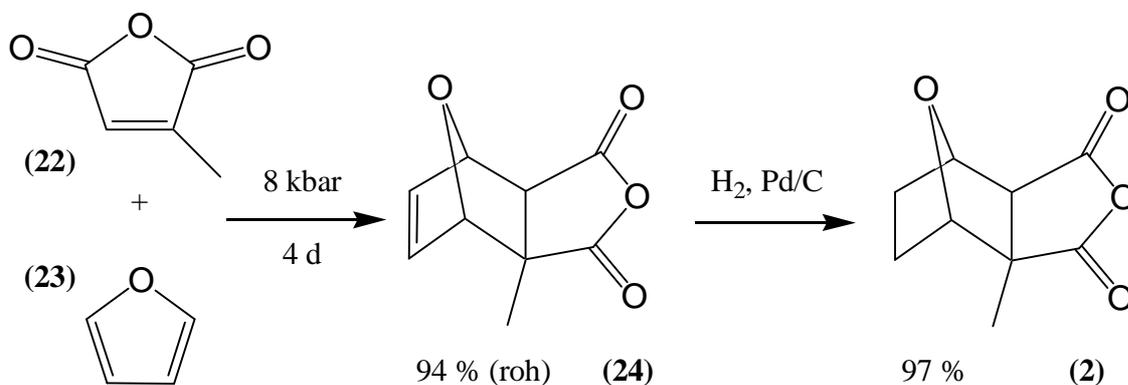


Abbildung 3-7 Synthese von racemischem Palasonin 2

Die Reaktion verläuft nach dieser Vorschrift sehr gut und liefert eine hohe Gesamtausbeute an racemischem Palasonin 2. Die erzielten Ausbeuten von 94 % und 97 % der beiden Schritte liegen nahe den Literaturwerten (97 % und 99 %). Das *endo*-Isomer konnte weder gaschromatographisch, noch durch NMR-Untersuchungen nachgewiesen werden.

Experimente zur Darstellung der Dicarbonsäure von Palasonin **25** als Standard für die Chromatographie und Spektroskopie zeigten, daß Palasonin bereits in Wasser unter neutralen Bedingungen hydrolysiert wird. Dies läßt sich beobachten, wenn man kristallines Palasonin in Wasser gibt. Innerhalb weniger Minuten löst sich dieses und gleichzeitig sinkt der pH-Wert von schwach sauer (pH = 5,9) auf sauer (pH = 2,5).

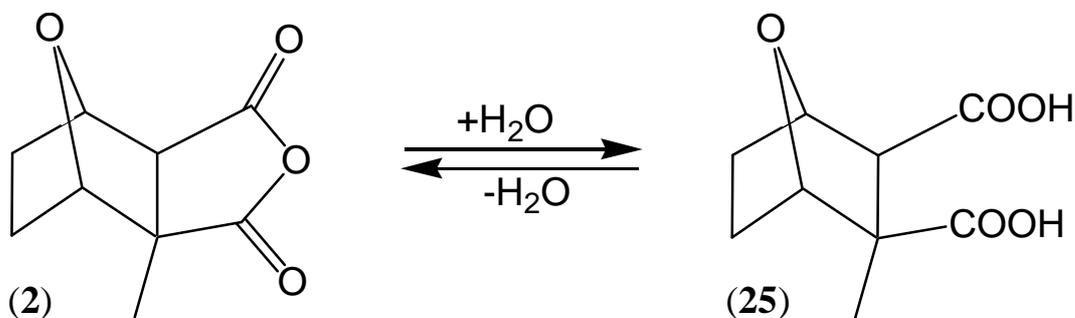


Abbildung 3-8 Hydrolyse von Palasonin 2 zur Palasonindicarbonsäure 25

Im NMR läßt sich die Hydrolyse kinetisch verfolgen. Das angulare Proton hat in der geschlossenen Anhydrid-Form eine chemische Verschiebung von 3,21 ppm, und in der offenen Form der Dicarbonsäure von 2,72 ppm. Innerhalb von 2 Std. wird fast das gesamte Palasonin, das in d_3 -MeCN:D₂O 3:1 gelöst ist, hydrolysiert.

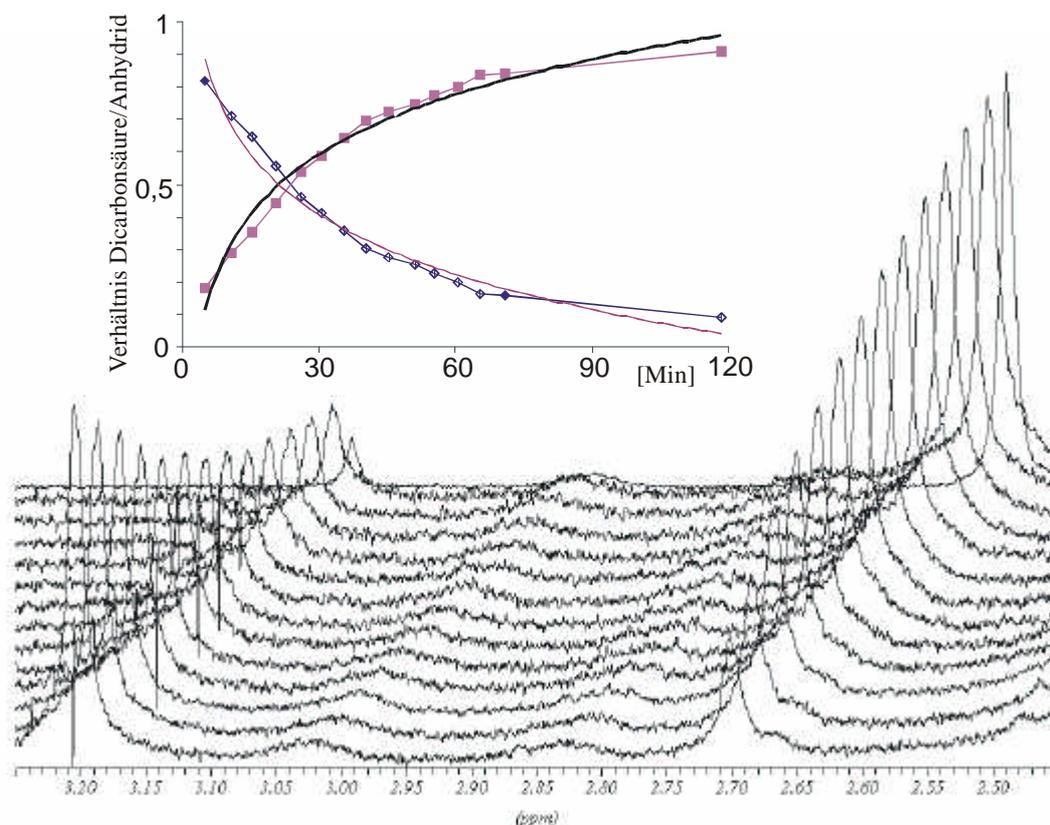


Abbildung 3-9 Kinetik der Hydrolyse von Palasonin **2** in d_3 -MeCN/D₂O 3:1. Analyse erfolgte anhand der Signale des angularen Protons bei 3,21 und 2,72 ppm

Die Auswertung der kinetischen Daten, die aus den Integralen der ¹H-NMR-Spektren berechnet wurden, ergibt eine Reaktion pseudo-erster Ordnung, wie sie typisch für eine Solvolyse ist.

Vergleicht man die chromatographischen und spektroskopischen Daten der synthetischen Dicarbonsäure von Palasonin **25** mit denen der wasserlöslichen Form des Palasonins, die man aus den Samen von *Butea frondosa* isolieren kann, so decken sich beide. Das bedeutet, daß in dem Extrakt kein Konjugat vorliegt, sondern das Palasonin in seiner offenen Form als Dicarbonsäure vorhanden ist. Bestätigt wird dies durch eine schon früher ermittelte Größe des Palasoninkonjugates, die mittels geeichter Größenausschlußchromatographie auf etwa 200 g/mol bestimmt wurde [80].

Daraufhin stellt sich die Frage, warum diese im Extrakt nicht durch Reaktion mit Diazomethan nachgewiesen werden kann? Denkbar ist eine Maskierung der Dicarbonsäure durch zweiwertige Kationen, wie z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} , oder aber auch das Vorliegen salzartiger Strukturen der Carboxylatgruppen mit ein- oder zweiwertigen Kationen. Auch dieses Problem konnte mit Hilfe des synthetischen Standards gelöst werden. Es wurde eine Variante der Veresterung mit Diazomethan entwickelt, die eine direkte Umsetzung der Dicarbonsäuren in wässriger Lösung ermöglicht. In den folgenden Abbildungen ist die Umsetzung von jeweils 30 μl einer wässrigen Stammlösung der Dicarbonsäure **25** von Palasonin mit Diazomethan gezeigt. GC-Lauf A zeigt die organische Phase nach der Reaktion mit CH_2N_2 . Chromatogram B zeigt den organischen Extrakt der wässrigen Phase der Diazomethanumsetzung nach saurer Aufarbeitung (1 N HCl, 100° C, 30 Min.). In beiden ist der mittlere Peak bei einer Retentionszeit von 6,45 min Cantharidin **1**, das als interner Standard hinzugegeben wurde. Bei $R_t = 5,75$ min eluiert Palasonin als Anhydrid und bei $R_t = 7,18$ min das Produkt der Veresterung.

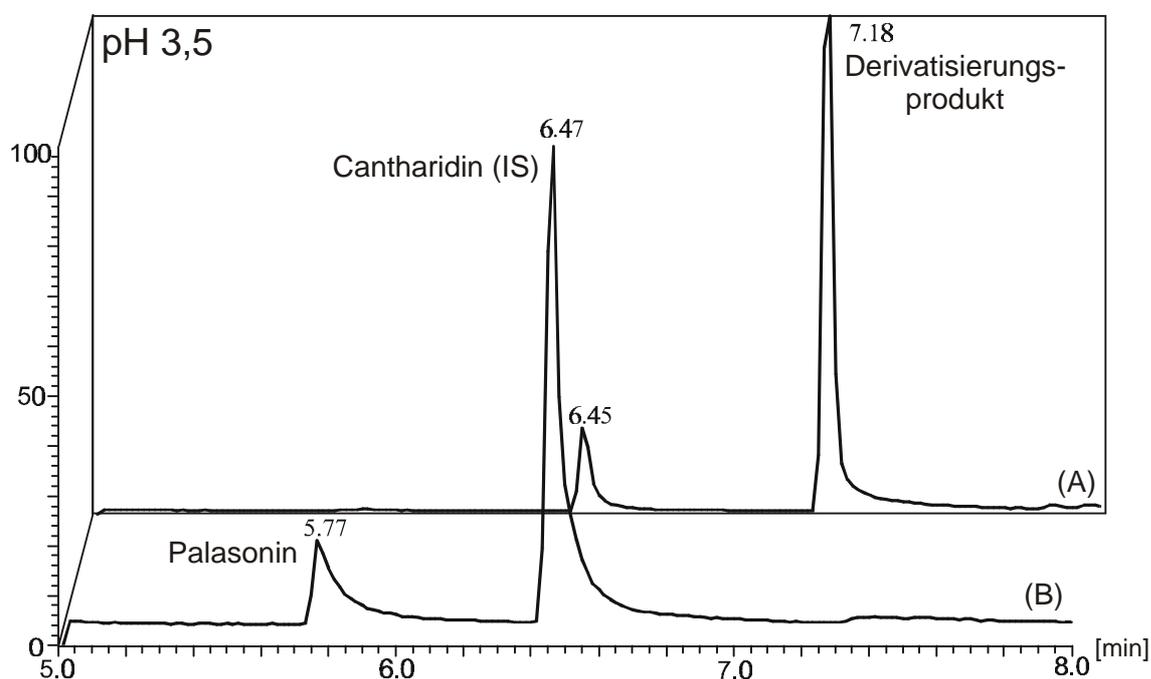


Abbildung 3-10 Derivatisierung des hydrophilen Präkursor von Palasonin mit CH_2N_2 bei $\text{pH} = 3,5$

Diese Substanz hat ein charakteristisches EI-Massenspektrum, welches in Abbildung 3-11 gezeigt ist. Die Summenformel des erwarteten Dimethylesters **26** ergibt ein Molekulargewicht von 228 Da; ein Ion der entsprechenden Masse wird jedoch nicht detektiert. Auch das $[M+H]^+$ -Ion mit $m/z = 229$ ist praktisch nicht vorhanden. Die intensivsten Peaks lassen sich jedoch durch typische Fragmentierungen von Methylestern erklären. So entsteht der Basispeak mit $m/z = 197$ durch Abspaltung von Methanol aus dem $[M+H]^+$ -Ion. Dieses Fragment kann decarboxylieren, woraus sich der Peak der Masse 169 ergibt. Läuft der gleiche Prozeß an der zweiten Estergruppe ab, ergeben sich Fragmente der Massen 137 und 109.

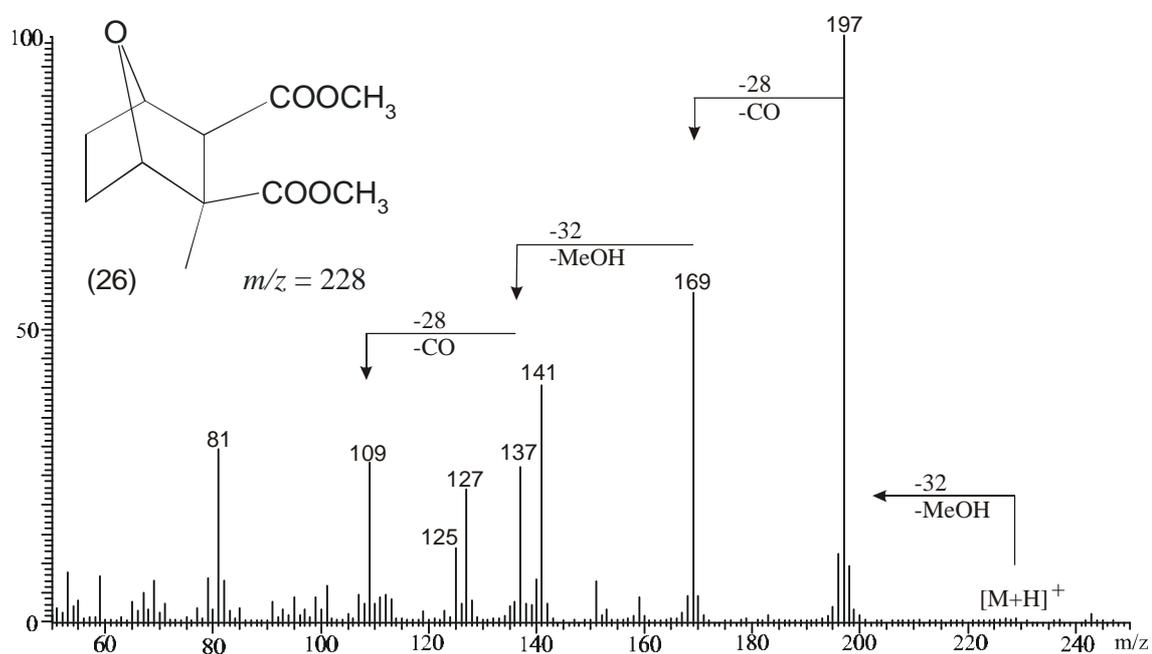


Abbildung 3-11 EI-Massenspektrum des Derivatisierungsprodukt von Palasonindisäure mit CH_2N_2

Das Molekülion, bzw. das $[M+H]^+$ -Ion des Dimethylesters **26** kann mit Hilfe der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI), eine Ionisationsmethode der LC-MS, erfasst werden, und es war sogar möglich, die exakte Masse zu bestimmen. Diese zeigt eine ausreichende Übereinstimmung ($-0,5$ mDa, bzw. $-2,2$ ppm) mit der kalkulierten Masse für die Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_5$.

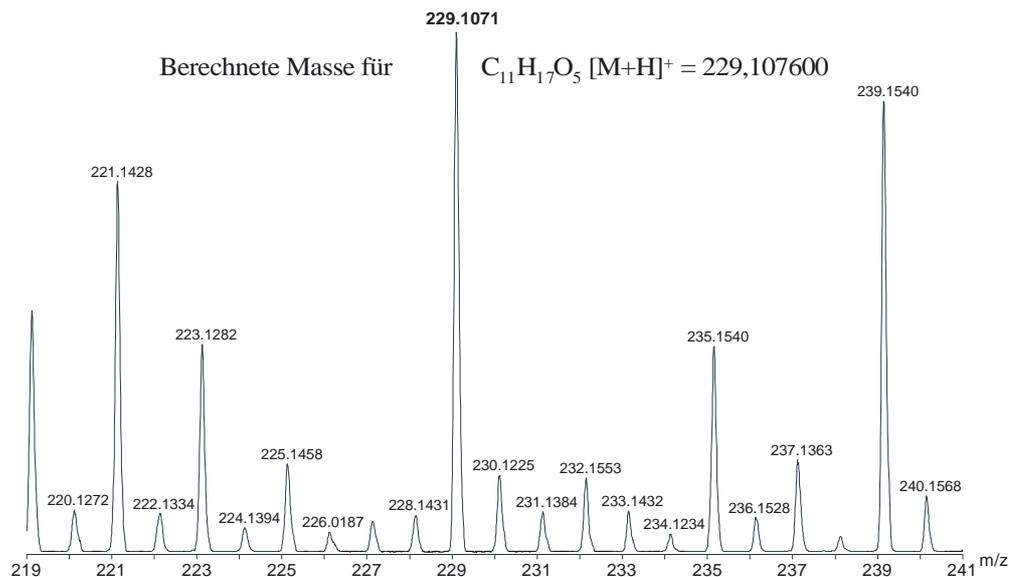


Abbildung 3-12 APCI-MS des Dimethylesters **26** mit höherer Auflösung

Somit handelt es sich bei dem Reaktionsprodukt tatsächlich um den Dimethylester **26** der Dicarbonsäure **25**, die als hydrophiler Präkursor von Palasonin anzusehen ist. Die Struktur von **26** konnte durch NMR-Untersuchungen bestätigt werden.

Verdünnt man die wässrige Stammlösung der Dicarbonsäure **25** von Palasonin anstelle mit deionisiertem Wasser mit einer Lösung von verschiedenen Salzen, so findet keine Veresterung mit Diazomethan statt.

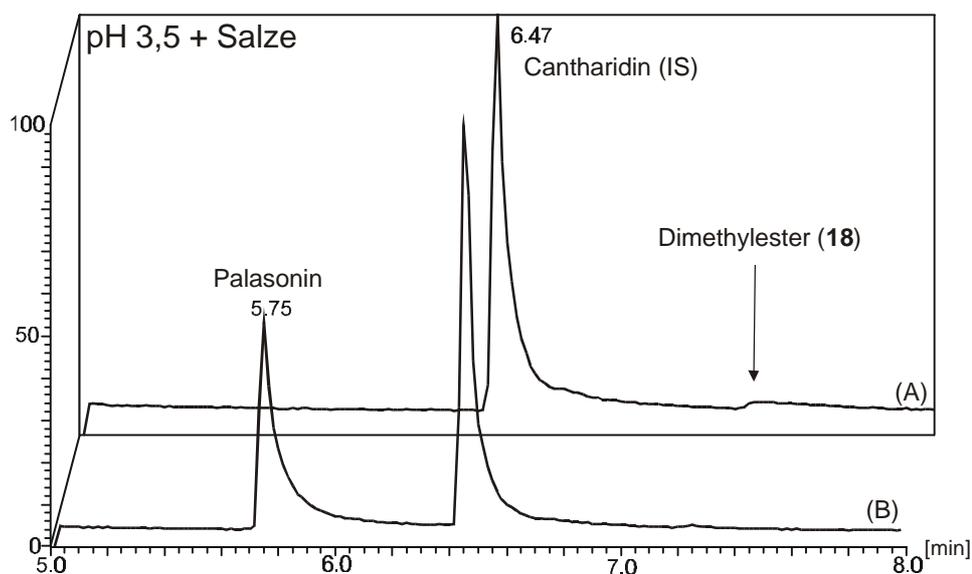


Abbildung 3-13 Derivatisierung der Dicarbonsäure von Palasonin **25** mit CH_2N_2 bei $pH = 3,5$ in Anwesenheit von ein- und zweiwertigen Kationen; A: org. Phase nach CH_2N_2 -Veresterung, B: saure Dehydratisierung des wässrigen Überstandes

Protoniert man aber die Dicarbonsäure **25** vollständig, indem man den pH-Wert mit verdünnter Salzsäure auf 0 bis 1 einstellt, so findet mit Diazomethan wiederum eine nahezu vollständige Veresterung statt.

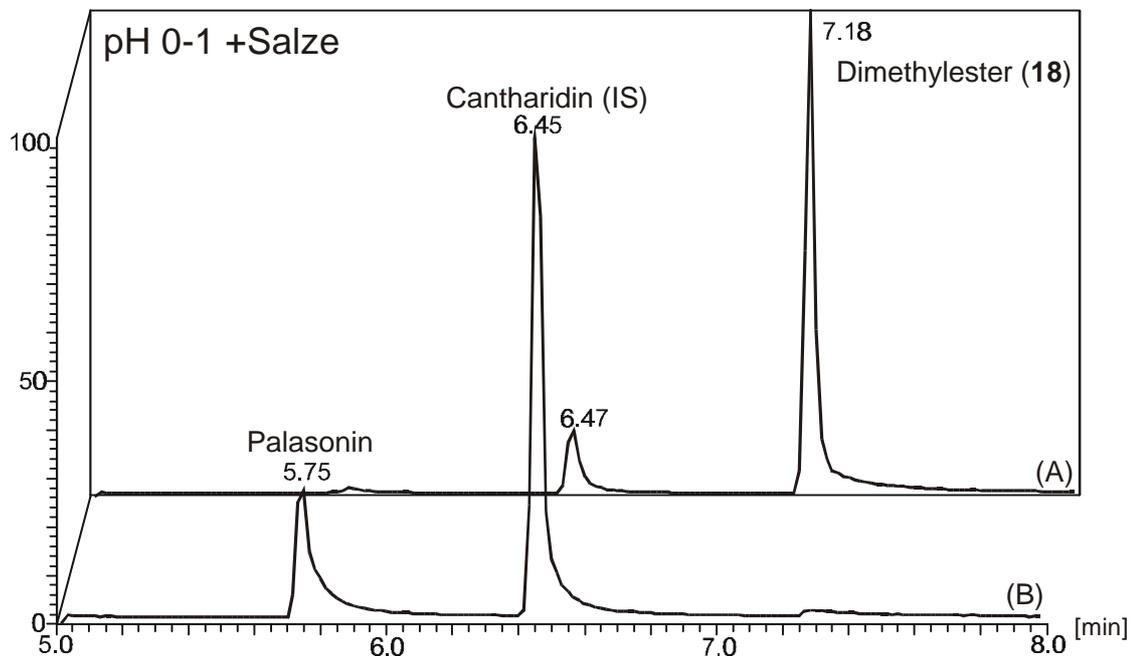


Abbildung 3-14 Derivatisierung der Dicarbonsäure von Palasonin **25** mit CH_2N_2 bei $\text{pH} = 0-1$ in Anwesenheit von ein- und zweiwertigen Kationen; A: org. Phase der CH_2N_2 -Veresterung, B: saure Dehydratisierung des wässrigen Überstandes

Diese Beobachtung läßt sich durch das Vorliegen salzartiger Bindungen zwischen den Carboxylatgruppen der Dicarbonsäure **25** und den Kationen erklären. Diese verhindern eine Reaktion mit Diazomethan, bzw. des Methylkations, das durch Säureaktivierung aus dem Diazomethan als reaktive Spezies entsteht. Es gibt viele Beispiele für das Auftreten von Komplexen des 7-Oxa-bicyclo[2.2.1]heptan-2,3-dicarbonsäure-Typs, der aufgrund seiner festen räumlichen Struktur einen dreizähligen Chelatbildner (über beide Carboxylgruppen und den Ethersauerstoff, vgl. Abbildung 1-5) darstellt [49-52]. Säuert man die Lösung an, werden die Carboxylatgruppen protoniert und die Komplexbindung wird wesentlich schwächer. Dann kann Diazomethan mit der freien Dicarbonsäure in der Lösung reagieren. Aus diesen Beobachtungen erklärt sich, warum der getrocknete *Butea*-Extrakt (vgl. S. 26) nicht derivatisiert werden konnte und es konnte eine allg. Arbeitsvorschrift für die Veresterung von Dicarbonsäuren des Palasonin-Typs mit Diazomethan erarbeitet werden (Seite 95). Hierzu wird die wässrige Probe mit Methanol verdünnt und der pH-Wert mit verdünnter Salzsäure auf 0 bis 1

eingestellt. Zu dieser Lösung gibt man solange eine etherische Lösung Diazomethan, bis dieses nicht mehr spontan abreagiert. Durch das Verdünnen mit Methanol erreicht man eine bessere Durchmischung der wässrigen Probe mit der etherischen Lösung.

Vergleicht man wiederum die Derivatisierungsprodukte der synthetischen Dicarbonsäure **25** von Palasonin mit denen des aufgereinigten Naturstoffs, z.B. nach der Größenausschlußchromatographie oder, wie in Abbildung 3-15 dargestellt, nach der Anionenaustauschchromatographie, so findet man, daß die synthetische Disäure und der hydrophile Präkursor des Palasonins aus den Samen identische Retentionszeiten besitzen. Beide lassen sich nach der zuvor beschriebenen Methode zum Dimethylester **26** umsetzen, womit die Identität der natürlichen und synthetischen Palasonindicarbonsäure weiter untermauert wird.

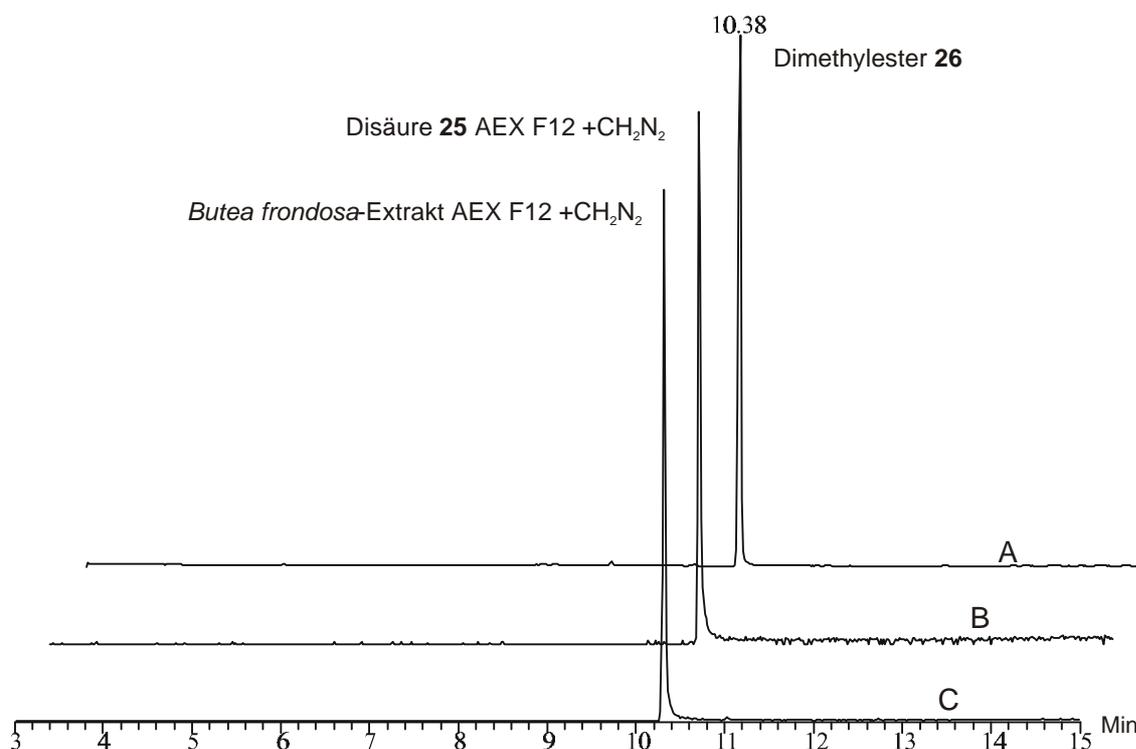


Abbildung 3-15 Gaschromatographischer Vergleich der Derivatisierungsprodukte der Disäure **25** von Palasonin (A); Anionenaustauschchromatographie der Disäure **25** von Palasonin (B); Anionenaustauschchromatographie des Extrakts aus *Butea frondosa* (C)

Schließlich sollte ausgeschlossen werden, daß doch ein Konjugat vorliegen könnte, das im Zuge der Aufarbeitung zerfällt, oder unter Umständen sogar in einer schnellen Reaktion enzymatisch gespalten wird. Mit Hilfe der Diazomethan-Methode sind wir in der Lage, die Dicarbonsäure **25** des Palasonins ohne lange Aufreinigung direkt nachzuweisen. Um eine enzymatische Reaktion zu minimieren, wurde möglichst zügig gearbeitet. Eventuell vorhandene Enzymaktivitäten wurden durch Hitzefällung, Trizol LS oder organische Lösungsmittel (z.B. Chloroform) deaktiviert. In allen Fällen konnte die Dicarbonsäure als die wasserlösliche Vorstufe des Palasonins direkt aus dem Rohextrakt als Dimethylester **26** nachgewiesen werden.

Auch das Cantharidin, das zum größten Teil in der wasserlöslichen Form aus Oedemeriden extrahiert wird und erst nach saurer Aufarbeitung als Anhydrid in organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform) aufgenommen werden kann, liegt nicht als Konjugat, sondern als Dicarbonsäure vor. Diese verhält sich in der Aufreinigung ähnlich der Disäure **25** von Palasonin, und auch die chromatographischen Eigenschaften sind vergleichbar. In Abbildung 3-16 ist ein Lauf der Anionenaustauschchromatographie gezeigt, der unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde wie der zuvor gezeigte Lauf mit dem *Butea*-Extrakt (Abbildung 3-3).

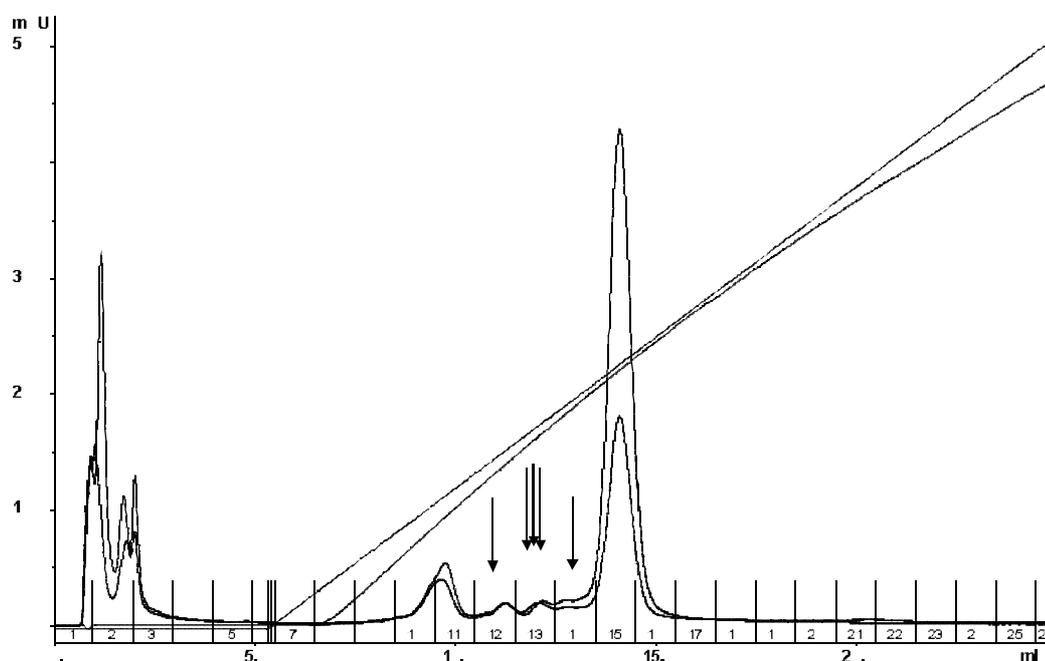


Abbildung 3-16 Anionenaustauschchromatographie eines wässrigen Oedemeriden-Extrakts an Resource Q 2 ml; Detektion bei 215, 254 und 280 nm, sowie der Konduktivität

Im Vergleich zur Dicarbonsäure von Palasonin **25** eluiert die Dicarbonsäure von Cantharidin aus *O. flavipes* erst bei einer Erhöhung der Salzkonzentration auf etwa 350 mM in Fraktion 13. In den Fraktionen 12 und 14 sind nur geringere Mengen enthalten, während die übrigen Fraktionen frei von Cantharidin sind.

Die Retentionszeit der Dicarbonsäure von Cantharidin aus *O. flavipes* bei der Größenausschlußchromatographie ist entsprechend der Analogien nahezu identisch mit der der Dicarbonsäure **25** von Palasonin. Cantharidin wird nach der üblichen Aufarbeitung (1 N HCl, 30 min, 110° C) lediglich in Fraktion 10 nachgewiesen.

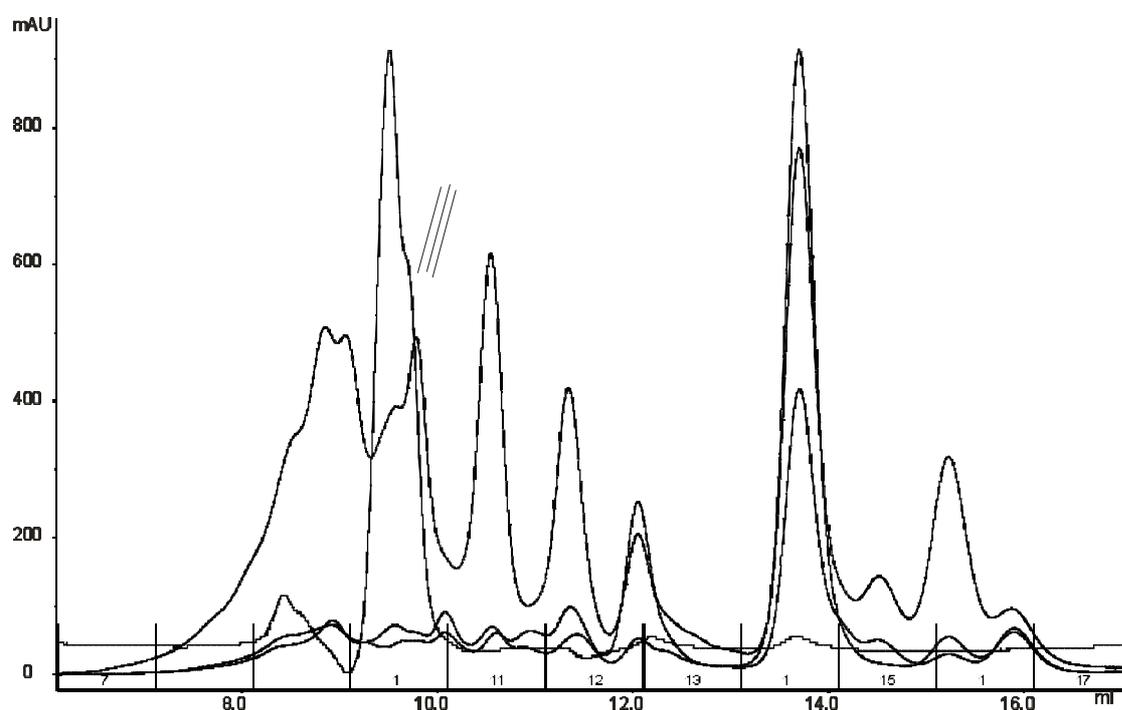


Abbildung 3-17 Größenausschlußchromatographie eines wässrigen Oedemeriden-Extrakts an Superdex Peptide PE 7,5/300; Detektion bei 190 und 215 nm, Leitfähigkeit

Zusätzlich wurde das chromatographische Verhalten durch Koinjektion des Oedemeriden-Extrakts mit der synthetischen Disäure des Cantharidins verglichen. Diese eluiert mit dem Naturstoff und verhält sich auch in einer gekoppelten Chromatographie aus Anionenaustausch- und Größenausschlußchromatographie ganz analog.

Bei der LC-MS erhält man von diesen Fraktionen, sowohl im Negativ-, wie auch im Positiv-Ionenmodus die erwarteten Massenspektren mit einem Shift von 14 Masseneinheiten. Diese Differenz entspricht der im Vergleich zu Palasonin zusätzlichen Methylgruppe.

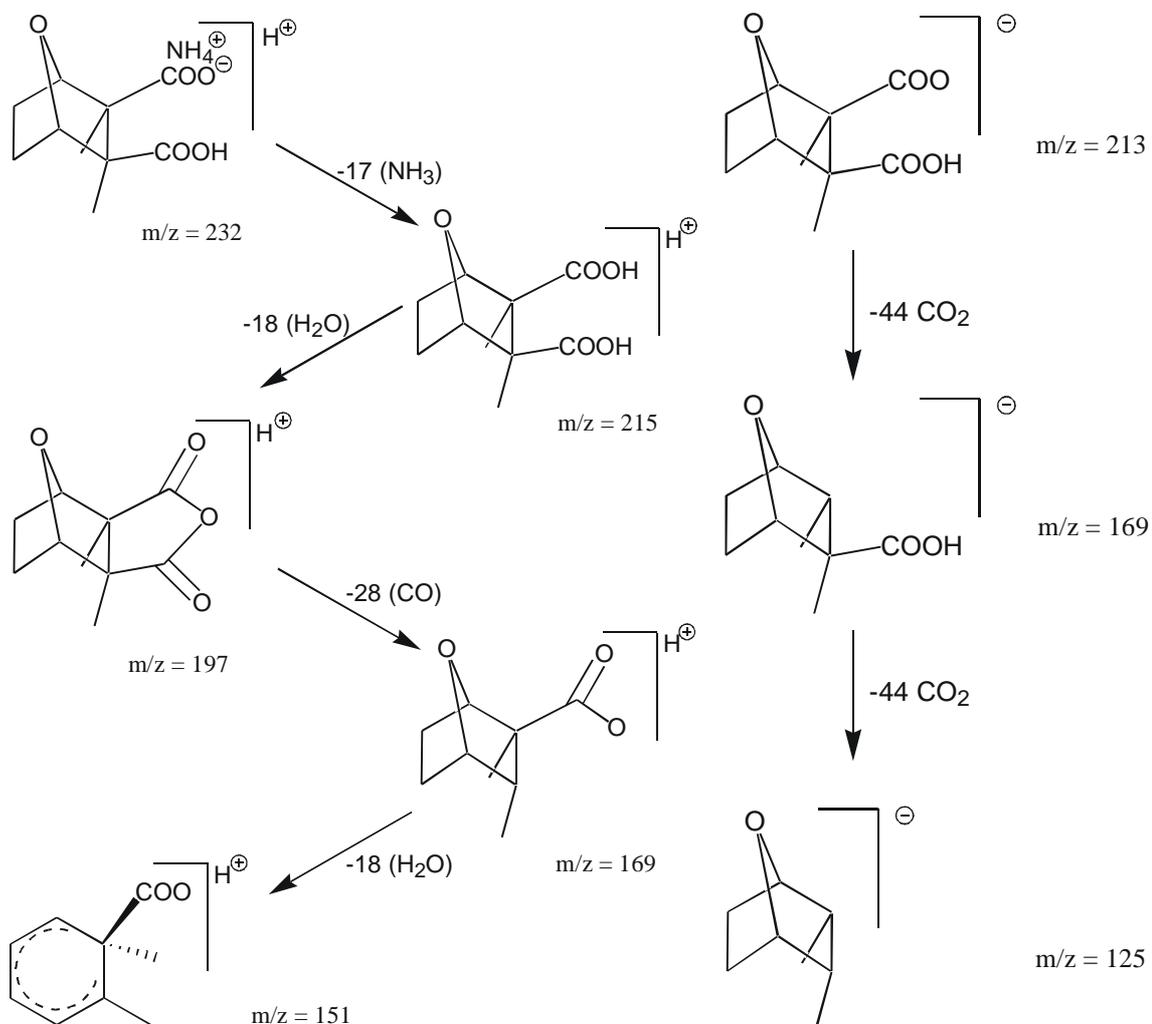


Abbildung 3-18 Fragmentierungsschema der Dicarbonsäure des Cantharidins im Positiv- und Negativionenmodus im LC/MS. APCI und MS^n

Auch der direkte Nachweis durch Derivatisierung mit Diazomethan bestätigt die Aussage. Hier wurde gezeigt, daß sich der Käfer-Extrakt genau so verhält wie die synthetische Referenz aus alkalisch hydrolysiertem Cantharidin. Im Unterschied zu Palasonin ergibt sich mit Diazomethan jedoch keine vollständige Veresterung, sondern ein Teil der Dicarbonsäure von Cantharidin reagiert direkt zum Anhydrid. Dieses wird neben dem Diester durch Chloroform extrahiert. In einer anschließenden sauren

Aufarbeitung kann kein weiteres Cantharidin freigesetzt werden, d.h., daß nach dem Derivatisierungsschritt kein weiteres gebundenes Cantharidin vorliegt.

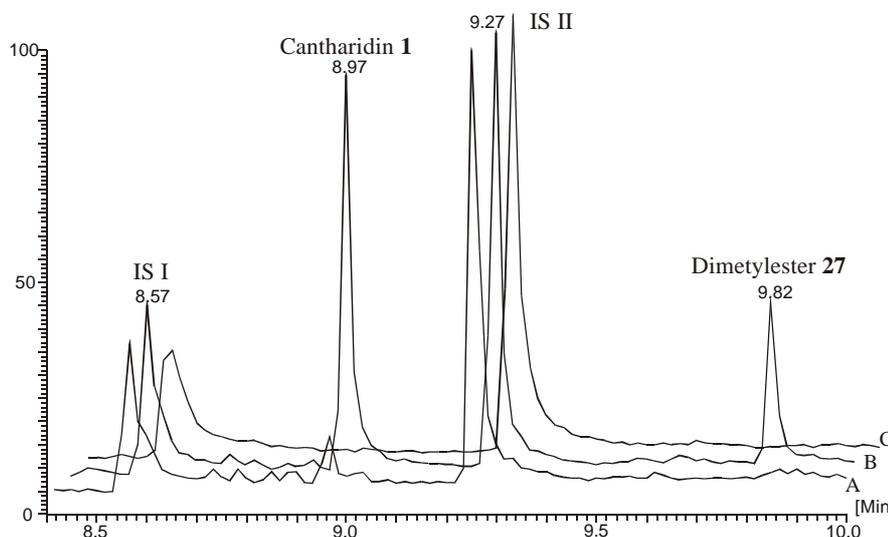


Abbildung 3-19 Derivatisierung der Cantharidindicarbonsäure aus *O. flavipes* mit CH_2N_2
 A: Dichlormethan-Extrakt des alkalisch wässrigen Oedemeriden-Extrakt IS = int. Standard
 B: Dichlormethan-Extrakt nach Derivatisierung mit CH_2N_2 bei pH 0 – 1
 C: Dichlormethan-Extrakt der wässrigen Reaktionslösung nach Aufarbeitung im Säuren

Das Massenspektrum des Reaktionsprodukt bei $R_t = 9,82$ min zeigt die entsprechenden Analogien zum Palasonindimethylester **26**. Das Molekülion und das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion sind nicht zu sehen. Basispeaks sind die Fragmente der Masse 211 und 183, die durch Fragmentierung an der Esterfunktion nach Verlust von Methanol und Kohlenstoffmonoxid entstehen.

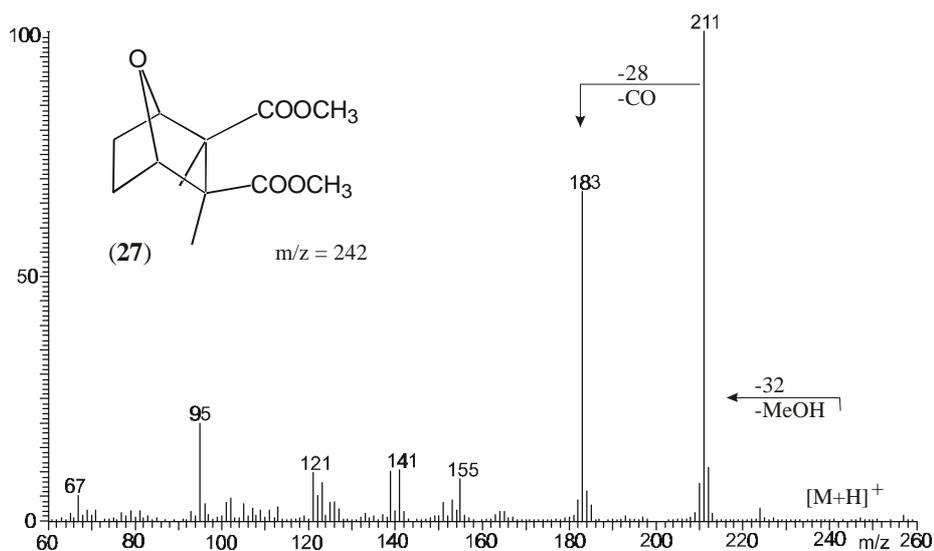


Abbildung 3-20 EI-MS des Derivatisierungsprodukts der Disäure von Cantharidin mit Diazomethan

Daß es neben der Veresterung auch zur Bildung des Anhydrids kommt ist verständlich, da Cantharidin nicht bereits im Neutralen, sondern erst im Alkalischen zum Dicarboxylat umgesetzt werden kann. D. h., das Hydrolysegleichgewicht liegt im Vergleich zu Palasonin mehr auf der Seite des Anhydrids. Endothal **5** als Desmethylanalogon liegt praktisch nur in der offenen Form als Dicarbonsäure vor. Das entsprechende Anhydrid, 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-2,3-*exo*-dicarbonsäureanhydrid **14**, ist sehr hydrophil und wird bereits durch Luftfeuchtigkeit hydrolysiert. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der Ringspannung des cyclischen Anhydridsystems, die in der Reihe Cantharidin **1** < Palasonin **2** < **14** zunimmt. Dies zeigt sich in der Zunahme der Wellenzahlen für die CO-Valenzschwingungen der Anhydride, die experimentell durch GC/IR bestimmt wurden:

Tabelle 3-1 GC-IR-Daten der CO-Valenzschwingungen der homologen Anhydride (Spektren s. Anhang)

	Anhydrid 14	Palasonin 2	Cantharidin 1
C=O _{asym.} [cm ⁻¹]	1804,5	1802,8	1796,9
C=O _{sym.} [cm ⁻¹]	1883,1	1872,1	1859,5

Den gleichen Gang zeigen auch die Daten, die mit Hilfe von Gaussian 98 (Gaussian Inc.) *ab-initio* berechnet wurden. Neben den IR-Frequenzen wurden auf diese Weise auch die geometrischen Verhältnisse der drei homologen Verbindungen bestimmt, und die Unterschiede in den Bindungslängen der C-C-, C-O- und der C=O-Bindung des Anhydrids, sowie dem *exo*-Winkel (α) und dem Ringspannungswinkel (β) ausgewertet.

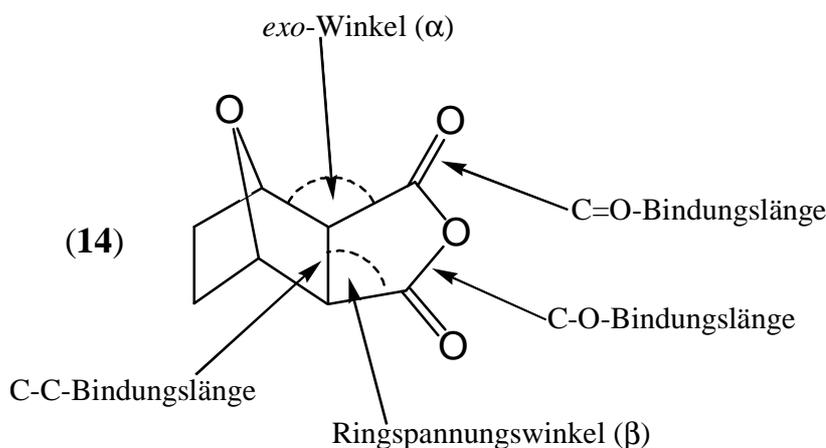


Abbildung 3-21 Geometrische Parameter des 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-2,3-*exo*-dicarbonsäureanhydrids **14**

Für Palasonin wird zusätzlich zwischen der Seite, die die Methylgruppe trägt, und der Seite mit dem angularen Proton unterschieden. Zum Vergleich sind die berechneten Werte für die drei untersuchten Anhydrid-Systeme tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 3-2 mit Gaussian 98 ab initio-berechnete Moleküldaten der cyclischen Anhydride des 7-Oxa-[2.2.1]-bicycloheptan-Typs

	Anhydrid	Palasonin (2)		Cantharidin
	(14)	H	CH ₃	(1)
C-O [pm]	138,8	138,8	138,6	138,4
C=O [pm]	119,6	119,7	119,7	119,8
C-C [pm]	154,3	155,0		156,5
(α) [°]	111,7	111,3	108,1	107,3
(β) [°]	104,3	104,9	102,9	103,6
C=O _{asym.} [cm ⁻¹]	1873,9	1868,8		1861,3
C=O _{sym.} [cm ⁻¹]	1943,2	1938,0		1932,1

Die Bindungslängen der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen in den verschiedenen Anhydriden sind nahezu konstant. Die C-C-Bindung hingegen wird mit zunehmender Zahl der Methylsubstituenten um 2,2 pm länger. Bei den Winkeln ist der Ringspannungswinkel (β) in allen drei Molekülen praktisch identisch, während der *exo*-Winkel (α) durch eine Methylsubstitution deutlicher kleiner wird. Dies zeigt sich besonders anschaulich im Palasonin, dessen beide Seiten sich um 3,2° unterscheiden, und das gesamte Molekül somit in sich leicht verdreht (getwistet) ist.

Diese Daten zeigen, daß die beiden angularen Methylsubstituenten einen großen Einfluß auf das Hydrolysegleichgewicht besitzen. Zum Einen wird die C-C-Bindung aufgrund des +I-Effektes verlängert und die Ringspannung herabgesetzt, so daß der Energiegewinn durch Öffnen des Anhydrids nicht mehr so groß ist. Zum Anderen üben sie aufgrund ihrer van-der-Waals-Radien einen deutlichen sterischen Effekt aus, der sich zweifach bemerkbar macht. Erstens bewirken sie eine Verringerung des *exo*-Winkels (α), und zweitens schirmen sie die untere Seite sterisch ab, so daß ein nucleophiler Angriff von H₂O auf die Carbonylfunktion „von oben“ und „von unten“ erschwert wird.

3.2 Enantiomerentrennung von Palasonin

Als Naturstoff war Palasonin **2** bisher nur aus einer Pflanze, *Butea frondosa*, bekannt. DETTNER und SEIDL fanden es auch in Käfern der Art *Hycleus lunata*, die zu den Cantharidinproduzenten gehören und der Gattung der Meloidae zuzurechnen ist [77].

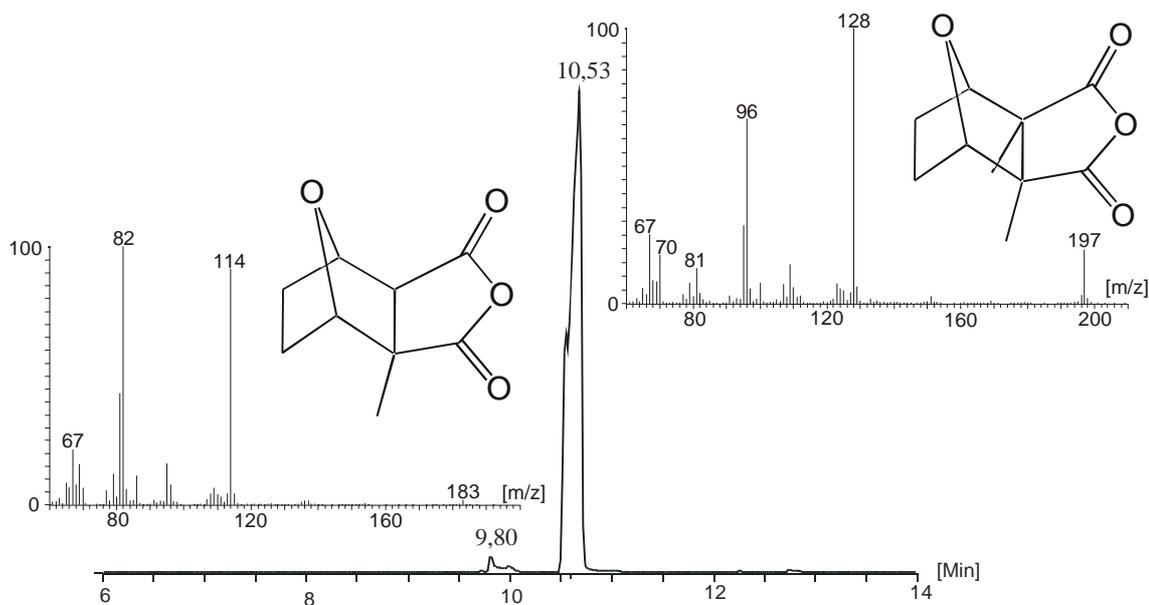


Abbildung 3-22 Nachweis von Cantharidin **1** und Palasonin **2** im Extrakt von *Hycleus lunata* mittels GC/MS

Die Hauptkomponente des Extraktes eines *Hycleus*-Weibchens, die bei 10,53 min im Gaschromatogramm eluiert, ist das Cantharidin **1**, welches an seinem charakteristischen Massenspektrum erkannt werden kann. Zuvor, mit einer Retentionszeit von 9,80 min, eluiert eine Verbindung, die ebenfalls aufgrund ihres charakteristischen Massenspektrums und zusätzlich durch Vergleich mit einem Standard als Palasonin **2** bestimmt werden konnte.

Über die Biogenese des Palasonins gibt es noch keine Erkenntnisse. Die strukturelle und chemische Ähnlichkeit zum Cantharidin legt die Vermutung nahe, daß beide Verbindungen über einen ähnlichen Weg biosynthetisch dargestellt werden. Auch die Existenz beider Stoffe in einem Organismus deutet darauf hin. Für den Aufbau zweier Verbindungen mit demselben Grundgerüst besitzt dieser wahrscheinlich keine zwei unterschiedlichen Wege. Somit kann durch die Untersuchung beider Verbindungen die Gemeinsamkeiten ihrer Biosynthese geklärt werden. Ausgehend von diesen

Beobachtungen stellt sich die Frage wann und wie eine der beiden terminalen Methylgruppen entfernt wird und somit aus Farnesol **21** Palasonin **2** entsteht.

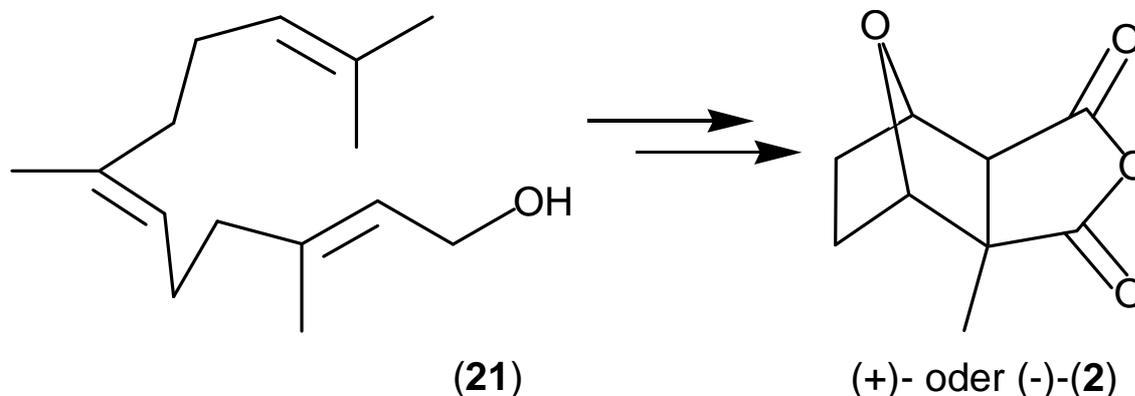


Abbildung 3-23 Vorschlag zur Biosynthese von (\pm)-Palasonin **2** aus Farnesol **21**

Aufgrund seiner asymmetrischen Struktur stellt das Palasonin **2** eine interessante Sonde dar, mit deren Hilfe die Faltung des Farnesols **21** zum symmetrischen Cantharidin **1** (vgl. Abbildung 1-13) untersucht werden kann. Ferner sollte verglichen werden, ob die Biogenese in der Pflanze und in den Insekten nach dem gleichen Mechanismus oder zumindest über ähnliche Zwischenstufen und / oder Reaktionsschritte erfolgt. Einen Hinweis zur Beantwortung dieser Fragen könnte die Enantiomerenverteilung des Palasonins in der Pflanze und in den Käfern geben.

Bestimmung der absoluten Konfiguration von Palasonin

Die relative Konfiguration von Palasonin **2** wurde durch NMR-Untersuchungen als ein *exo*-Anhydrid mit einer angularen Methylgruppe erkannt [6]. Da für diese Konstitution zwei Enantiomeren möglich sind, bemühte sich SCHMID um die Aufklärung der absoluten Konfiguration von Palasonin [11]. Dazu untersuchte er natürliches Material, das er aus Samen von *Butea frondosa* isolierte und dem er einen negativen Drehsinn für linear polarisiertes Licht der Natrium-D-Linie zuordnen konnte. Die Angaben schwanken von $[\alpha]_D = -2,1^\circ$ in Chloroform (ohne nähere Angaben) und $[\alpha]_D^{22} = -4^\circ \pm 5^\circ$ ($c = 0,104$; MeOH; aus ORD) [11]. Die optische Rotationsdispersion ergibt eine Plankurve, die von 235 nm mit $[\Phi] = -651^\circ$ zu größeren Wellenlängen bis 546 nm mit $[\Phi] = -3^\circ$ ansteigt. Der Circular dichroismus hat ein Extremum bei 212 nm mit $-0,76$ (keine Angaben der Einheiten), welches sich innerhalb von 24 Stunden auf $-1,35$ bei

211 nm verschiebt [11]. Aufgrund der Ergebnisse zur hydrolytischen Stabilität, welche in Kapitel 3.1 behandelt wurde, kann man jedoch vermuten, daß die Verschiebung der Maxima aus der Öffnung des Anhydridrings resultiert. Die langsame Reaktion über mehrere Stunden bis zu einem Tag deutet auf eine Hydrolyse durch Wasser aus nicht absolutiertem Methanol. Eine Methanolyse ist unwahrscheinlich, da diese in eigenen Versuchen nicht beobachtet werden konnte und der resultierende Dimethylester ein stabiles Produkt darstellt. Zur Ermittlung der absoluten Konfiguration wandte SCHMID die Methode nach HOREAU an [98]. Dies ist eine empirische Methode, die zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von sekundären Alkoholen entwickelt wurde ist. Sie nutzt bei der Reaktion eines Überschuß racemischen α -Phenylbuttersäureanhydrids mit 2°-Alkoholen des allgemeinen Typs mit $R_L > R_M \gg H$ die Beobachtung,

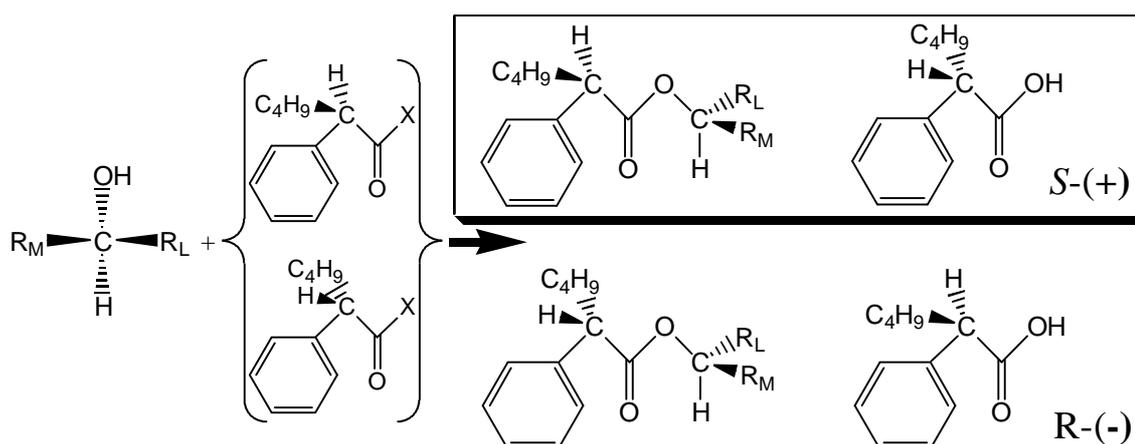


Abbildung 3-24 Prinzip der Methode nach Horeau, bei der aus 2°-Alkoholen des dargestellten Typs überwiegend die umrandeten Produkte entstehen. Von dem Drehsinn der entstandenen Phenylbuttersäure kann auf die Konfiguration des Alkohol zurückgeschlossen werden.

daß nach der Hydrolyse des nicht umgesetzten α -Phenylbuttersäureanhydrids überwiegend (+)-*S*-Phenylbuttersäure freigesetzt wird. Aus der Reaktion mit dem enantiomeren Alkohol ergibt sich überwiegend (-)-*R*-Phenylbuttersäure. Diese besitzt eine starke optische Rotation im untersuchten Bereich der Natrium-D-Linie. Der Drehsinn wird im Polarimeter bestimmt und auf die absolute Konfiguration des 2°-Alkohol zurückgeschlossen. Um das natürliche (-)-Palasonin in einen sekundären Alkohol zu überführen, schützte SCHMID zunächst die Anhydridfunktion als Imid durch Reaktion mit Anilin, woraus das cyclische Imid **28** entstand.

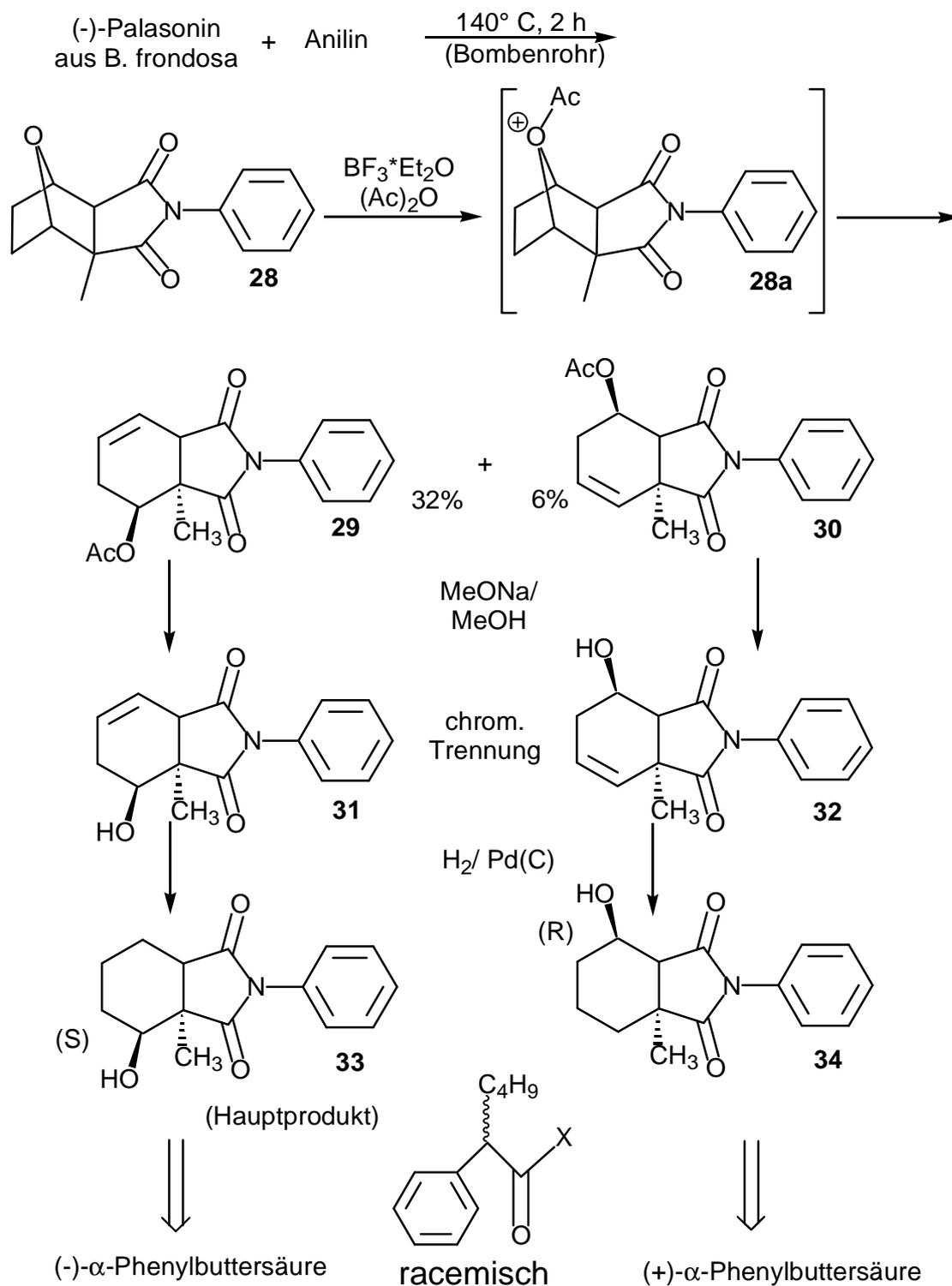


Abbildung 3-25 Bestimmung der abs. Konfiguration von (-)-Palasonin nach der Methode von Horeau

Die Spaltung der Etherbrücke erfolgte mit Hilfe der Lewis-Säure Bortrifluorid und Acetanhydrid. Nach dem allgemeinen Reaktionsmechanismus greift das Bortrifluorid nicht den Ethersauerstoff an, sondern in einer zuvor ablaufenden Reaktion entsteht aus Acetanhydrid und der Lewis-Säure ein Acylium-Ion und ein Acetat-Ion.



Es ist dann das Acylium-Ion, das als Elektrophil mit dem Ethersauerstoff reagiert, und das intermediäre Produkt **28a** entstehen läßt. Dieses kann mit einem Nucleophil (X^-) reagieren und den Ether (R-O-R) in R-X und R-O-Ac spalten, oder, wie in diesem Fall, Wasserstoff eliminieren [99]. Dabei fungiert das Acetat als Base und abstrahiert ein *endo*-ständiges Proton von einer Methylengruppe, so daß die Etherbindung in einer *anti*-Elimination, unter Bildung einer Doppelbindung, zu den Produkten **29** und **30** gespalten wird. Aufgrund der sterischen Hinderung durch die angulare Methylgruppe wird überwiegend das weiter entfernte H-Atom angegriffen und es entsteht bevorzugt das Spaltprodukt **29**. Ein Produkt mit einer Doppelbindung in Konjugation mit dem Anhydrid, das durch Abstraktion des angularen Wasserstoffatoms entstehen könnte, wird nicht beobachtet [11]. Im nächsten Schritt wurden die Ester **29** und **30** zu den Alkoholen **31** und **32** hydrolysiert, welche durch präparative DC getrennt wurden. Abschliessend wurden die Doppelbindungen katalytisch hydriert, woraus die sekundären Alkohole **33** und **34** resultierten. Die Konstitution und relative Konfiguration der beiden isomeren Produkte **33** und **34** wurde durch Entkopplungsexperimente im NMR bestimmt. Setzt man diese mit α -Phenylbuttersäureanhydrid um, so ergibt sich mit dem Hauptprodukt **33** überwiegend (-)-Phenylbuttersäure, woraus die *S*-Konfiguration für den Alkohol gefolgert werden muß. Dies bedeutet, daß die Etherspaltung des Hauptproduktes **33** in der dargestellten Richtung erfolgen muß und, wie dargestellt, im (-)-Palasonin die Methylgruppe ‚vorne‘ sitzt. Der konstitutionsisomere Alkohol **34** ergibt (+)-Phenylbuttersäure, was für eine *R*-Konfiguration des sekundären Alkohol spricht, die die Position der Methylgruppe im (-)-Palasonin bestätigt. Das (+)-Enantiomer des Palasonins ergäbe in beiden Fällen den enantiomeren Alkohol, der nach der HOREAU-Methode jeweils das andere Phenylbuttersäureenantiomer freisetzen sollte.

Diese indirekte Methode eignet sich nicht für die Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung natürlicher palasoninhaliger Käfer-Extrakte im Mikromaßstab. Zum Einen ist dies eine rein empirische Methode, die keine Aussage über die quantitative Zusammensetzung liefert. Zum Anderen stecken in der dargelegten Reaktionsequenz, zumal bei Anwesenheit eines Überschusses an Cantharidin, zu viele Fehlerquellen. Außerdem wird der absolute Gehalt an Palasonin in einer Probe nicht ausreichend sein für eine signifikante Änderung des Drehwertes durch Phenylbuttersäure.

Einfacher, schneller und genauer ist die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Palasonin in biologischen Proben mit Hilfe der Gaschromatographie an einer chiralen Phase. Mit Hilfe dieser können beide Enantiomere ohne weitere Aufarbeitung im Spurenbereich direkt nebeneinander quantifiziert werden.

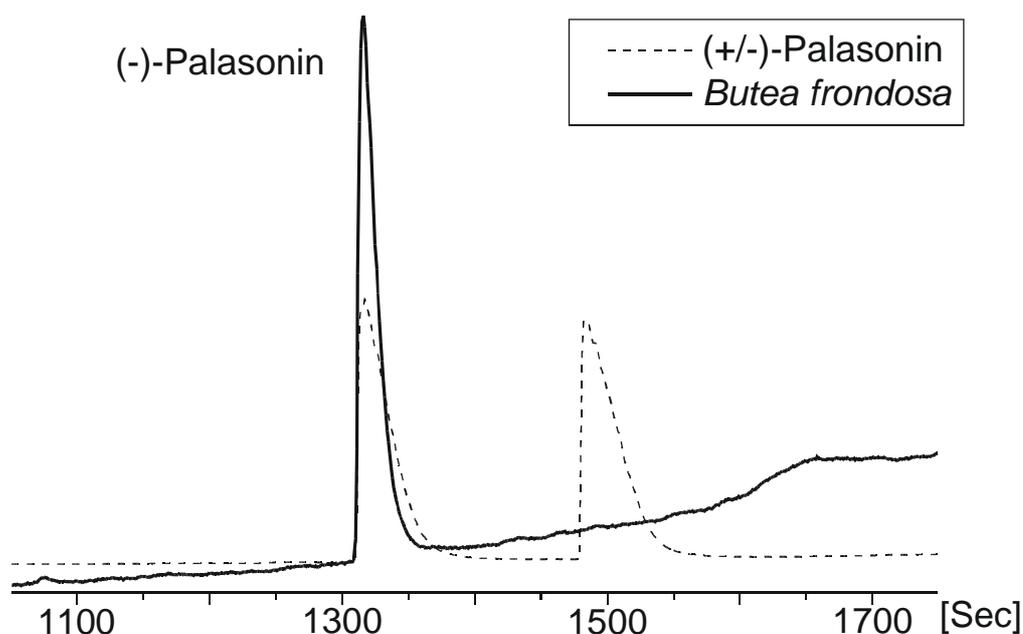


Abbildung 3-26 Gaschromatogram von synthetischem rac. Palasonin und (-)-Palasonin aus *B. frondosa* an einer chiralen Phase (Lipodex E, MN)

Untersucht man Palasonin aus dem Extrakt aus Samen von *Butea frondosa*, so stellt man fest, daß, im Rahmen der Messgenauigkeit, nur ein Enantiomer mit einem Enantiomerenüberschuß $> 99,5\%$ vorliegt. Im Chromatogram (Abbildung 3-26) ist dies zusammen mit einem racemischen Standard dargestellt. Dieser zeigt auch die sehr gute Trennleistung der verwendeten Säule, deren chirale Phase auf Cyclodextrinen basiert.

Im Vergleich mit den von SCHMID berichteten Drehwerten kann man jedem der beiden Signale eine absolute Konfiguration zuordnen. Da diese Zuordnung jedoch nur auf einer indirekten, empirischen Methode beruht, war es unser nächstes Ziel, die absolute Konfiguration durch eine Kristallstrukturanalyse zu untermauern. Eine Möglichkeit besteht in der Trennung der beiden Enantiomeren aus dem racemischen, synthetischen Palasonin. Dieser Ansatz hat den Vorteil, daß das synthetische Produkt in größerer Menge zugänglich ist und beide Konfigurationen nebeneinander bestimmt werden können. Eine erste Variante zur Trennung der beiden Enantiomeren wurde von DAUBEN 1996 beschrieben [97].

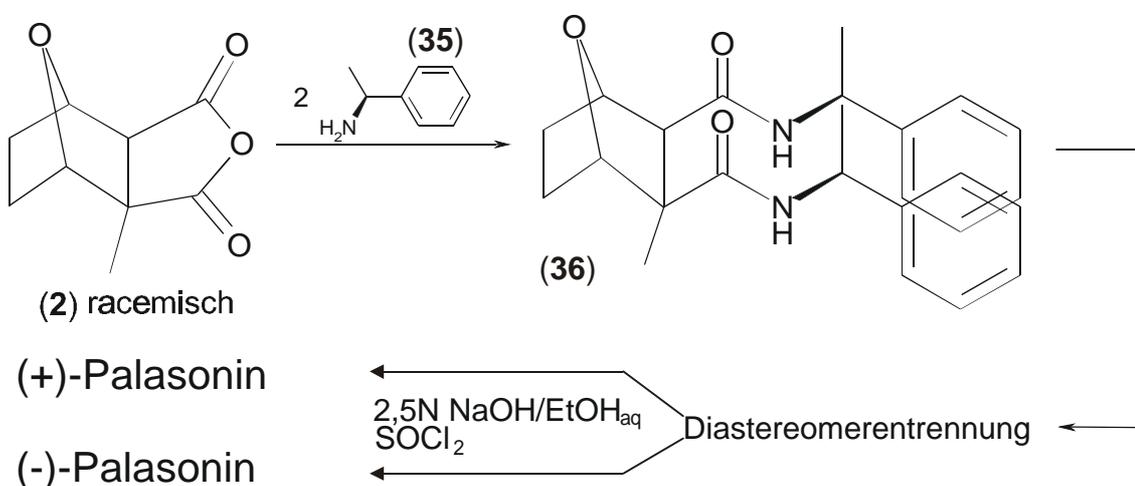


Abbildung 3-27 Racematenspaltung von synthetischem Palasonin **2** nach DAUBEN

Diese geht von racemischen Palasonin **2** aus, das uns nach Hochdruck-Synthese zur Verfügung stand (Abbildung 3-7). Dieses wird dann in einer zweistufigen Reaktion mit *S*-(-)- α -Phenylethylamin **35** zu zwei diastereomeren Diamiden **36** umgesetzt, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Lösungseigenschaften getrennt werden können. Beide Diamide werden wiederum hydrolysiert und mittels Thionylchlorid in die enantiomerenreinen Anhydride überführt, deren Drehwerte auf $[\alpha]_D^{20} = -2,3^\circ$ ($c = 0,2$) bzw. $+2,2^\circ$ ($c = 0,3$) in Chloroform bestimmt wurden [97].

Diese Variante der Trennung beider Enantiomere über diastereomere Diamide ist jedoch nicht optimal. Ein Nachteil liegt darin, daß das entsprechende Imid das thermodynamische Produkt der Reaktion des Anhydrids mit dem primären Amin ist und das Diamid nur das kinetische Produkt darstellt. Dies erschwert den Zugang zum

Diamid, das für eine Diastereomerentrennung notwendig ist. Denn die Imide lassen sich, obwohl sie ebenfalls Diastereomere sind, nicht präparativ trennen. Hat man die Diamide entweder aufgrund ihrer unterschiedlichen Lösungseigenschaften, oder mittels HPLC an einer Normalphase getrennt, so entsteht bei der Hydrolyse wiederum das thermodynamisch stabilere Imid, welches unter den gewählten Bedingungen keine weitere Hydrolyse zum Dicarboxylat zuläßt. Der entscheidende Nachteil dieser Methode war jedoch, daß die Diamide keine brauchbaren Kristalle bildeten, sondern amorph ausfielen, womit die Bestimmung der absoluten Konfiguration mittels Kristallstrukturanalyse nicht möglich war.

Einfacher war der Weg über das (-)-Palasonin, das uns aus den Samen von *B. frondosa* in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Wie bereits eingangs erwähnt, konnten wir nachweisen, daß die Samen tatsächlich nur ein Enantiomer des Palasonins enthalten. Nach weiterer Aufreinigung kann dem von uns isolierten Naturstoff, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SCHMID, ein negativer Drehsinn zugeordnet werden, der nahe dem Literaturwert auf $[\alpha]_D^{20} = -2,2^\circ$ bestimmt wurde [11,97].

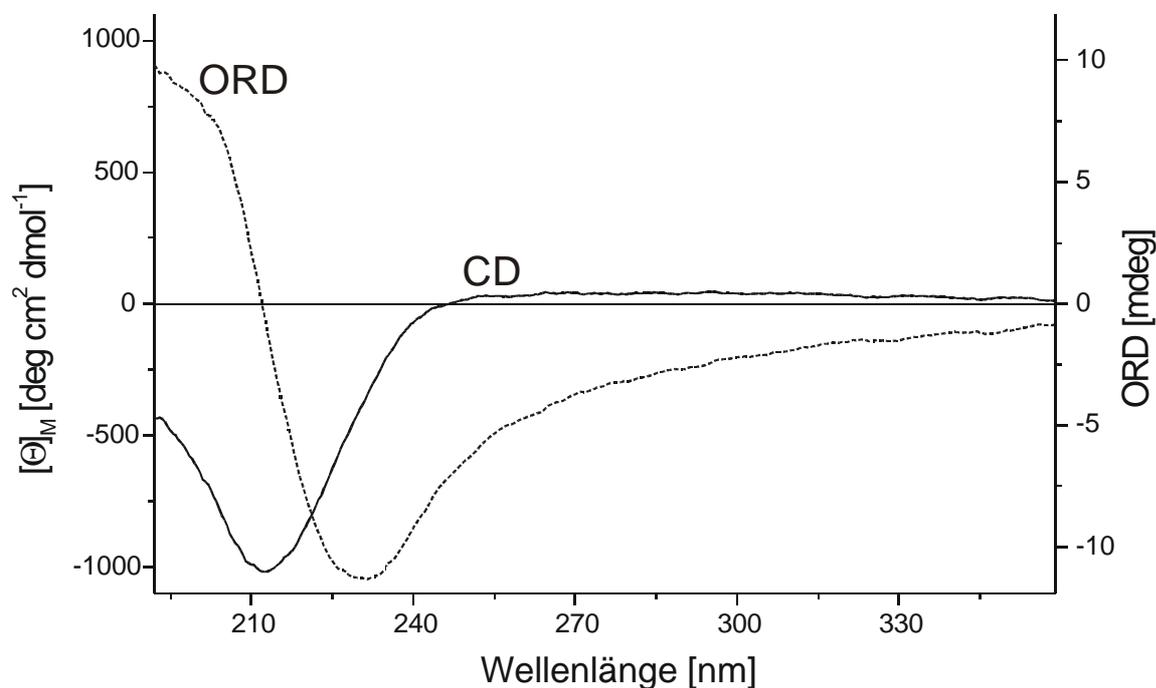


Abbildung 3-28 CD- und ORD-Kurve von (-)-Palasonin aus *B. frondosa* in Wasser (17mM)

Der Circular dichroismus (CD) in Wasser zeigt ein Extremum bei 212 nm mit einer molaren Elliptizität $[\Theta]_M$ von $-1020 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ bei RT. Bei der gleichen Wellenlänge hat die optische Rotationsdispersion (ORD) einen Nulldurchgang und besitzt ein Minimum bei 230 nm. Die 212 nm entsprechen der Wellenlänge des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Dicarbonsäure.

Da dieses enantiomerenreine Material nicht getrennt, und zur Bestimmung des Drehsinns auch nicht wieder hydrolysiert werden muß, kann man direkt das stabilere Imid-Derivat darstellen. Hierzu wurde das aufgereinigte (-)-Palasonin aus den Samen mit *S*-(-)- oder *R*-(+)-Phenylethylamin **35** umgesetzt. Die Reaktion gelingt durch einfaches Erhitzen der beiden Komponenten in einem geschlossenen Reaktionsgefäß auf 140°C für etwa 30 Min. in sehr guten Ausbeuten (> 80 %) [11,33,100]. Jedoch erhält man auch aus den diastereomerenreinen Imiden, trotz leichter chromatographischer Reinigung keine brauchbaren Kristalle.

Da die Kristallstrukturanalyse nur ein Bild der relativen Konfiguration eines Moleküls darstellt, ist ein bekanntes Stereozentrum in der zu untersuchenden Verbindung für die Aufklärung der absoluten Konfiguration erforderlich. Dieses kann bereits enthalten sein oder muß, wie in unserem Fall, durch das Derivatisierungsreagenz eingebracht werden. Von diesem kann dann auf unbekannte Asymmetriezentren zurückgeschlossen werden. Prinzipiell sind noch andere Möglichkeiten, etwa die anormale Streuung an einem Schweratom, z.B. Brom, durchführbar. Aus diesem Grund wurden auch Derivate des (-)-Palasonins mit ortho-, meta- und para-Brom-Anilin dargestellt. Dies geschah in einer analogen Reaktion, wie zuvor die Umsetzung mit den Phenylethylaminen **35**, ebenfalls in guten Ausbeuten (> 80%). Jedoch neigt auch keines der Bromanilide zur Bildung untersuchbarer Kristalle. Ein interessanter Aspekt beim Derivat **37** ist die eingeschränkte Drehbarkeit um die $N-C_{\text{arom.}}$ -Bindung aufgrund der ortho-Position des Broms.

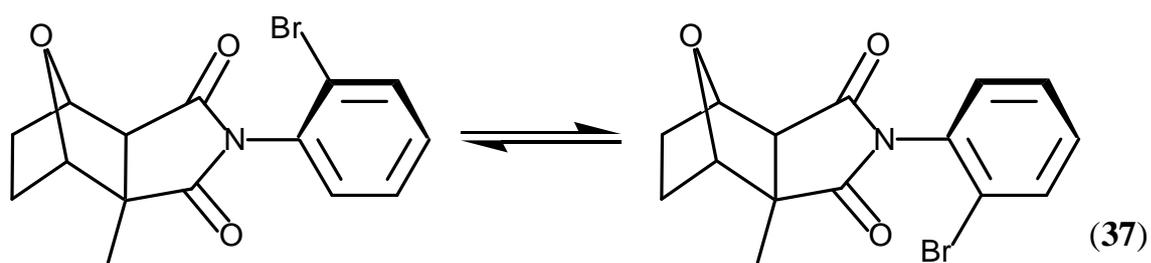


Abbildung 3-29 zwei Rotationskonformere des Derivats 37 von ortho-Brom-Anilin mit (-)-Palasonin

Diese beiden Rotationskonformere können mittels HPLC an einer Normalphase getrennt werden, zeigen jedoch ein einheitliches Signal im GC/MS. Sammelt man die Fraktionen der getrennten Konformere und injiziert diese nach 36 Stunden erneut, so stellt man fest, daß sich wiederum das Gleichgewicht aus beiden Konformeren eingestellt hat.

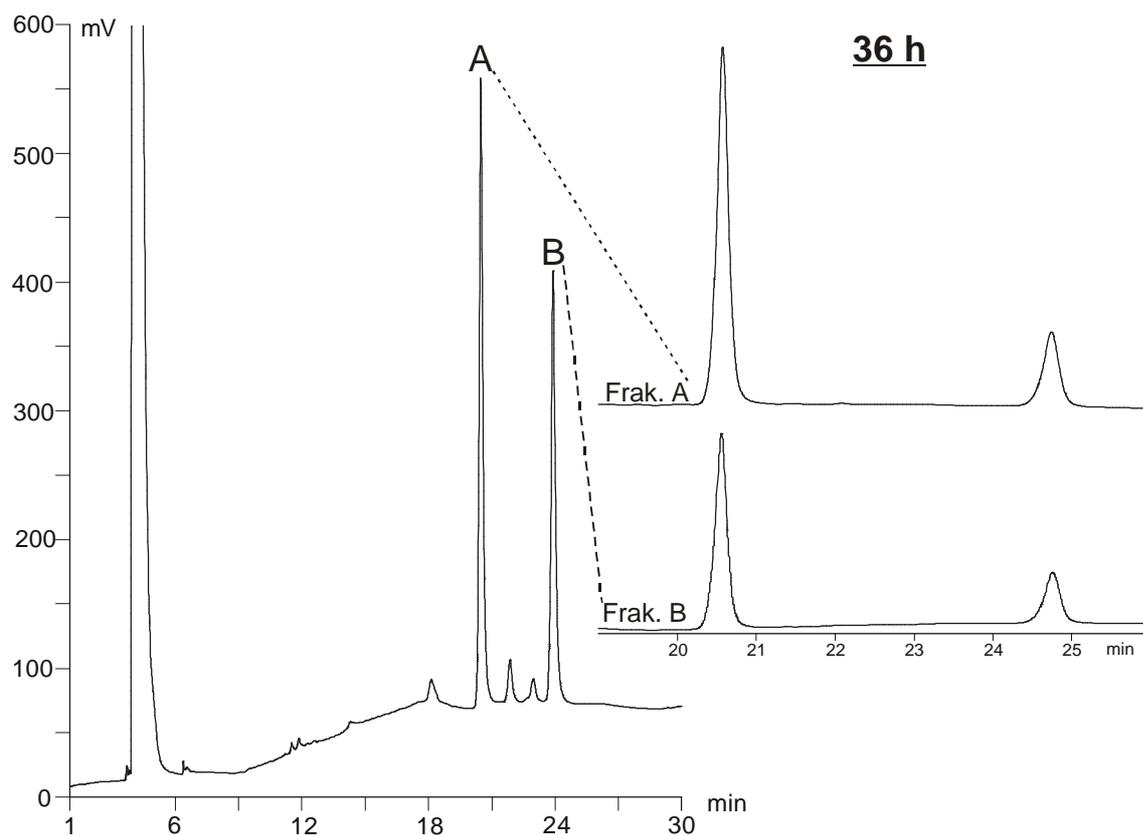


Abbildung 3-30 Trennung der beiden Rotationskonformeren von 37 mittels HPLC (Si60 50-5 250/4)
 (Peak A 19,50-21,75; Peak B 23,75-25,25);
 Einstellung des Gleichgewicht von beiden isomeren Formen aus beiden Konformeren nach 36 h

Um die Kristallisationseigenschaften der Derivate zu verbessern, wurde eine Nitro-Gruppe in *para*-Position von *S*-(-)- α -Phenylethylamin **35** eingeführt. Synthetisch zugänglich ist dies durch eine aromatische Nitrierung nach einem S_e -Mechanismus des enantiomerenreinen Aromaten, der zuvor durch Acetylierung geschützt wird.

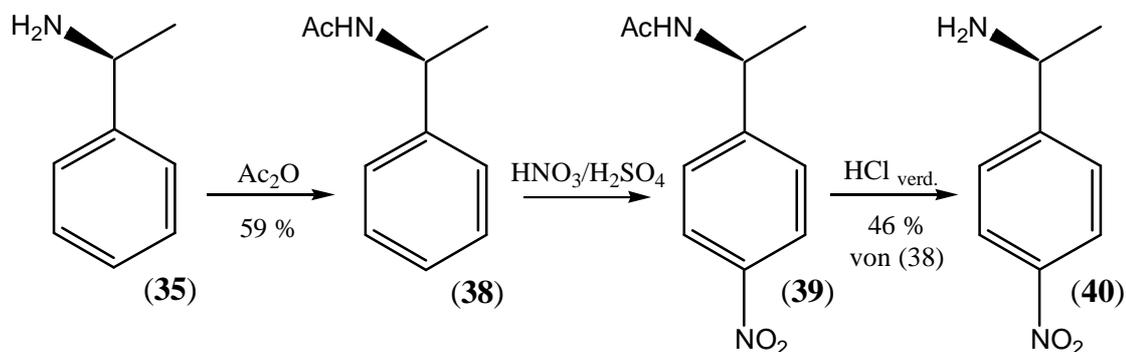


Abbildung 3-31 Nitrierung von *S*-(-)- α -Phenylethylamin **35**

Das modifizierte Amin **40** reagiert in der gleichen Weise mit dem teilweise aufgereinigten (-)-Palasonin aus den Samen von *B. frondosa* zum Imid **41**. Im Unterschied zu dem Phenylethylamin-Derivat kristallisiert dieses bereits beim Einengen der Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung.

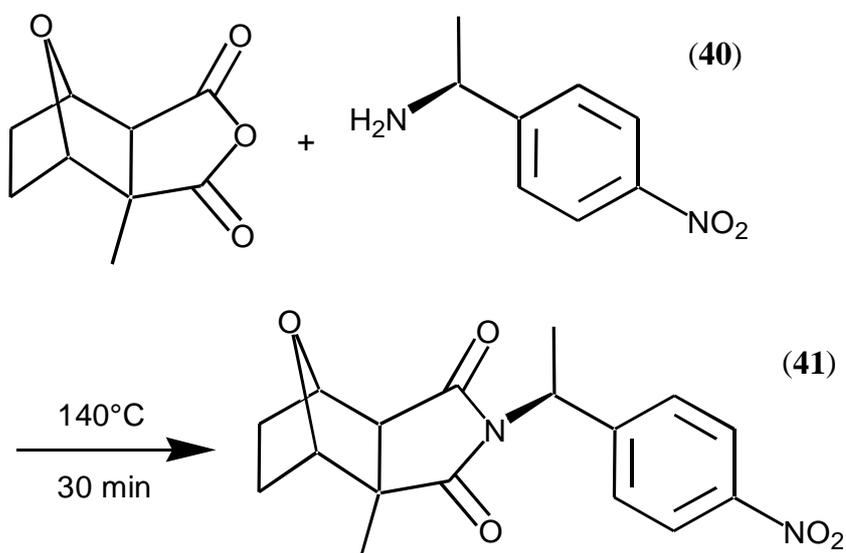


Abbildung 3-32 Synthese des (*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimids **41** von (-)-Palasonin

Dieses Ergebnis bestätigt den positiven Einfluß der Nitro-Gruppe auf die Kristallisationseigenschaften einer Verbindung.

In der folgenden Abbildung 3-33 ist die Kristallstruktur des (*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimids von (-)-Palasonin **41** gezeigt. Zur besseren Darstellung der Stereochemie ist das angulare Proton und das Wasserstoffatom am asymmetrischen C-Atom des *p*-Nitrophenylethylrests mit eingezeichnet. Es zeigt in der gewählten Darstellung nach hinten.

Die Röntgenbeugung ergab für diesen Kristall die monokline Raumgruppe $P2_1$ und für das natürliche (-)-Palasonin aus *B. frondosa* läßt sich aus dieser direkt die (*S*)-Konfiguration für das asymmetrische Kohlenstoffatom (*) mit dem angularen Proton ablesen.

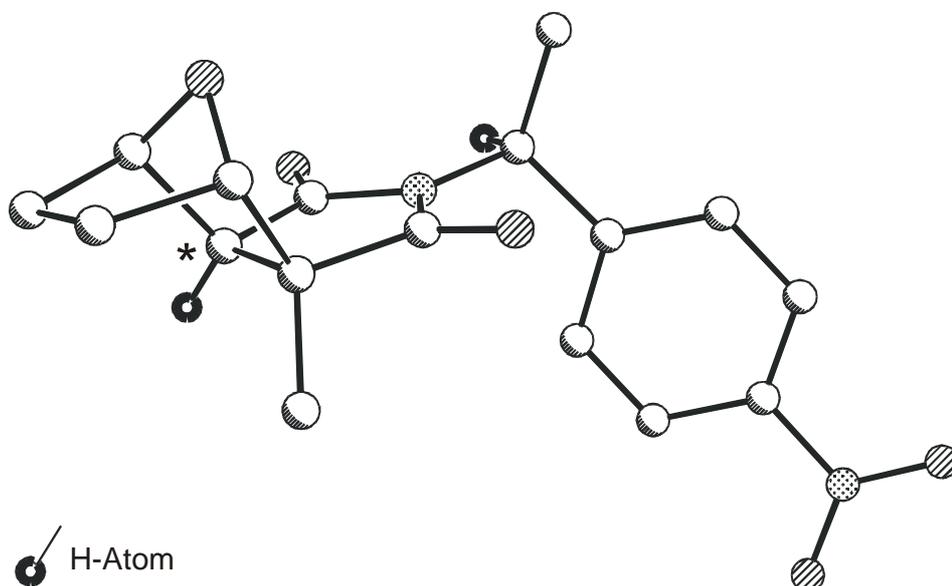


Abbildung 3-33 Kristallstruktur des (*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimids von (-)-Palasonin **41**; der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle H-Atome dargestellt

Alle Beobachtungen decken sich mit den Angaben aus der Literatur. Mit der Kristallstruktur des (-)-Enantiomeren aus Samen von *Butea frondosa* konnte die absolute Konfiguration von Palasonin erstmalig eindeutig bewiesen werden. Darüberhinaus steht mit der chiralen GC eine einfache, schnelle und sichere Methode zur Verfügung, beide Enantiomere zu trennen und die Enantiomerenverhältnisse in biologischen Proben zu bestimmen.

Enantiomerenverhältnisse von Palasonin in Käfern

Wie bereits am Anfang des Kapitels erwähnt, konnte Palasonin in mehreren Extrakten aus canthariphilen und cantharidinproduzierenden Käfern nachgewiesen werden. Alle Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. DETTNER in Bayreuth, nach einem vergleichbaren Schema, wie unter „Nachweis von Cantharidin und Palasonin“ auf Seite 95 beschrieben, isoliert.

Anders als bei dem praktisch enantiomerenreinen Palasonin der Pflanze lassen sich in Käfern stets beide Antipoden nachweisen. Allgemein zeigen alle Proben einen Trend zu einer höheren *R*-(+)-Konzentration von näherungsweise 2:3. Abbildung 3-34 zeigt ein typisches gaschromatographisches Profil einer palasoninhaltigen Probe aus Käfern an einer chiralen Phase.

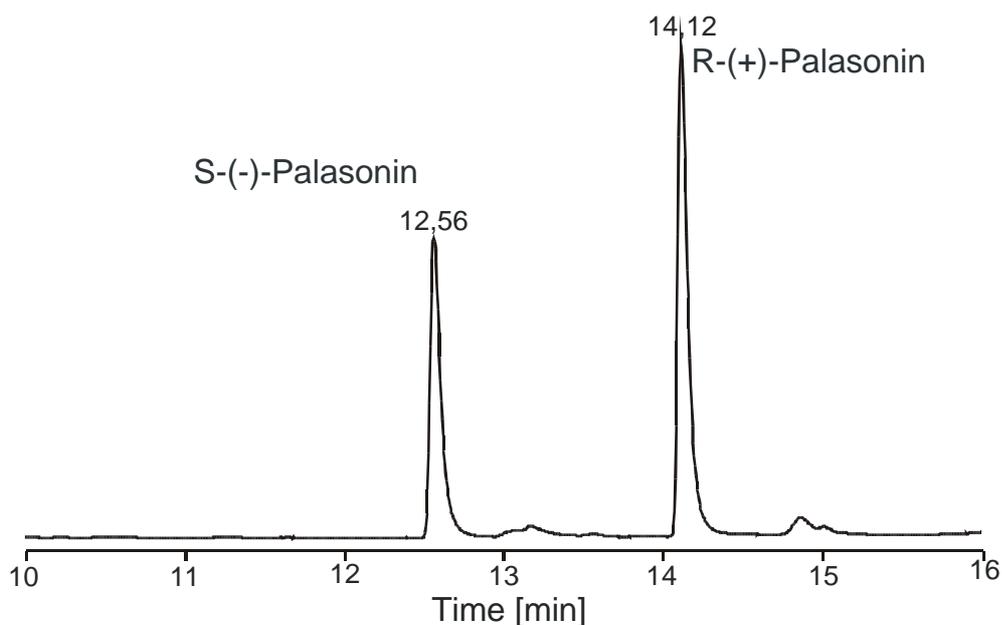


Abbildung 3-34 Gaschromatogramm eines palasoninhaltigen Extraktes von Eiern von *Hycleus spec.* an einer chiralen Phase (Lipodex E, 25 m x 0,25 µm, MN)

In der Tabelle sind die Daten aller Proben zusammengefasst und im Diagramm graphisch dargestellt.

Tabelle 3-3 Enantiomerenverhältnisse von Palasonin in verschiedenen biologischen Proben

	S-(-)-Palasonin	R-(+)-Palasonin	Standard-abweichung	Wdh.
<i>Butea frondosa</i>	99,8	0,2	0,3	4
(±)-Palasonin	49,3	50,7	1,0	4
<i>Mylabrini (Gen. Spec.)</i>	27,0	73,0	3,2	7
<i>Eusphalerum minutum</i>	41,3	58,7	1,7	9
<i>Hycleus spec.</i>	40,0	60,0	2,0	7
<i>Trichodes spec.</i>	51,2	48,8	4,0	5

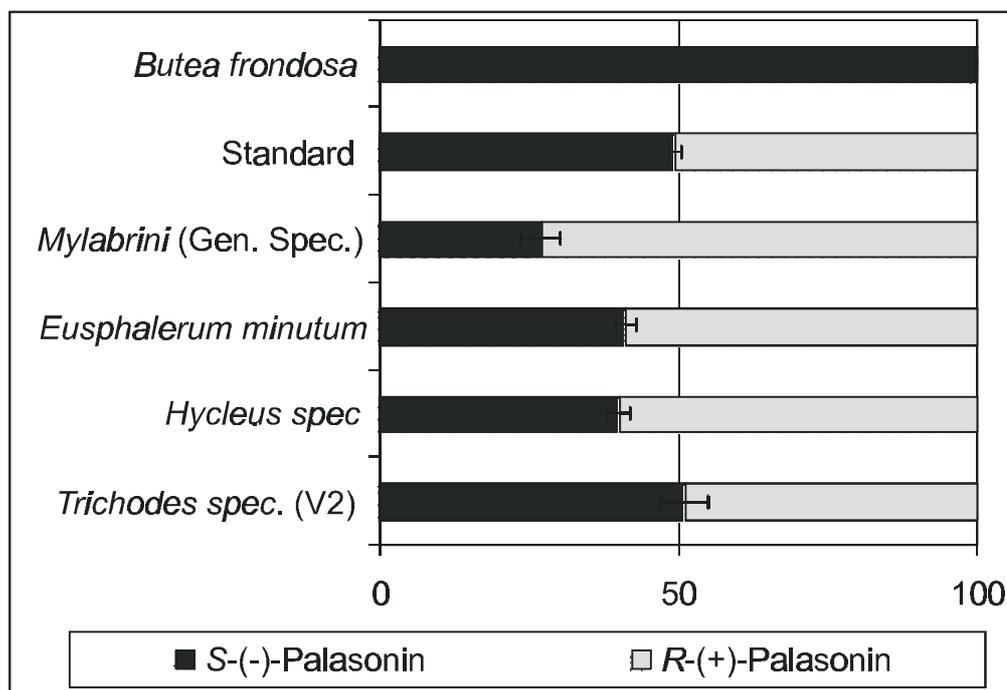


Abbildung 3-35 Graphische Darstellung der Enantiomerenverhältnisse von Palasonin

Ob und welche biologische Bedeutung das Palasonin **2** bei den Käfern hat, lässt sich zur Zeit noch nicht genau sagen. Vielleicht nützt den Käfern das Palasonin als Anthelmintikum, oder ganz allgemein als antimikrobielle Substanz [12]. Alle Käfer, von denen bekannt ist, daß sie Palasonin enthalten, zählen zu der Gruppe der Cantharidinproduzenten bzw. zu den Canthariphilen. Wie in der Einleitung angemerkt (vgl. S. 15), könnte sich die Wirkung des Cantharidins als chemische Verteidigung aufgrund der Canthariphilie vieler Insekten umgekehrt haben und sogar als Attraktans für Eiparasiten dienen. Palasonin ist zwar weniger toxisch, die Lockwirkung sollte aber aufgrund der fehlenden Methylgruppe ebenfalls herabgesetzt sein [76], so daß daraus insgesamt eine effektivere Verteidigung resultieren würde. Dies würde auch die Beobachtung von DETTNER erklären, der in den Eiern von Käfern der Gattung *Hycleus* fast ausschliesslich Palasonin **2** und kein Cantharidin **1** fand (mündl. Mitteilung).

Daß sowohl Palasonin als auch Cantharidin in verschiedenen Species von Canthariphilen und Produzenten nebeneinander nachgewiesen werden konnte, zeigt, daß beide Naturstoffe tatsächlich sehr eng biosynthetisch verwandt sind. Somit sollte auch ein ähnlicher Enzymapparat bei beiden Molekülen für die Cyclisierungs- und Oxidationsschritte verantwortlich sein. Die Unterschiede in der Enantiomerenverteilung von (+)- und (-)-Palasonin in der Pflanze und bei den Insekten deuten jedoch auf grundlegende Unterschiede in der Biosynthese hin.

Die Produktion nur eines, nämlich des *S*-(-)-Enantiomeren in *Butea frondosa* spricht für äußerst spezifische Cyclisierungs-, Oxidations- und Demethylierungsschritte des Farnesols **21**. Da Untersuchungen zur Biosynthese bisher nur mit dem biologisch und historisch bedeutenderen Cantharidin **1** gemacht wurden, läßt sich aufgrund der bereits erwähnten Spiegelebene im Molekül nicht entscheiden, welches Kohlenstoffatom des Farnesols im Cantharidin ‚vorne‘ bzw. ‚hinten‘ ist (vgl. Abbildung 1-13). Somit kann nicht direkt auf die Biosynthese des Palasonins zurückgeschlossen und entschieden werden, ob C3‘ oder eine der beiden endständigen Methylgruppen, C11‘ bzw. C12, des Farnesols entfernt werden. Kann man nachweisen, daß in der Biosynthese des Palasonin nur ein bestimmtes C-Atom vom Farnesol zusätzlich abgebaut wird und daraus nur ein Enantiomer entsteht, so bedeutet dies, daß die weiteren Cyclisierungsschritte in einer stereochemisch definierten Richtung ablaufen.

Es erscheint naheliegend, daß im Zuge der Biosynthese des *S*-(-)-Palasonins entweder das C11' oder das C12 des Farnesols entfernt wird. Daß beide Methylgruppen oxidiert werden können und in die Anhydridfunktion eingebaut werden können ist bekannt (siehe Einleitung S.16). Ein solches Malonsäure-Derivat kann relativ leicht decarboxylieren und man erhält eine ω -Norfarnesol-Carbonsäure. Bei einer solchen frühen, farnesolnahen Reaktion ist die Kontrolle über das Stereozentrum mit Sicherheit gegeben und die weiteren Schritte der Cyclisierung entsprechen der Darstellung der Biosynthese des Cantharidins.

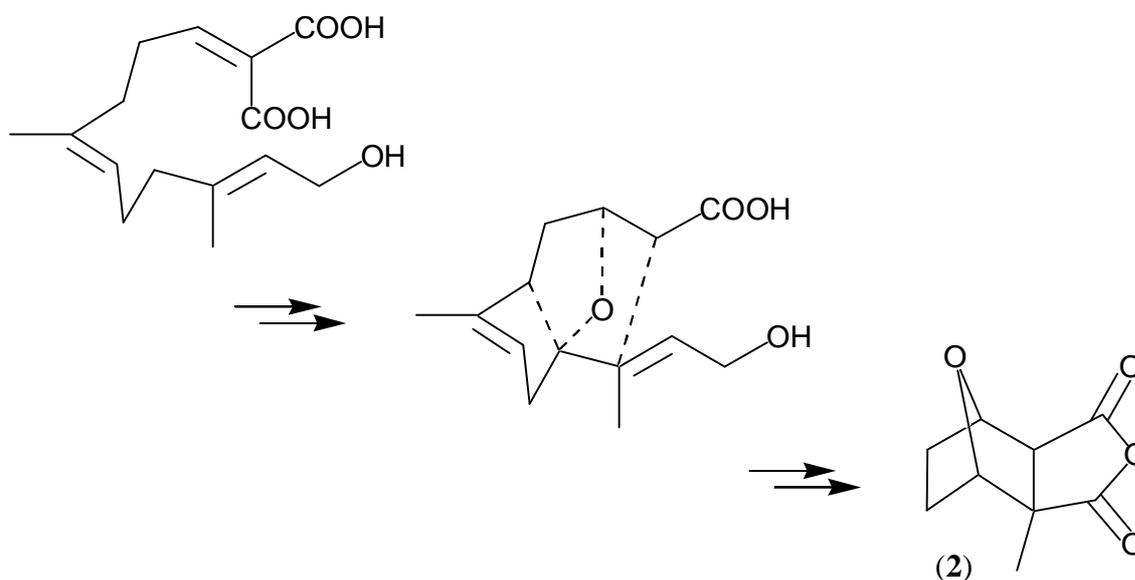


Abbildung 3-36 Vorschlag zur Biosynthese von *S*-(-)-Palasonin in *B. frondosa* über eine ω -Norfarnesolcarbonsäure

Für die Bildung annähernd racemischen Palasonins in den Insekten gibt es mehrere Möglichkeiten. Denkbar ist eine Demethylierung / Decarboxylierung auf einer späteren, cantharidinnahen Stufe mit geringer Stereospezifität. Da beide Methylgruppen im Cantharidin sehr nahe beieinander stehen, ist es bei einem wenig regioselektivem Enzym möglich, daß entweder die eine oder die andere Methylgruppe entfernt wird.

Wird jedoch, wie für die Pflanze postuliert, nur eine bestimmte Methylgruppe auf einer farnesolnahen Stufe abgebaut, so muß es in einem späteren Schritt der Cyclisierung zu einer Randomisierung kommen. Hierfür kommen mehrere Schritte in Betracht. Zum Einen ist bisher noch nicht bewiesen, daß die Cyclisierung in der bisher dargestellten Richtung abläuft, bzw. welcher Carboxyl-Kohlenstoff aus welchem Kohlenstoff des Farnesols stammt (C2 oder C11'/C12). Auch kann die Richtung, aus der der Ethersauerstoff eingeführt wird die weitere Stereochemie beeinflussen.

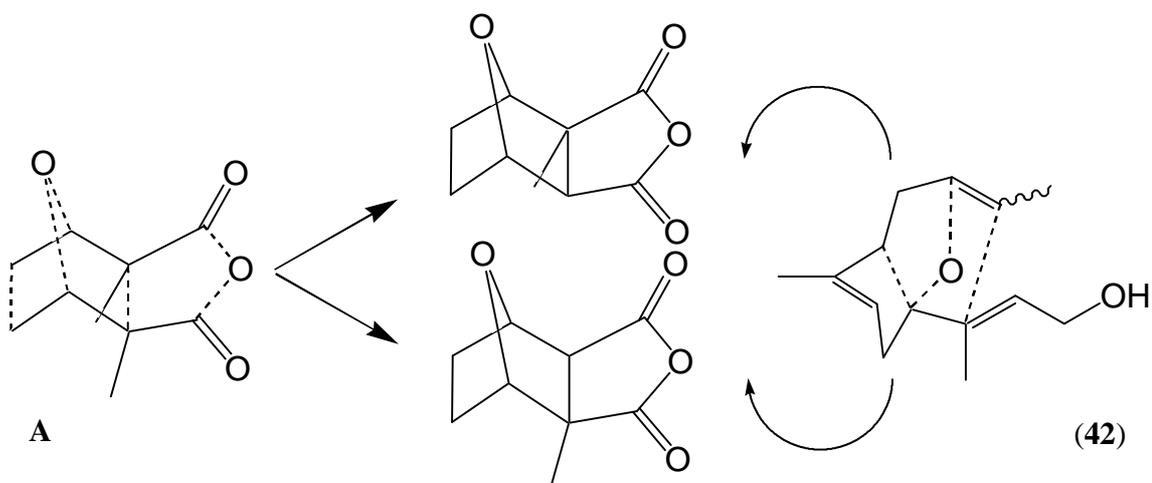


Abbildung 3-37 Alternative Biosyntheserouten von R-(+)- und S-(-)-Palasonin in den Insekten; Demethylierung einer cantharidinnahen Stufe A oder Randomisierung in den Cyclisierungs- und Oxidationsschritten aus Norfarnesol **42**

Die Aufklärung dieser Fragen ist auch für die Biosynthese des Cantharidins von entscheidender Bedeutung, da aus Farnesol **21** das symmetrische Cantharidin entsteht; dazu ist eine hochkontrollierte, nichtsymmetrische Anordnung des Substrats erforderlich. Diese kann man jedoch nur mit einer ebenfalls nichtsymmetrischen Sonde aufklären. Da bisher noch keine entsprechende Abbaureaktion oder asymmetrische Fragmentierung des Cantharidins im Massenspektrometer gefunden wurde, scheint Palasonin die beste Sonde darzustellen. Dabei sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar: Entweder man versucht die enantiomerenreine Biosynthese der *Butea*-Pflanze zu nutzen, oder man bestimmt die Enantiomeren des Palasonins, die aus synthetischen Norfarnesolverbindungen von Cantharidinproduzenten hergestellt werden.

3.3 Biosynthesestudien von Cantharidin mit Larven von *Oedemera femorata* und *Oedemera flavipes*

Um die Biosynthese des Cantharidins **1** genauer zu untersuchen, wurden Fütterungsversuche mit fünffach deuteriertem Mevalolacton **43** (MVA-d₅) an Larven verschiedener *Oedemera*-Species durchgeführt. Diese nehmen die markierte Vorstufe über die Nahrung auf und bauen sie im Rahmen der Terpenbiosynthese in das Cantharidin ein. Anhand der Zahl und der Position der eingebauten Markierungen können Rückschlüsse auf die unbekannt Schritte vom Farnesol **21** zum Cantharidin **1** gezogen werden. Die bisherigen Erkenntnisse von SCHMID et.al., sowie McCORMICK und CARREL, beruhen auf ähnlichen Experimenten an *Epicauta pestifera* und *Lytta vesicatoria*. Beides sind Käfer, die der Familie der Meloidae angehören. Diesen wurden verschiedene Farnesolvorstufen durch Spritzen der gelösten Substanzen in das Abdomen der adulten Käfer appliziert, oder die Käfer wurden in einer mit ¹⁸O angereicherten Sauerstoffatmosphäre gehalten. In dieser Arbeit sollte zum ersten Mal, durch den Einsatz möglichst hoch deuterierter Präkursoren, das Schicksal der Protonen genauer untersucht werden. Aus dem Verbleib individueller Wasserstoff- bzw. Deuteriumatome, oder ihrem Verlust könnte eine Aussage über die Oxidationsstufen an den markierten Positionen und somit über mögliche Intermediate getroffen werden. Die Oedemeriden wurden gewählt, da sie neben den Meloiden die einzigen bekannten Cantharidinproduzenten sind. Meloide sind in Mitteleuropa nur sehr selten. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Einbau von markierten Vorstufen durch adulte Oedemeriden nicht befriedigend ist [74]. Bei den Larven sollte dies besser sein, da sie in der Wachstumsphase eine höhere Stoffwechselrate haben. Die Verabreichung der markierten Vorstufe über die Nahrung ist die einzige Möglichkeit der Applikation, da die Oedemeriden, und erst recht ihre Larven, viel kleiner sind als die Meloiden und das Spritzen der Substanzen in das Abdomen die Tiere tötet.

Aus der Familie der *Oedemeridae* (Coleoptera, Polyphaga) sind etwa 600 Arten bekannt; die Imagines sind mittelgroß, schlank mit weichen, oft hinten klaffenden Flügeldecken; manche Arten sind metallisch grün oder blau und nicht unähnlich einem Bockkäfer. Charakteristisch sind die verdickten Hinterschenkel der Männchen [73].

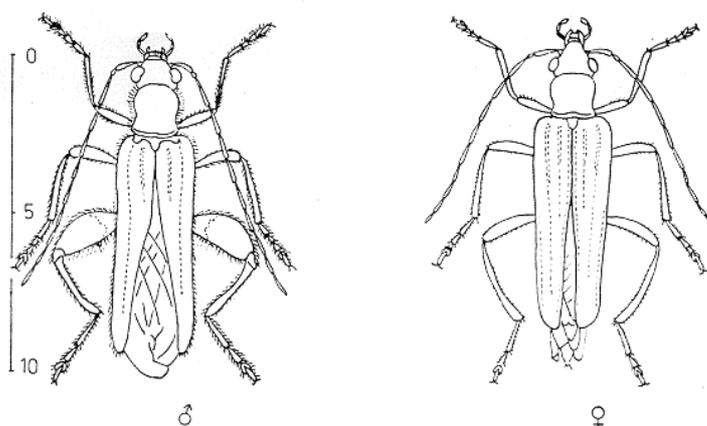


Abbildung 3-38 Männchen und Weibchen von *Oedemera femorata* [101]

Man findet sie meistens auf den Blüten krautiger Pflanzen, Sträucher oder Bäume, wo sie Pollen fressen. Die Larven kommen unter der Rinde, in modernem Holz oder in den Stengeln der oben beschriebenen Pflanzen vor [73]. Von der Entwicklung bis zur Puppe sind bisher sechs Larvenstadien bekannt, die über ein halbes Jahr dauern und im Labor nur sehr selten vollständig beobachtet werden. Die Frage der Ernährung der Larven ist noch nicht geklärt [102].

Die Käfer wurden in den Sommermonaten von Mai bis August an unterschiedlichen Standorten um Jena und bei Karlsruhe gefangen. Die vorherrschende Art im Karlsruher Raum ist *Oedemera flavipes*, die sich besonders durch die erzfarbene schimmernde grüne Farbe auszeichnet. Rund um Jena wurden überwiegend Oedemeridae der Species *Oedemera femorata* gesammelt, die etwas größer sind und einen dunklen Körper mit gelb/ockerfarbenen Flügeldecken besitzen. Desweiteren wurden einige Tiere der Art *Oedemera lurida* gefunden, die im Vergleich kleiner (5-7 mm) sind, und eine graugrüne, nicht glänzende Färbung aufweisen und wenige Weibchen von *Oedemera podagrariae*, die ganz gelb gefärbt sind. Neben der taxonomischen Bestimmung mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssel wurde von jeder Art jeweils ein Männchen und ein Weibchen sauer aufgeschlossen und extrahiert und der Extrakt mittels GC/MS auf Cantharidin untersucht [101]. Aufgrund dieser chemotaxonomischen Zuordnung konnte man sich sicher sein, daß es sich bei den gesammelten Käfern tatsächlich um Oedemeriden handelte.

Wichtig bei der Haltung der Käfer unter Laborbedingungen ist, daß man diesen zur Erleichterung der Eiablage einen getrockneten Bärenklostengel hinzulegt, der in der Mitte aufgeschitten ist. Die Weibchen legen die Eier bevorzugt unter die lockere Rinde oder in kleine Nischen im Holz, oder zwischen Holz und Boden. Ein Eigelege umfasste zwischen fünf und fünfunddreißig fast farblose bis kräftig gelbe, länglich ovale Eier.

Aus den meisten Eiern entwickelten sich innerhalb von 9-12 Tagen Larven, die zuerst ihre eigene Eihülle als Nahrung aufbrauchten. Die Larven wurden dann auf imprägniertes Futter gesetzt. Als am Besten geeignet stellte sich eine Mischung aus Pollengranulat mit fein gemahlenden Bohnen und Agar heraus, das eine feste breiige Konsistenz besitzt und in die man die zu testende Vorstufe leicht einbringen kann. Versuche mit früher empfohlenen handelsüblichem Fischfutter (TetraMin[®]) oder reinem Pollengranulat waren nicht erfolgreich, da sowohl das Futter, als auch das eingesetzte Mevalolacton hygroskopisch sind. Einige Larven sind in dem aufgeweichten und wieder verfestigten Futter verendet. Eine Verpilzung des Futters wurde durch Umsetzen der Larven alle 2 Tage verhindert. Für weitere Versuche könnte über den Zusatz von Konservierungsstoffen nachgedacht werden.

Die Aufarbeitung der Larven erfolgte nach ihrem Tod indem die Larven zuerst in einer leicht alkalischen Lösung (1% NaHCO₃/Na₂CO₃) bei pH 10 mit einem Mini-Dispergiergerät aufgeschlossen und gleichzeitig mit Chloroform extrahiert wurden. Die organische Lösung enthielt kein Cantharidin, das unter diesen Bedingungen als Dicarboxylat in der wässrigen Phase vorliegt. Nach Ansäuern des wässrigen Extraktes mit konzentrierter Salzsäure und 20 Min Erhitzen auf 100° C konnte Cantharidin mit Chloroform extrahiert werden (s. S. 95).

Die Untersuchung der Proben im GC/MS erfolgte im EI- und im CI-Modus [88]. Das EI-Spektrum weist die Ionen mit den Massen $m/z = 70$, 96 und 128 als charakteristische Signale auf, wobei das Ion der Masse $m/z = 128$ meist den Basispeak bildet. Das Molekülion $[M]^+$ ist gar nicht zu sehen, lediglich $[M+H]^+$ mit der Masse $m/z = 197$. Das 2,3-Dihydrofuranradikalkation der Masse $m/z = 70$ entsteht durch zwei homolytische Bindungspaltungen und Verlust von 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid. Nach Verlust von Ethylen, CO₂ und CO aus dem Molekülion resultiert aus dem mittleren Ringsystem das 2,3-Dimethylfuranradikalkation der Masse $m/z = 96$. Der Basispeak mit der Masse

$m/z = 128$ ist das 2,3-Dimethylbernsteinsäureanhydridradikalkation, das durch die energetisch begünstigte Abspaltung von Furan unter Übertragung zweier Protonen entsteht.

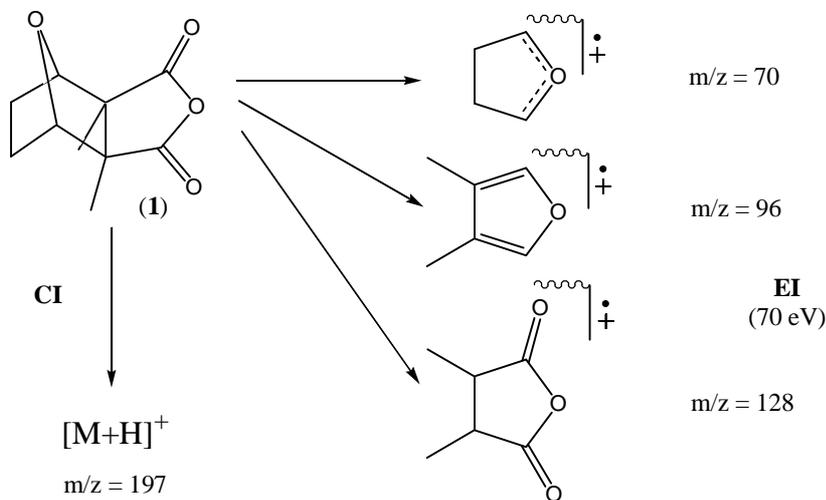


Abbildung 3-39 Fragmentierungen von Cantharidin 1 im EI- und CI-Modus

Das $[M+H]^+$ -Ion der Masse 197 wird im CI-Spektrum zum Basispeak und kann aufgrund seiner Konzentrationsabhängigkeit im EI-Spektrum in der Ionenfalle auch als Pseudo-CI-Ion angesehen werden. Die Summenformeln der in Abbildung 3-39 dargestellten Fragmente wurden durch Messung ihrer hochaufgelösten Massen zusätzlich abgesichert. Verwendet man Acetonitril oder *iso*-Butan als CI-Gas, so ist der $[M+H]^+$ -Peak praktisch das einzige Signal im gesamten Massenspektrum; im Gegensatz zu Methan, bei dem in geringem Umfang auch Fragmentierungen eintreten.

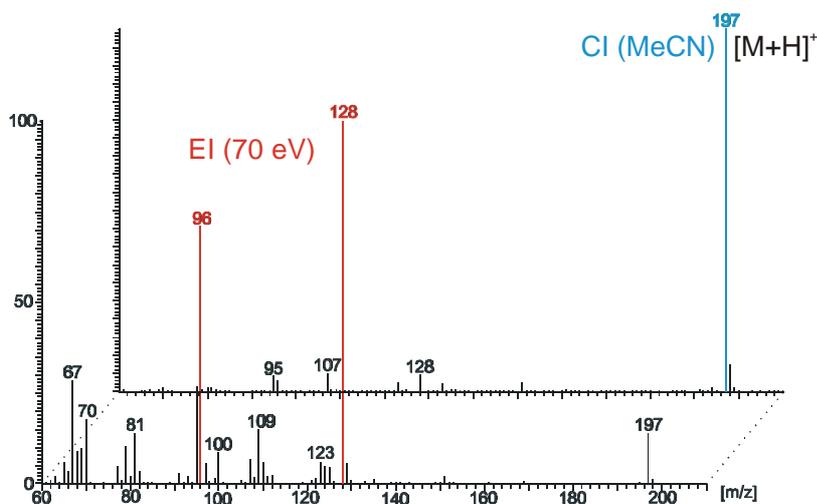


Abbildung 3-40 EI- und CI-Massenspektren von nichtdeutertem Cantharidin

Betrachtet man die Biosynthese von Cantharidin aus einem fünffach deuterierten Mevalolacton **43**, so ergibt sich folgendes Einbauschema:

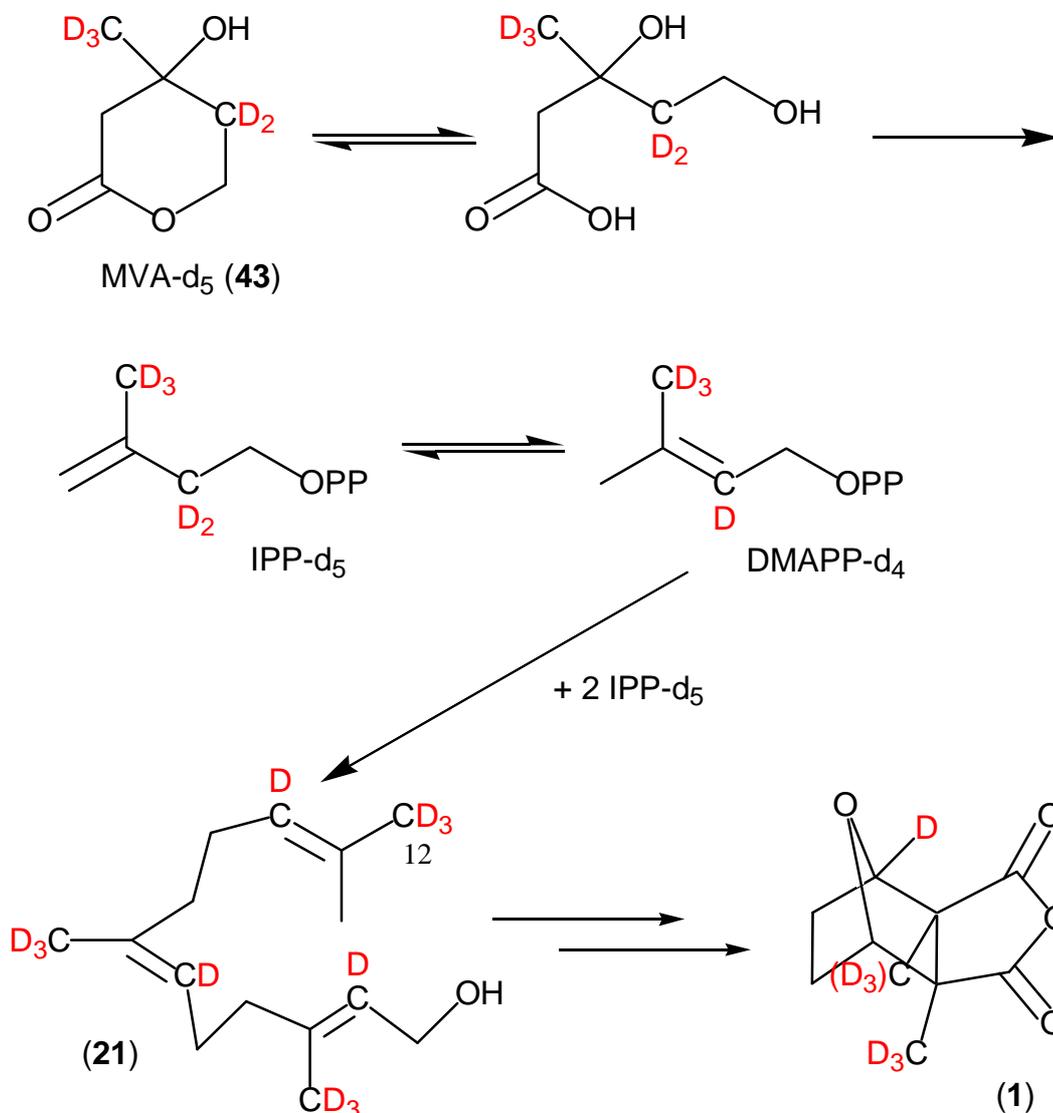


Abbildung 3-41 Biosynthese von Cantharidin aus fünffach deuteriertem Mevalolacton **43**

Dabei erfolgt die Inkorporation der IPP-d₅-Einheiten in das Farnesol **21** nach dem allgemeinen Mechanismus der Sesquiterpenbiosynthese. Aus dem bekannten Verknüpfungsmuster des Cantharidin-Grundgerüsts (Abbildung 1-13) lässt sich ein maximaler Einbau von sieben Deuteriumatomen in das 7-Oxabicycloheptangrundgerüst ableiten, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Markierung am C12 des Farnesols **21** nur zu 50% in das Zielmolekül eingebracht wird.

Nachfolgend werden exemplarisch die Massenspektren von Cantharidin **1** diskutiert, das aus einer Larve der Species *Oedemera femorata* isoliert wurde, welche 75 Tage auf Nahrung aufgewachsen ist, die mit d_5 -Mevalolacton **43** behandelt war.

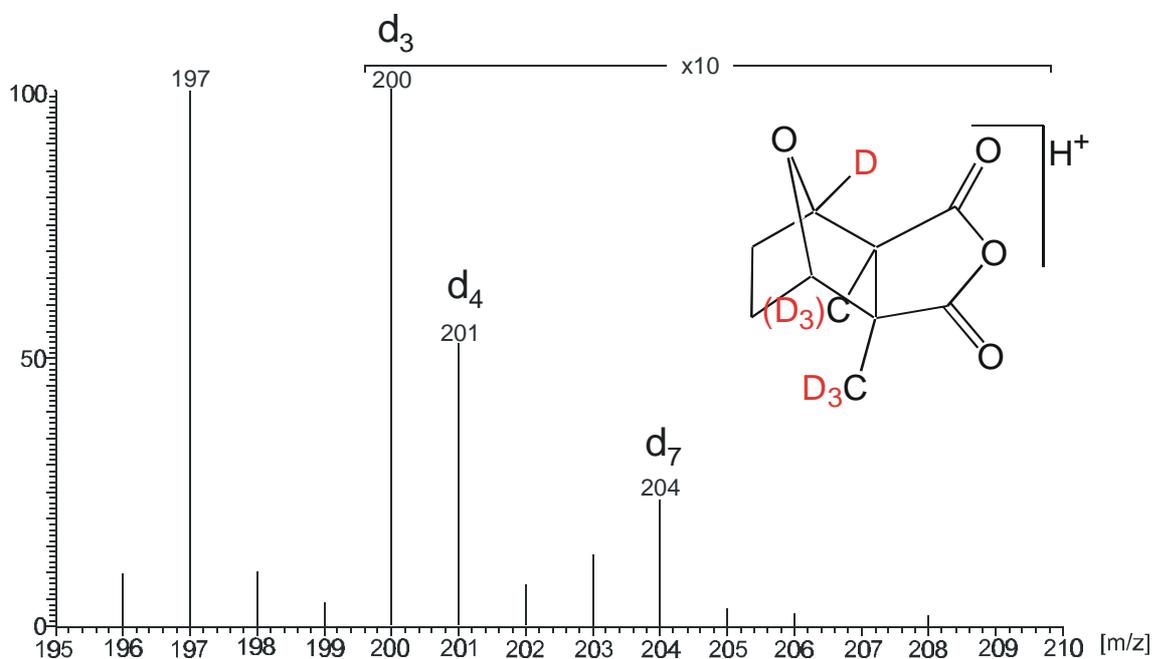


Abbildung 3-42 Ausschnitt aus dem CI-Massenspektrum von deuteriertem Cantharidin

Anhand der maximalen Massenverschiebung des $[M+H]^+$ -Peaks im CI-Spektrum von $m/z = 197$ auf $m/z = 204$, lässt sich erkennen, daß die maximale Anzahl von sieben Deuteriumatomen in das Anhydrid eingebaut wurde. Der Markierungsgrad dieser Probe betrug etwa 4 bis 5 %; maximal wurden bis zu 14 % erreicht. Sie wurde aus den Integralen der Ionenspuren im Gaschromatogramm als Verhältnis der markierten Isopreneinheiten zu der Gesamtzahl der Isopreneinheiten, die eine Markierung einbringen können, berechnet. Bereits bei diesem nicht sehr hohen Markierungsgrad zeigt sich deutlich der maximale Einbau von sieben Deuteriumatomen in das Cantharidin. Dass der Einbau nach dem in Abbildung 3-41 dargestelltem Weg abläuft, zeigen die dazu passenden maximalen Massenverschiebungen in den Fragmenten des EI-Spektrums. So kann das 2,3-Dimethylfuranradikalkation der Masse $m/z = 96$ noch alle sieben Deuteriumatome enthalten und tatsächlich war das 7-fach deuterierte Fragment mit der Masse $m/z = 103$ im EI-Spektrum nachweisbar.

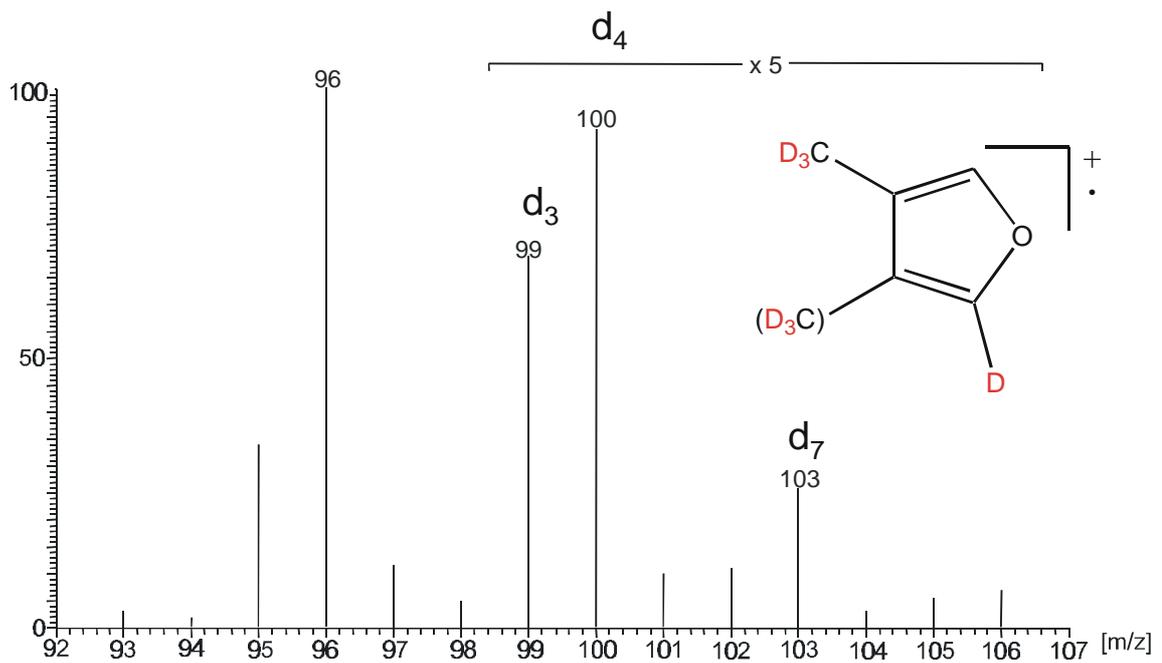


Abbildung 3-43 Ausschnitt aus dem EI-Massenspektrum von deuteriertem Cantharidin

Das 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid-Radikalkation der Masse 128 besitzt nur maximal 6 Deuteriumatome was einen Massenshift auf $m/z = 134$ bedeutet.

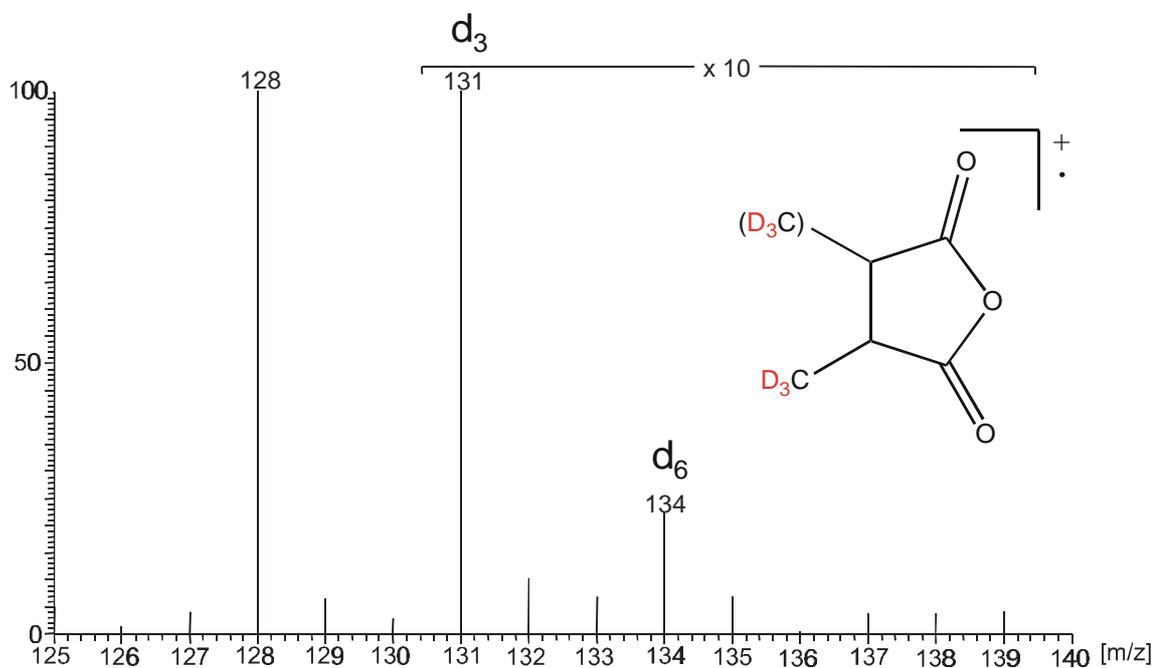


Abbildung 3-44 Ausschnitt aus dem EI-Massenspektrum von deuteriertem Cantharidin

Das 2,3-Dihydrofuran-Radikalkation kann maximal ein Deuteriumatom besitzen.

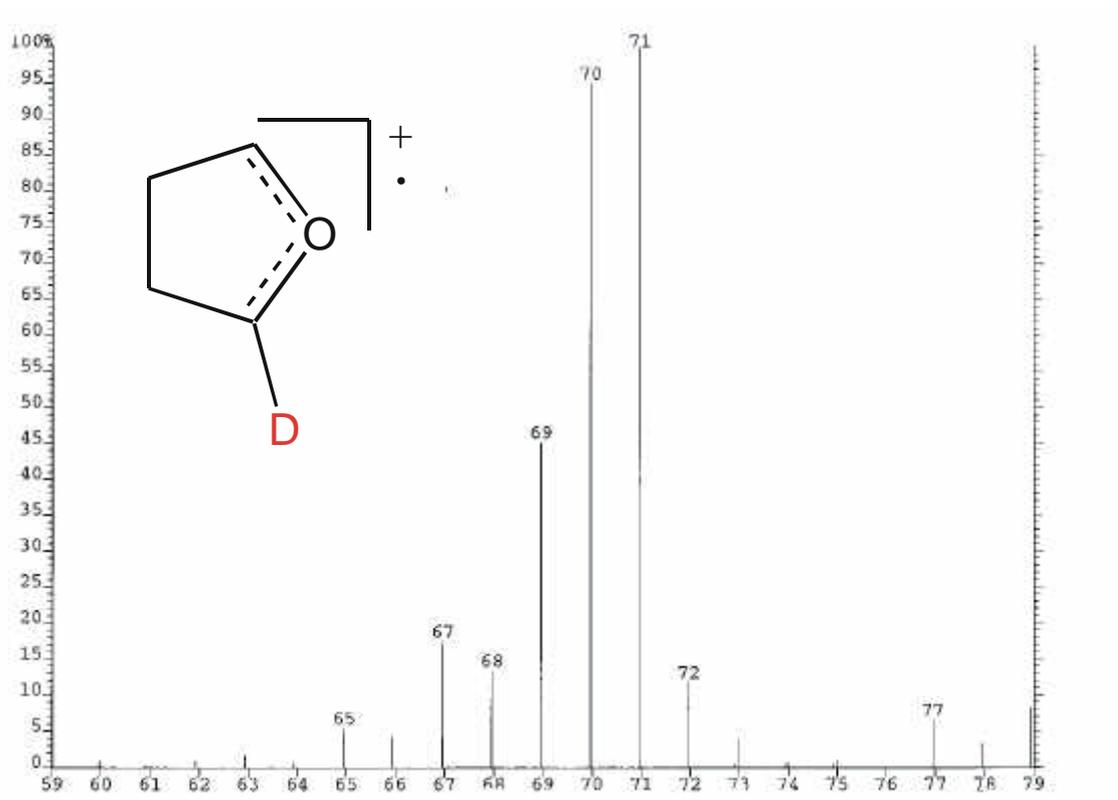


Abbildung 3-45 Ausschnitt aus dem EI-Massenspektrum von deuteriertem Cantharidin

Das Fragment ist jedoch weniger intensiv als die beiden zuvor vorgestellten und kann auch nicht in Iontrap-Massenspektrometern beobachtet werden. Dieses Massenspektrum wurde auf einem Sektorfeldgerät aufgenommen und zeigt ein deutliches Signal von $m/z = 71$, das eindeutig dem deuterierten Cantharidin zugeordnet werden kann, während das Signal mit $m/z = 77$ eine Verunreinigung ist. Dies zeigt sich daran, daß das 77er-Signal keinen Retentionszeitenversatz gegenüber dem nichtdeuterierten Fragment der Masse $m/z = 70$ zeigt.

Der Retentionszeitenversatz ist ein typischer Effekt im chromatographischen Verhalten deuterierter Substanzen. Aufgrund der Erniedrigung des Siedepunktes eluieren deuterierte Verbindungen unter den gewählten Bedingungen früher als das undeuterierte Analogon. Exemplarisch ist dies für eine Probe dargestellt, die unter CI-Bedingungen vermessen wurde.

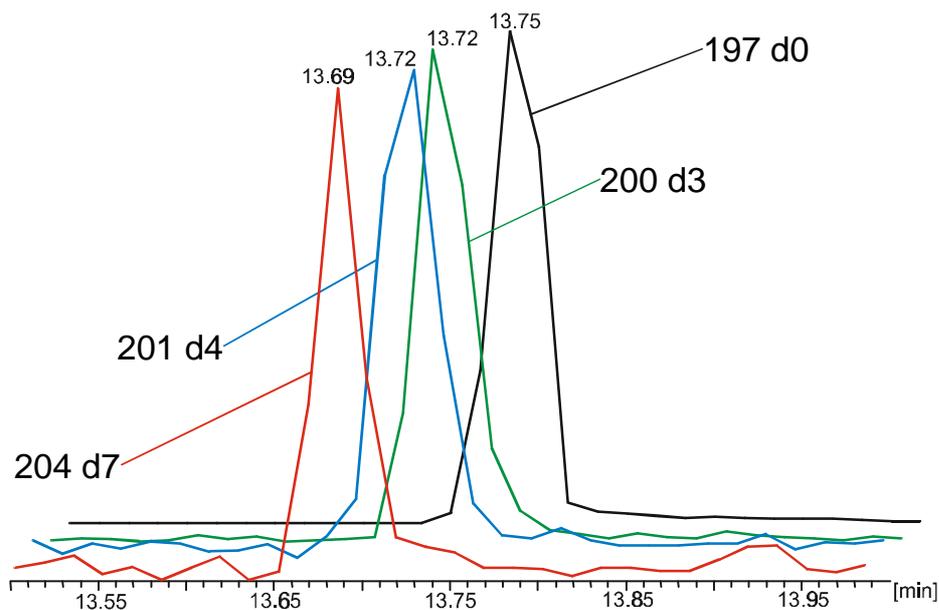


Abbildung 3-46 Retentionszeitenversatz von Cantharidin I in Abhängigkeit des Deuterierungsgrades

Mit jedem zusätzlichen Deuteriumatom eluiert die Verbindung etwa 0,6 sec früher. Betrachtet man die Isotopomere anhand ihrer spezifischen Ionenspuren, so liegt das Elutionsmaximum des undeuterten d_0 -Ions bei 13,75 min, das d_3 - und das d_4 -Ion folgen bei 13,72 und das maximal deuterierte d_7 -Cantharidin liegt bei 13,69 min. Zur exakten chromatographischen Unterscheidung zwischen d_3 - und d_4 -Cantharidin reichte die zeitliche Auflösung des Massendetektors nicht aus, tendenziell zeigt sich jedoch, daß das schwerere Molekül früher eluiert.

Neben der maximalen Verschiebung um bis zu sieben Masseneinheiten kommt es, wie man in den Spektren erkennt, natürlich auch zu geringeren Massenverschiebungen. Dies resultiert aus der statistischen Verteilung, da ein markiertes d_5 -IPP auch mit nicht markierten, endogenem IPP zu Farnesol reagieren kann. In der folgenden Darstellung sind alle Deuterierungsmuster, die sich aus der Inkorporation von keiner, einer, zwei und drei deuterierten Isopreneinheiten ableiten, gezeigt und die Deuterierungsgrade der möglichen Ionen, unter Berücksichtigung der zu 50% eingebauten C12-Methylgruppe des Farnesols, aufgelistet.

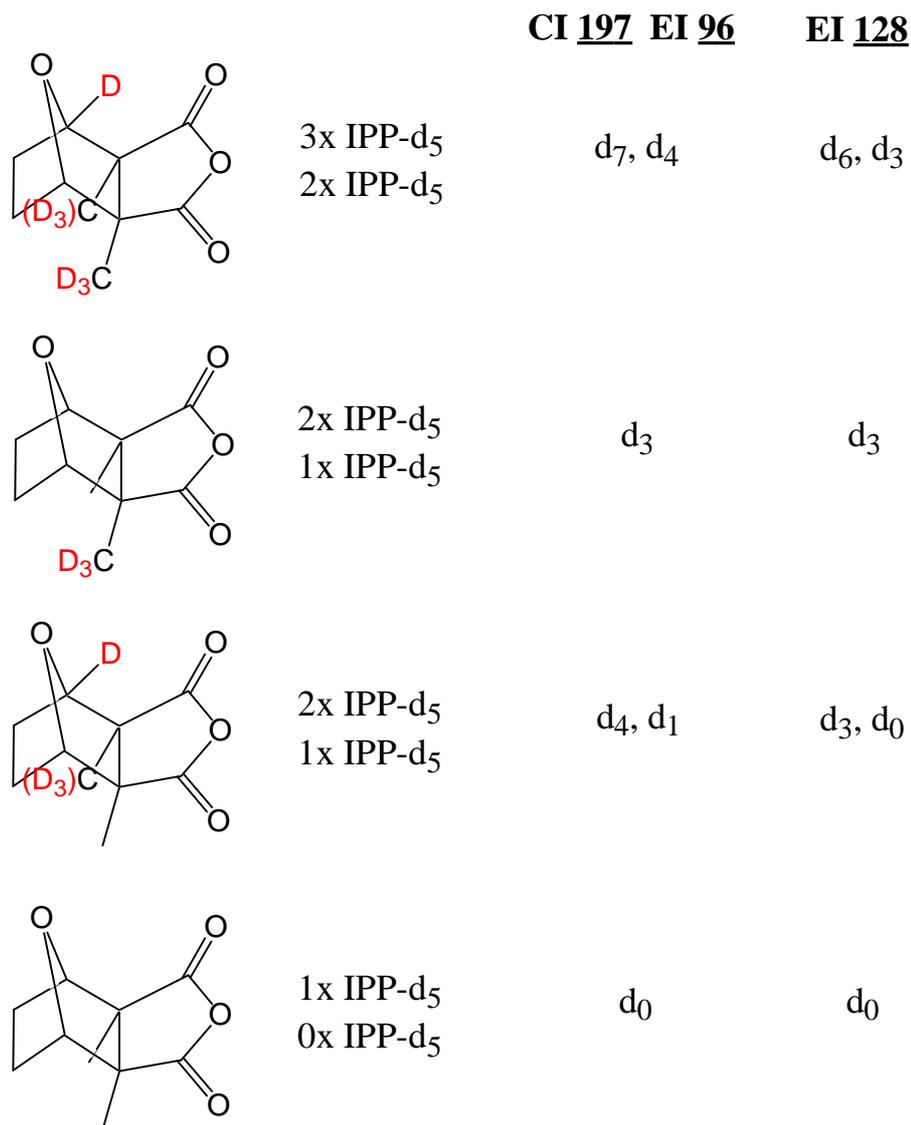


Abbildung 3-47 Darstellung aller möglichen Deuterierungsmuster, die sich aus der Kombination von einer, zwei oder drei deuterierten mit nichtdeuterierten Isopreneinheiten ergeben können.

Das Ergebnis kann man in einer Tabelle zusammenfassen, aus der die Häufigkeiten der zu erwarteten Massen abzulesen ist. Die Verhältnisse gelten jedoch direkt nur für eine Reihe, z.B. 1x IPP-d₅. Darüberhinaus ist zu berücksichtigen, daß die Wahrscheinlichkeit, daß gleichzeitig mehrere markierte Einheiten eingebaut werden, mit der Anzahl sinkt. D.h., daß drei d₅-IPP-Bausteine zusammen ein Farnesol **21** aufbauen ist am wenigsten häufig. Eine quantitative Aussage darüber lässt sich jedoch nicht treffen. (vgl. Abbildung 3-41)

Tabelle 3-4 Häufigkeiten der möglichen Deuterierungsgrade des Cantharidin und der daraus resultierenden Masse der Fragmente

	CI 197; EI 96					EI 128			
	d ₇	d ₄	d ₃	d ₁	d ₀	d ₇	d ₄ , d ₃	d ₀	
3x IPP-d ₅	1	1				1	1		
2x IPP-d ₅	1	2	2	1		1	5		
1x IPP-d ₅		1	2	1	2		3	3	
0x IPP-d ₅					X			X	
EI [m/z]	103	100	99	97	96	134	131	128	
CI [m/z]	204	201	200	198	197				

↓
zunehmende
Wahrscheinlichkeit

Diese Tendenzen finden sich auch in den einzelnen Massenspektren wieder. So ist in allen Fällen das aus 7-fach deuteriertem Cantharidin resultierende Ion das am wenigsten intensive und unter CI-Bedingungen (vgl. Abbildung 3-42) kommt das d₃-Cantharidin etwa doppelt so häufig vor wie das d₄-Cantharidin. Dies entspricht der theoretischen Verteilung bei Inkorporation von nur einer Isopreneinheit. Das Signal mit $m/z = 100$ (Abbildung 3-43) ist intensiver, da es nicht nur das vierfach deuterierte 2,3-Dimethylfuranradikalkation, sondern auch ein Fragment von nichtdeuteriertem Cantharidin beinhaltet. Auch das Fragment der Masse 131 ist wie erwartet intensiver als das der Masse 134 (Abbildung 3-44).

Nach der qualitativen Auswertung ist für die Planung weiterer Fütterungsexperimente eine quantitative Beurteilung wichtig. Dazu wurde der Markierungsgrad und die relative Cantharidinmenge in einer Larve über die Zeit betrachtet.

Aus den Darstellungen erkennt man, daß eine merkliche Cantharidinproduktion erst nach etwa 30 Tagen einsetzt. In den geringen Mengen am Anfang kann auch kein deuteriertes Cantharidin nachgewiesen werden; unter Umständen stammt dieser Grundgehalt noch von den Eiern, die die Larven als Erstes gefressen haben, nachdem sie geschlüpft sind. Erst mit dem dritten Larvenstadium, welches die Larven etwa nach 25 Tagen erreichen, scheint die eigene Biosynthese einzusetzen (vgl. [102]). Ab diesem Zeitpunkt steigt die Cantharidinmenge in den Larven merklich an, und es kann auch markiertes Material nachgewiesen werden. Dabei steigt der Markierungsgrad von 2% bis auf fast 5% nach 75 Tagen. Aus dieser Probe wurden die Massenspektren für die qualitative Beurteilung ausgewählt.

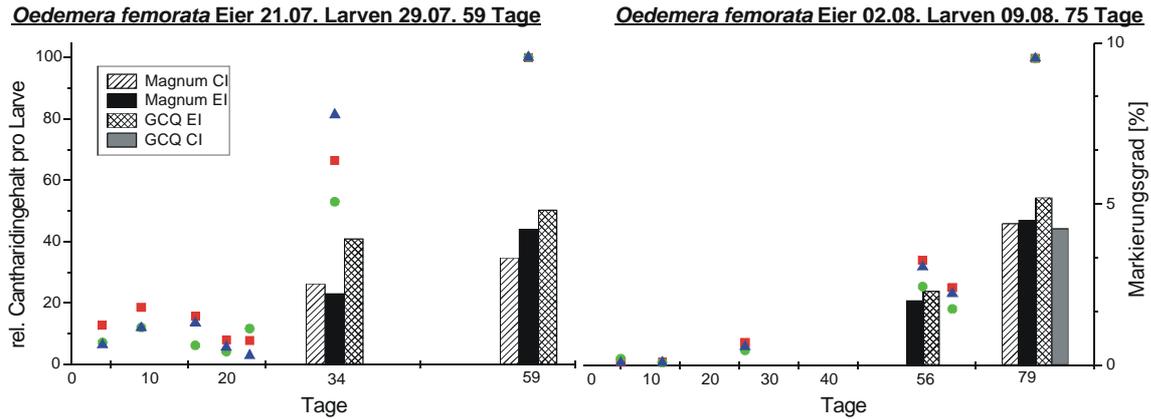


Abbildung 3-48 rel. Cantharidingehalt (Punkte) und Markierungsgrad (Balken) von zwei Populationen von *Oedemera*-Larven

Betrachtet man die Proben einer anderen Larvenpopulation, die 55 bis 68 Tage auf Futter mit markiertem Mevalolacton herangezogen wurden, so zeigen alle Proben relativ viel Cantharidin und auch einen hohen Markierungsgrad.

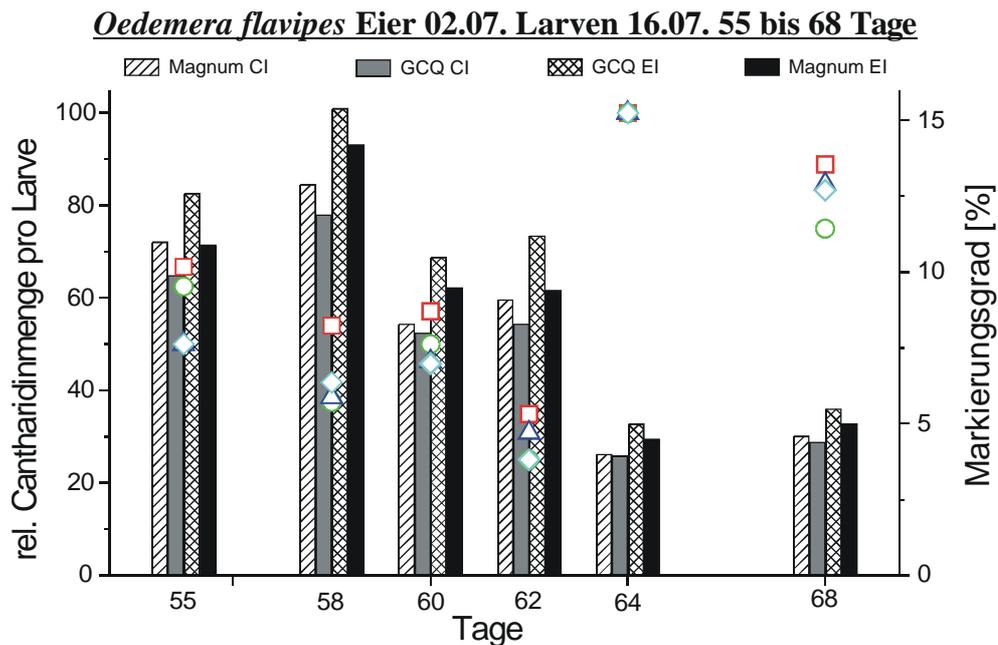


Abbildung 3-49 Der Markierungsgrad (Balken) nimmt trotz steigender Cantharidinmenge (Punkte) wieder ab

Im Gegensatz zur Abbildung 3-48 scheint sich in dieser Population von Larven von *Oedemera flavipes* der Trend anzudeuten, daß trotz steigendem Gesamtcantharidingehalt der Markierungsgrad mit steigendem Alter wieder abnimmt. Dies könnte bei einer hohen Biosyntheserate an einer unzureichenden Versorgung mit

markierter Vorstufe durch orale Applikation über das Futter zu erklären sein. Ob sich dieser Trend fortsetzt, konnte nicht weiter verfolgt werden, da keine Larve dieser Population länger als 75 Tage überlebte. Bis zu diesem Zeitpunkt produzierten die Oedemeriden-Larven allerdings bereits ausreichend Cantharidin bei genügend hohem Markierungsgrad, um die biosynthetischen Fragestellungen durch massenspektroskopische Untersuchungen aufzuklären.

Da die meisten Vorstufen sehr kostbar sind und nur ein geringer Teil der Vorstufe von den Larven tatsächlich mit der Nahrung aufgenommen wird und der größte Teil verworfen werden muß, ist es für weitere Experimente ratsam, erst nach ca. 25 Tagen mit der Fütterung von imprägniertem Futter zu beginnen. Die besten Ergebnisse wurden von Larven erhalten, deren Eier im Juli gelegt wurden. Zu dieser Zeit gab es die meisten Käfer, die größten Eigelege aus denen entsprechend viele Larven schlüpften, die in der Summe am längsten lebten. Prinzipiell ist es für das Ergebnis am Besten, die Larven so lange wie möglich auf dem behandelten Futter fressen zu lassen, auch wenn der Markierungsgrad abnimmt. Der Gesamtgehalt an deuteriertem Cantharidin steigt jedoch weiter und die Messungen werden eindeutiger.

Diese Versuche zeigen, daß die Oedemeriden, die die am weitesten verbreitete Familie von Cantharidinproduzenten in Mitteleuropa sind, zur Untersuchung der Biosynthese von Cantharidin geeignet sind.

Die Biogenese verläuft nach dem postulierten Schema und ist vergleichbar mit der Biosynthese in den Meloiden. Es konnte gezeigt werden, daß die Darstellung des Isopentenylpyrophosphats und daraus das Farnesol **21** als Grundbaustein der Sesquiterpene über den für Insekten typischen Mevalonat-Pathway verläuft.

Erstmalig wurden intensiv die Protonen betrachtet, die Aufschlüsse über die Oxidationsstufen der Kohlenstoffatome in den noch unbekanntem Zwischentufen vom Farnesol **21** zum Cantharidin **1** geben und somit Rückschlüsse auf die Biosyntheseschritte zulassen.

Entsprechend dem bisher bekannten Schema (vgl. Abbildung 3-41) von C-C-Bindungsbildungen, C-C-Bindungsbrüchen und Oxidationen bzw. Sauerstoffinsertionen gehen die Markierungen an C6 und C7' durch Verlust des C₄-Segments verloren. Das Deuterium an C2 geht nicht in das Cantharidin ein, da dieses

Kohlenstoffatom zur Carboxylatgruppe oxidiert wird. Hingegen bleibt die Methylgruppe, und somit auch die Deuteriummarkierungen, an C3' erhalten. Die Deuteriumatome der Methylgruppe von C12 werden wie erwartet nur zu 50% eingebaut. Der Einbau des Deuteriums von C10 zeigt hingegen, daß an dieser Position maximal eine Alkohol- oder Etherfunktion eingeführt werden kann und keine Carbonylfunktion, da es in diesem Falle zum Verlust der Markierung käme. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus von Cantharidin und der symmetrischen Fragmente im Massenspektrum kann nicht entschieden werden, ob das Deuterium von C10 auf der einen oder der anderen Seite der Etherbrücke sitzt. Somit kann dieses Experiment nicht die Fragen zur Cyclisierungsrichtung und der Einführung der Etherbrücke beantworten, die in Kapitel 3.2 durch die unterschiedlichen Enantiomerenverhältnisse von Palasonin **2** in den Insekten und in der Pflanze aufgeworfen wurden.

In diesen Cantharidinproduzenten konnte kein Palasonin nachgewiesen werden, anhand dessen die Biosynthese hätte näher untersucht werden können.

3.4 Cantharidin als Elicitor der Duftstoffbioynthese von *Phaseolus lunatus*

Die Lima- oder Mondbohne (*Phaseolus lunatus*) kann mit der Emission von Duft auf einen Pathogenbefall reagieren [103]. Der Nutzen der induzierten Duftstoffemission besteht für die Pflanze in einer direkten Verteidigung gegen Predatoren; durch die Duftstoffe kann sie aber auch Hilfe aus einer dritten trophischen Ebene herbeirufen. So lockt die Limabohne bei Befall durch herbivore Spinnmilben *Tetranychus urticae* ihren natürlichen Feind, die Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* an. Die Raubmilbe wird durch den Luftstrom auf der Suche nach Nahrung von Pflanze zu Pflanze getragen. Aufgrund ihrer olfaktorischen Sinne ist sie in der Lage, befallene Pflanzen von nicht befallenen zu unterscheiden. Dabei geht das Signal für den Räuber von der Pflanze und nicht von den Spinnmilben aus [104]. Diese tritrophischen Systeme reagieren sehr selektiv. So können Spinnmilben auf einer anderen Wirtspflanze, z.B. etwa Mais (*Zea mays*), weder die parasitäre Wespe (*Cotesia marginiventris*), den natürlichen Feind der pflanzenfressenden Schmetterlingsraupe *Spodoptera exigua* anlocken, noch schafft es die Pflanze, die Hilfe der Raubmilben herbeizuholen [105].

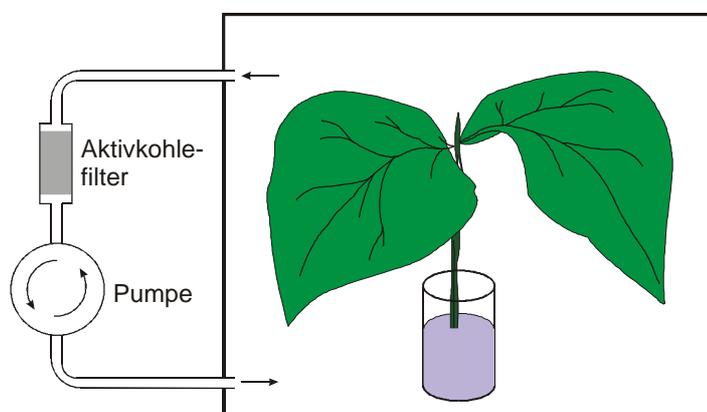


Abbildung 3-50 schematische Darstellung des Closed-Loop-Stripping (CLS)

Den Duft, den die Pflanzen emittieren, kann man durch zirkulierende Luft auf einem Aktivkohlefilter anreichern und nach dem Eluieren gaschromatographisch analysieren. Bewährt hat sich dabei die Methode des Closed-Loop-Strippings (CLS), welche in Abbildung 3-50 schematisch dargestellt ist. Bei dieser Methode wird die abgeschnittene Pflanze in einem geschlossenen Exsikkator in eine Testlösung oder frisches

Leitungswasser gestellt, und die Luft wird mit Hilfe einer Pumpe durch das Filter geleitet, das kontinuierlich die Duftstoffe adsorbiert.

Es zeigte sich, daß die Limabohne unterschiedliche Bouquets als spezifische Antwort auf bestimmte Herbivore oder verschiedene Elicitoren emittieren kann. Diese beinhalten Komponenten aus unterschiedlichen Biosynthesewegen, wie z.B. Indol aus dem Shikimat / Tryptophan-Weg, oder die sogenannten „Green Leaf Volatiles“ wie Hexenylacetat aus dem Fettsäure / Lipoxygenase-Weg und vor allem verschiedene Mono-, Sesqui- und Homoterpene, die aus dem Mevalonat- oder dem MEP-Weg stammen. Ein besonders komplexes Duftprofil wird durch Induktion der Bohnen mit Coronatin **44** als Elicitor abgegeben. Coronatin **44** ist ein Phytotoxin des Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, welches auch als Kaltwetterpathogen bezeichnet wird. Es ist verantwortlich für den Bakterienbrand auf Sojabohnen und kann große wirtschaftliche Schäden anrichten [106,107].

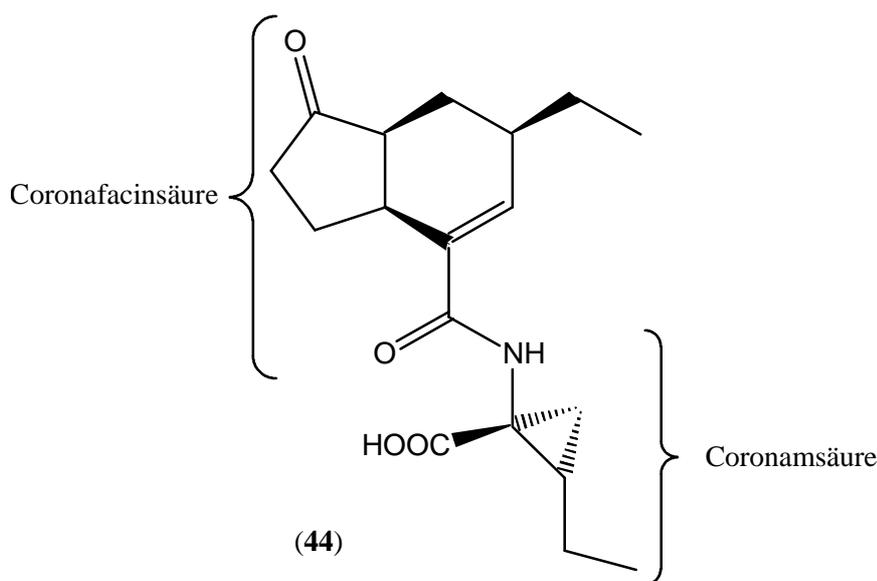


Abbildung 3-51 Struktur des Coronatins **44**, bestehend aus der Coronafacinsäure und der Coronamsäure

Das induzierte Duftspektrum enthält Komponenten wie Ocimen, Linalool, C₁₀H₁₄, C₁₀H₁₆O, Indol, Caryophyllen und DMNT **38**, die auch durch die Elicitierung mit dem Phytohormon Jasmonsäure **11** induziert werden, sowie TMTT **39** und Methylsalicylat **41** (MeSA).

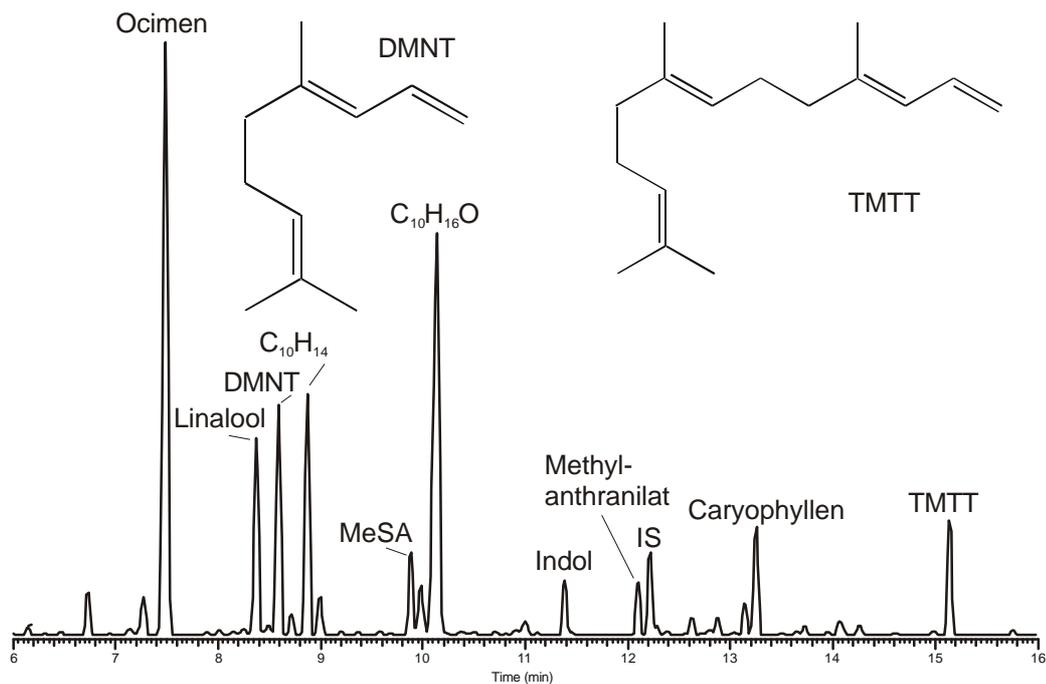


Abbildung 3-52 Duftprofil von *P. lunatus* nach Elicitierung mit Coronatin **44**

Im Unterschied zur Induktion durch Coronatin **44** sind die beiden Homoterpene (E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien **45** (DMNT) und (E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen **46** (TMTT) und das Methylsalicylat **47** (MeSA) die einzigen Komponenten nach Elicitierung mit Alamethicin.

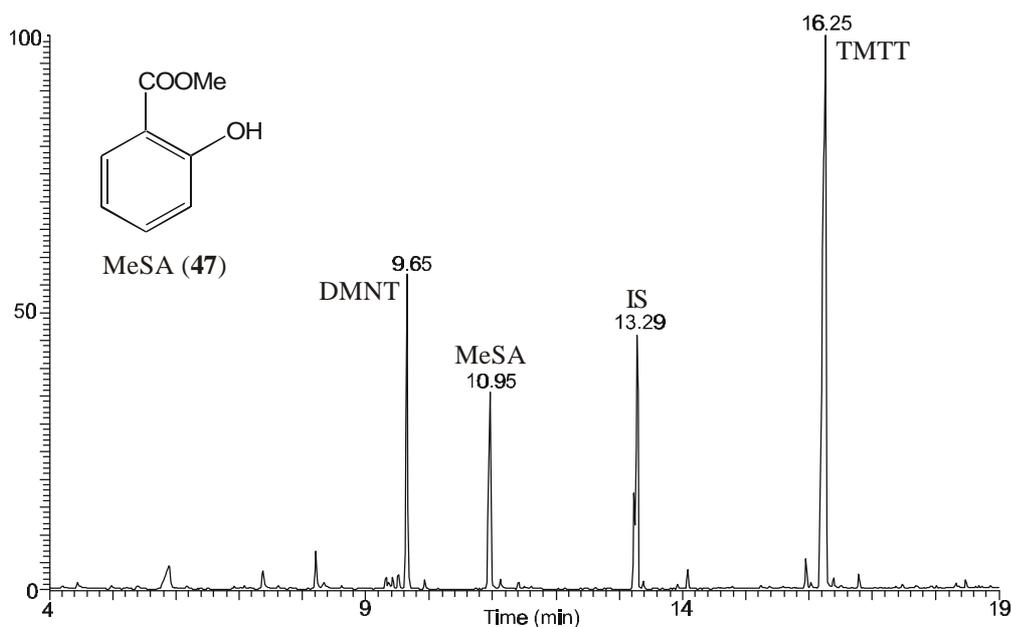


Abbildung 3-53 Duftprofil von *P. lunatus* nach Elicitierung mit Alamethicin

Alamethicin (Ala) ist ein Antibiotikum mit ausgeprägt membrandepolarisierenden Eigenschaften, das neben anderen Peptaibolen von dem phytopathogenen Pilz *Trichoderma viride* produziert wird. Es ist ein Peptid mit 20 Aminosäuren, einem *N*-acylierten Terminus, mehreren α -Aminoisobuttersäure-Bausteinen und einem zum α -Aminoalkohol reduzierten *C*-Terminus [108,109].

Die von Alamethicin induzierten Signalkaskaden der Duftstoffbiosynthese werden über die gleichen Phytohormone (Salicylsäure **10**, Jasmonsäure **11**, Ethylen **12** s. Abbildung 1-8) induziert, die bereits in der Einleitung vorgestellt wurden. So kann man nach Elicitierung mit Alamethicin einen Anstieg der endogenen JA- und SA-Konzentration feststellen.

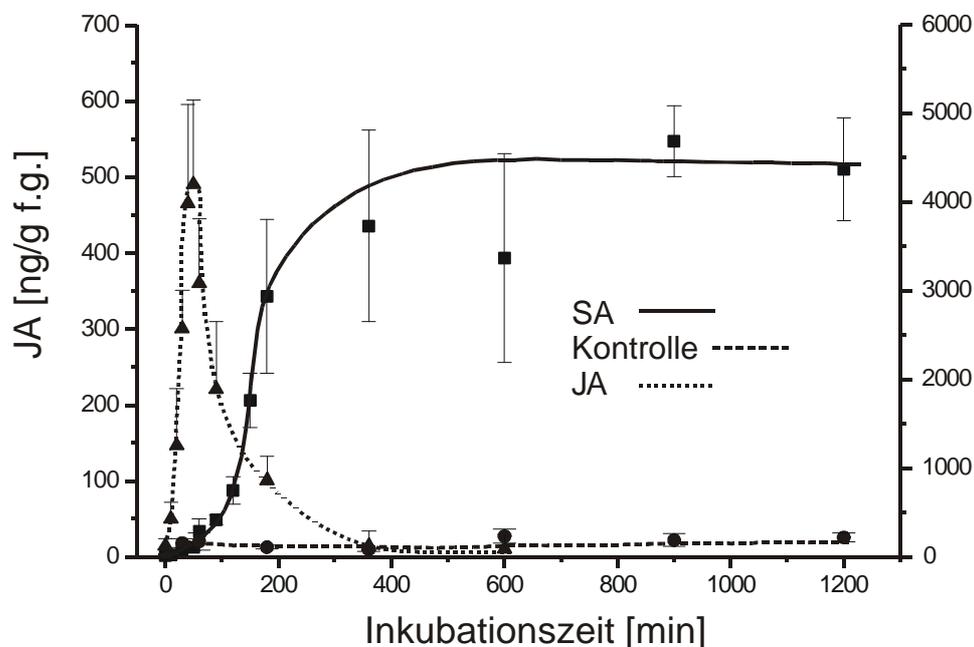


Abbildung 3-54 Zeitlicher Verlauf der Quantität endogener Salicylsäure **10** und Jasmonsäure **11** in Limabohnenblättern nach Behandlung mit Alamethicin [110]

Zuerst steigt der Gehalt an endogener Jasmonsäure **11** sprunghaft an und erst nach einiger Zeit (ca. 1-4 h) wird mehr Salicylsäure **10** nachgewiesen. Während des Anstiegs von **10** nimmt gleichzeitig die JA-Konzentration wieder ab, und die endogene SA-Konzentration erreicht ein Plateau. Der gegensätzliche Verlauf und weitere Ergebnisse von SCHÜLER und KOCH deuten auf einen „Cross-Talk“ zwischen diesen beiden Phytohormonen hin [111].

Mit Hilfe der Photoakustikspektroskopie (PAS) ist man in der Lage, Ethylen **12**, das von den Pflanzen abgegeben wird, in der Gasphase nachzuweisen (PAS s. S. 83).

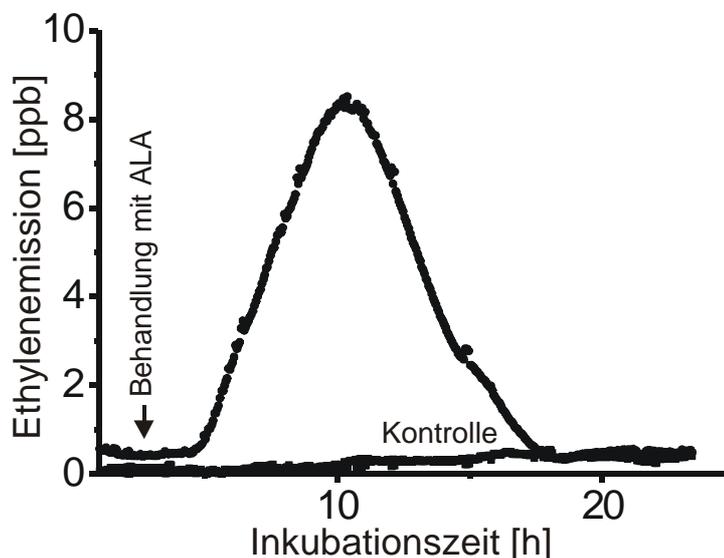


Abbildung 3-55 Ethylenemission nach Applikation von Alamethicin (10 µg/ml) an Blätter der Limabohne (*P. lunatus*) [110]

Die Messungen ergaben, daß bereits nach ca. drei Stunden eine deutliche Emission von Ethylen **12** einsetzt, die nach 7,5 Std. ihr Maximum erreicht und im Verlauf von weiteren fünf Stunden wieder abklingt. Die Kinetik entspricht der bereits früher beschriebenen Ethylenemission aus Blättern von *P. lunatus* nach Behandlung mit Cellulysin oder Jasmonsäure **11** [110].

TAKABAYASHI et.al. haben die Transkription von sechs verschiedenen Verteidigungsgenen nach Angriff von *T. urticae* in den Blättern der Limabohne (*P. lunatus*) nachgewiesen [112]. Dabei handelt es sich um Gene von Pathogen-Related (PR)-Proteinen (PR-2, PR-3 und PR-4), die Lipoxygenase (LOX) des Octadecanoid-Pathway, die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) des Phenylpropanoid-Wegs und die Farnesyl-Diphosphat-Synthase (FPS) der Terpenbiosynthese. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß fünf der sechs Gene ebenfalls von nichtbefallenen Bohnen exprimiert werden, die in der Nähe der befallenen Pflanzen stehen. Für die Übermittlung der Information sind die Duftstoffe, die die Bohne nach Pathogenbefall emittiert, verantwortlich. Als wichtigste Komponenten konnten das Dimethylnonatrien **45** (DMNT) und Trimethytridecatetraen **46** (TTMT) ermittelt werden, die auch die

Transkription der Verteidigungsgene PR-2, PR-3, LOX, PAL und FPS induzieren, während β -Ocimen die Expression von PR-2, PR-3, PAL und FPS erst nach 24 Stunden Exposition induzierte.

Stellt man nun eine Pflanze in eine Lösung von 1 mM Cantharidin **1** in Wasser und sammelt über 28 h den Duft, erhält man ein neues, charakteristisches Duftprofil:

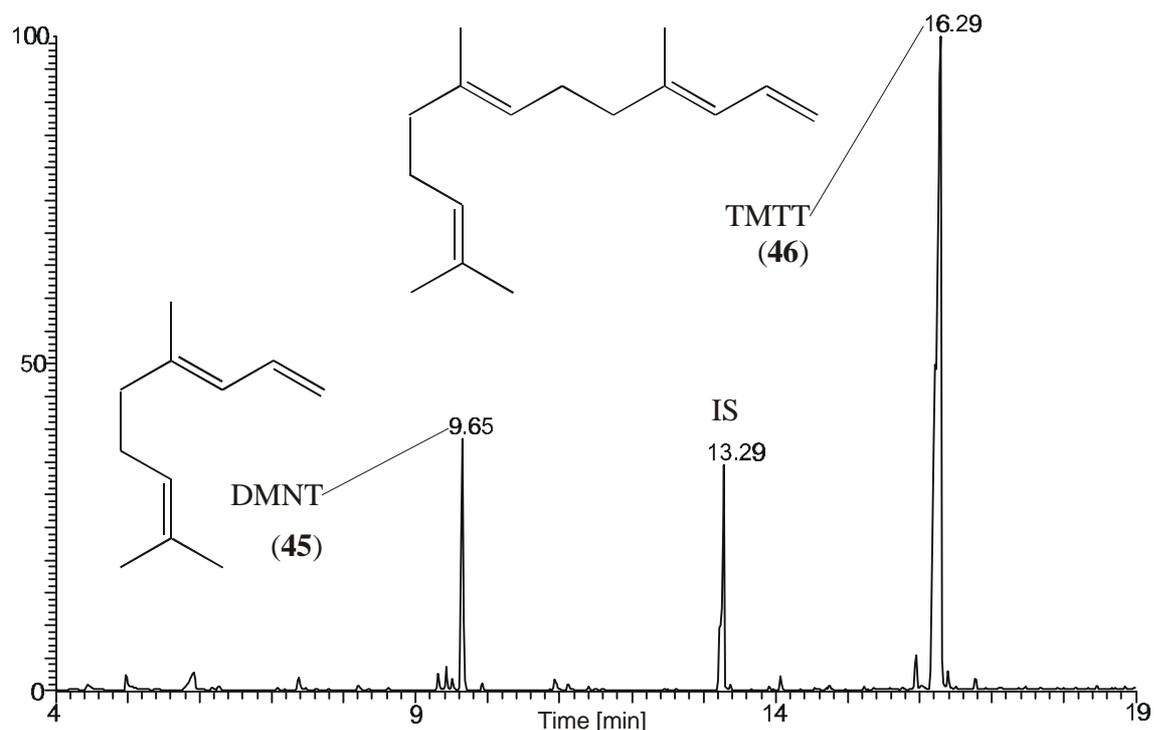


Abbildung 3-56 Cantharidin **1** (1 mM) eliciert die beiden Homoterpene Dimethylnonatrien **45** (DMNT, (E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien) und Trimethyltridecatetraen **46** (TMTT, (E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen) als Duftkomponenten bei *P. lunatus*

Im Vergleich zum Coronatin **44** (Abbildung 3-52) werden nach Applikation von Cantharidin **1** wesentlich weniger Duftstoffe durch die Bohne freigesetzt. Es sind nur die beiden Homoterpene Dimethylnonatrien **45** und Trimethyltridecatetraen **46**, von denen das zweite in weitaus höheren Konzentrationen vorliegt. Dieses Duftmuster ist bis auf das Methylsalicylat **47** vergleichbar mit dem, das durch Alamethicin induziert wird (Abbildung 3-53), und deckt sich mit dem, das durch Linolensäure induziert wird. Diese bewirkt, allerdings nur in sehr hohen Konzentrationen (2 mM), eine schwache Duftproduktion [113] analog zu Abbildung 3-56.

Um die Schwellenkonzentration zu ermitteln, bei der Cantharidin **1** noch als Elicitor auf die Duftstoffproduktion bei Bohnen wirkt, wurden mehrere Messreihen mit Pflanzen gleichen Alters und gleicher Größe durchgeführt, die für 24 Stunden in wässrige Cantharidinlösungen mit Konzentrationen von 1 μM bis 1 mM gestellt wurden. Man stellt fest, daß Pflanzen bei einer Cantharidinkonzentration von 500 μM duften, während man unterhalb von 300 μM nur einen Grundlevel von Duftstoffen registrieren kann. Somit kann die Schwellenkonzentration für Cantharidin zum Auslösen von Bohnenduft auf etwa 400 μM abgeschätzt werden.

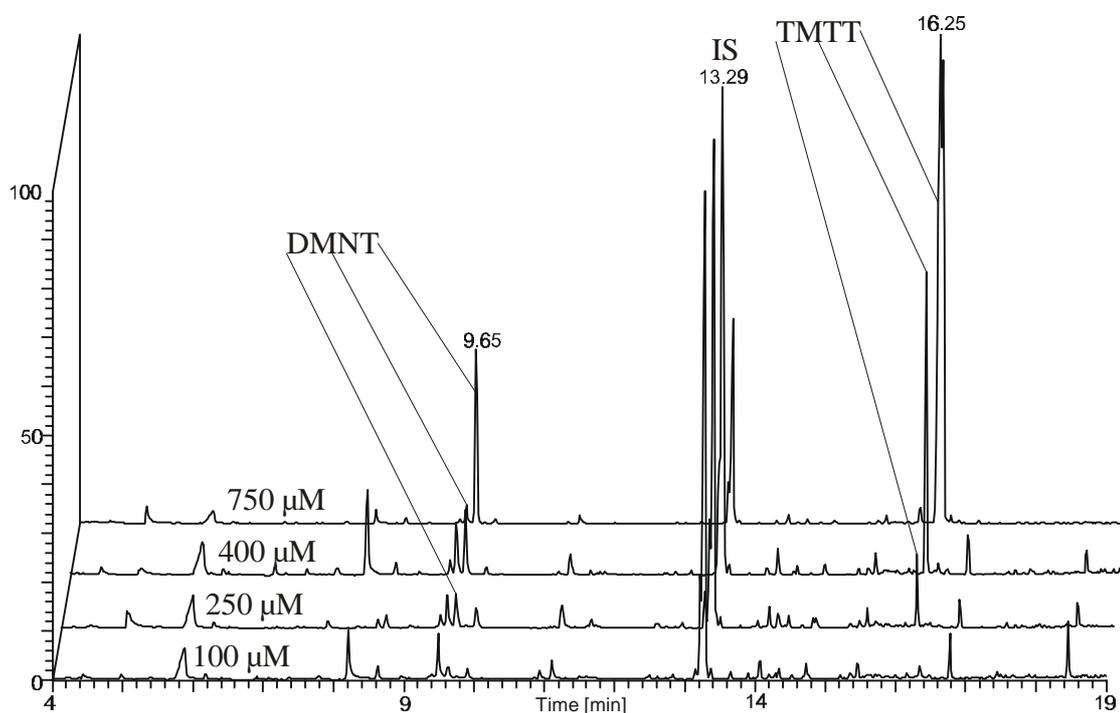


Abbildung 3-57 Abnahme der Duftstoffmenge mit abnehmender Cantharidinkonzentration

Die gleiche Reaktion der Bohnenpflanze kann auch durch Ansprühen mit einer 1 mM Lösung von Cantharidin erreicht werden. Dieser wurde noch zusätzlich 1% eines Emulgators (LF 700, BASF) zugesetzt, der den Transport durch die Blattoberfläche für den Wirkstoff erleichtern sollte.

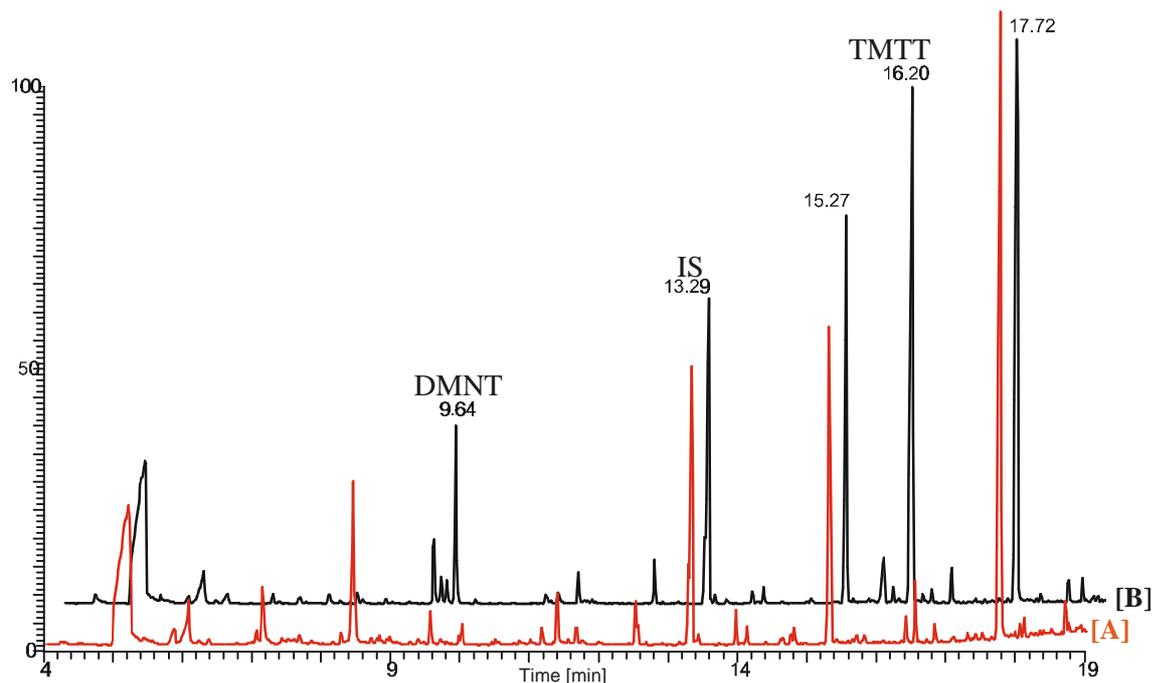


Abbildung 3-58 Duftprofil von *P. lunatus* nach Ansprühen mit [A] 1% Emulgator auf Papier und [B] 1 mM Cantharidin **1** / 1% Emulgator

Das Spektrum der flüchtigen Verbindungen ist komplexer als bei Applikation des Cantharidins **1** mit Wasser durch den Stengel. In Blind- und Leerwerten konnte gezeigt werden, daß der Emulgator selbst keine biologische Aktivität besitzt, aber die übrigen detektierten Verbindungen bei $R_t = 15,27$ Min. und $17,72$ Min. enthält.

Ferner wurden auch die Strukturanaloga Palasonin **2** und Endothal **5** auf ihre Wirkung an *P. lunatus* getestet, für die sich prinzipiell das gleiche Bild wie nach Induktion mit Cantharidin **1** ergibt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 4 Std. und anschließendem 24-stündigem Sammeln des Dufts zeigt die gaschromatographische Analyse des Bouquets die beiden Homoterpene DMNT **45** und TMTT **46** als Hauptkomponenten. Die Schwellenkonzentration der beiden zu Cantharidin strukturell ähnlichen Verbindungen liegt etwas niedriger; sie wurde für Palasonin auf ca. $250 \mu\text{M}$ und für Endothal auf ca. $200 \mu\text{M}$ bestimmt.

Für Cantharidin **1** wurde auch eine Kinetik der Duftstoffproduktion durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die Emission von Duftstoffen nach etwa 8 Std. beginnt. Dies ist der gleiche Zeitrahmen der bereits für andere Elicitoren in diesem System ermittelt wurde [114]. Alle Messungen wurden zum gleichen Zeitpunkt gegen 10:00 Uhr vormittags gestartet und nach 4, 8 und 12 Stunden beendet.

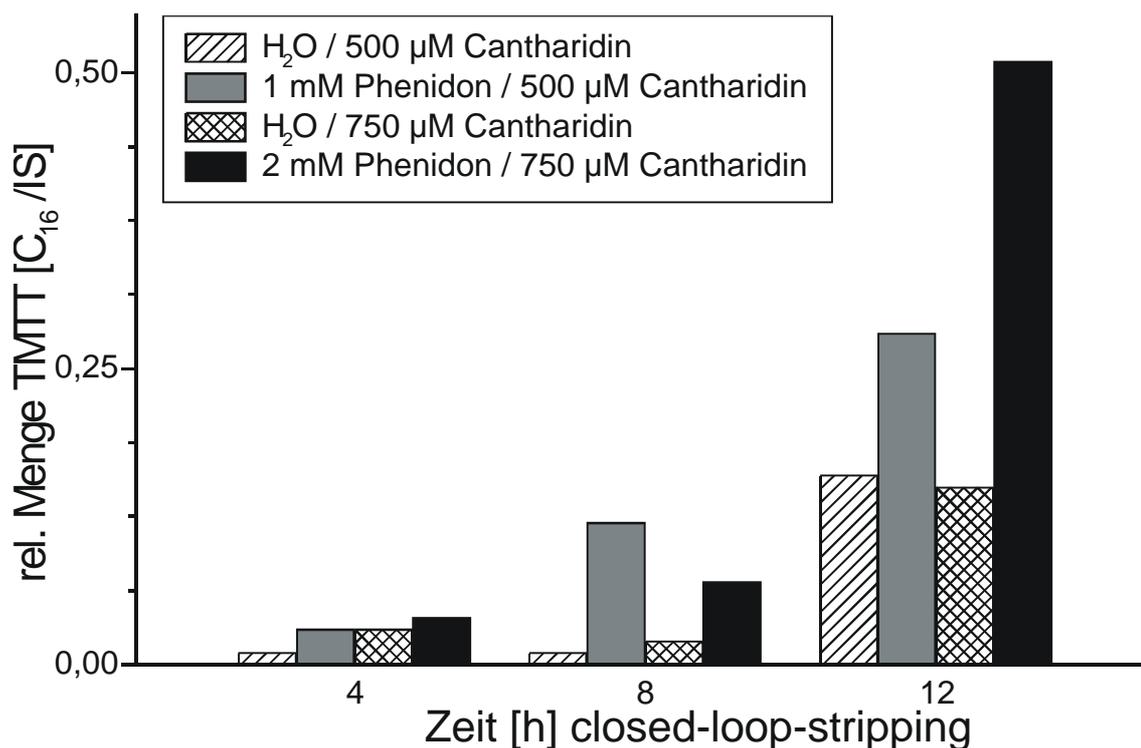


Abbildung 3-59 Kinetik der Duftstoffproduktion von *P. lunatus* nach Elicitierung mit Cantharidin **1** (500 µM und 750 µM), trotz Vorinkubation mit Phenidon **48** (1 mM bzw. 2 mM)

Nachdem wir festgestellt hatten, daß die Bohnen auf Cantharidin reagieren, stellt sich die Frage, welche molekularen Ursachen dies hat und welche Signalkaskade(n) angeschaltet werden. Als Folge eines Oxidativen Bursts, der als Reaktion auf Cantharidin beschrieben wird (s. Einleitung S. 10), wird in der Systemic Acquired Resistance (SAR) der endogene SA-Level deutlich erhöht. Im Falle des Alamethicins, das als Kanalbinder ein ähnliches Duftspektrum bei *P. lunatus* auslöst, ist sowohl eine Erhöhung der Salicylsäure auf die 90-fache Konzentration, als auch eine kurzfristige Erhöhung des JA-Levels zu beobachten (s. Abbildung 3-55). Nach Elicitierung mit Cantharidin konnte weder eine Erhöhung des endogenen Salicylat-, noch des Jasmonat-Levels festgestellt werden. Dieser Unterschied zu Alamethicin zeigt sich auch im Duftspektrum. Während die Bohne bei Alamethicin zusätzlich Methylsalicylat **47** enthält, wird dies bei Cantharidinbehandlung nicht eliciert. Das Verestern von Salicylsäure und Abgabe des Methylrestes als Duftstoff ist für die Pflanze eine Möglichkeit, den Level des Phytohormons zu regulieren, dient aber auch der Kommunikation. Diese Beobachtung unterstreicht die Aussage der quantitativen Analyse, ersetzt diese jedoch nicht.

Es ist möglich, die Jasmonsäure-Biosynthese über den Octadecanoid-Weg mit Phenidon **48** (1-Phenyl-3-pyrazolidinon) zu unterbinden [115]. Auf diese Weise kann die Duftstoffproduktion, z.B. durch Cellulysin, ein rohes Enzymgemisch von Cellulasen aus dem phytopathogenen Pilz *Trichodera viride*, die über eine JA abhängige Signalkaskade ausgelöst wird, inhibiert werden [116]. Aber auch Alamethicin verliert seine Wirkung als Elicitor der Homoterpensynthese [111].

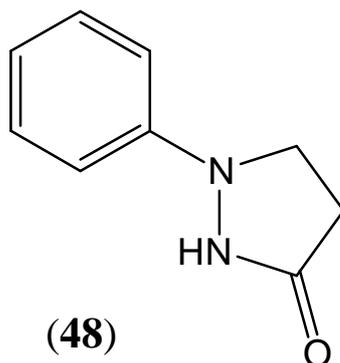


Abbildung 3-60 Phenidon **48**, unterbindet die Fettsäurehydroperoxidbildung

Die Wirkung beruht auf der reduzierenden Eigenschaft von **48**, weshalb diese Verbindung üblicherweise als photographischer Entwickler verwendet wird. Somit ist die Wirkungsweise nicht spezifisch gegen die Lipoxygenasen (LOX) des Octadecanoid-Weges gerichtet, sondern es werden alle labilen Peroxide reduziert.

Führt man das Induktionsexperiment mit Cantharidin **1** als Elicitor und Phenidon **48** als Inhibitor durch, so ist keine Abnahme oder Inhibierung der Duftproduktion zu beobachten (vgl. Abbildung 3-59). Die abgegebene Menge an Duftstoffen, vor allem von TMTT **46**, ist trotz einer Vorinkubationszeit von bis zu 36 Stunden mit bis zu 2 mM Phenidon und Elicitierung mit weniger als 1 mM Cantharidin, sogar intensiver. Somit kann eine Beteiligung des Octadecanoidweges durch Cantharidin als primären Elicitor ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit den zuvor dargestellten Beobachtungen; es konnte keine Erhöhung des Gehalts an endogener Jasmonsäure **11** in den Blättern nachgewiesen werden und auch das Duftprofil entspricht in keiner Weise dem einer Induktion durch JA **11**.

Photoakustikspektroskopie [117]

In einer Kooperation mit Dr. Frank KÜHNEMANN am Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn wurde die Produktion von Ethylen **12** nach Applikation von Cantharidin an *P. lunatus* gemessen. Ethylen **12** ist, wie bereits in der Einleitung (s. S. 10) und zu Anfang dieses Kapitels erwähnt, ein Phytohormon, das eine nichtspezifische Antwort auf verschiedene Stressfaktoren darstellt. Mit Hilfe der Photoakustikspektroskopie (PAS) ist es möglich, dieses Gas in Spurenkonzentrationen (ppb) direkt und unabhängig von der Gesamtzusammensetzung zu bestimmen.

Das Grundprinzip der PAS beruht auf der spezifischen Anregung eines Schwingungsniveaus der zu untersuchenden Verbindung mittels eines exakt abgestimmten Lasers. Die angeregten Ethylenmoleküle geben ihre Energie durch Zusammenstöße mit anderen Molekülen ab, wobei die Schwingungsenergie übertragen wird. Dadurch kommt es zu einer Temperaturerhöhung in der Zelle, was eine kurzfristige Druckerhöhung zur Folge hat. Unterbricht man die Anregung durch einen Chopper, so kommt es zu einer periodischen Druckschwankung in der Zelle, die mittels eines Mikrophons detektiert werden kann. Die Chopperfrequenz muß so eingestellt werden, daß eine akustische Resonanz angeregt wird.

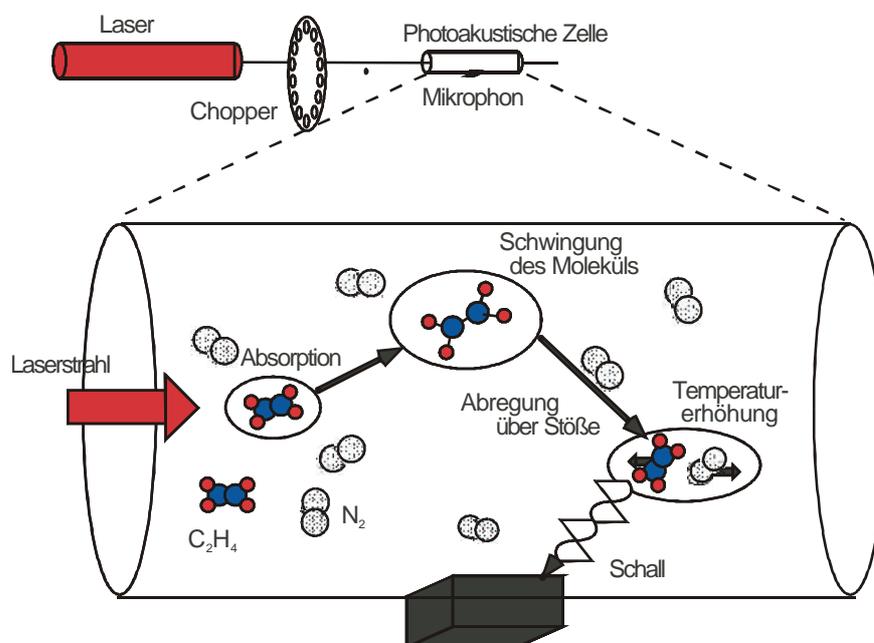


Abbildung 3-61 Allgemeine Funktionsweise eines Photoakustikspektrometers [118]

Die Versuchsdurchführung entspricht prinzipiell dem Duftbioassay. Bohnen mit zwei voll entwickelten Primärblättern wurden abgeschnitten und in Wasser in die Probenkammer gestellt. Nachdem das System sich equilibriert hatte wird die entsprechende Cantharidin- oder Kontrolllösung von aussen durch ein Septum eingebracht, so daß eine Reaktion ausschließlich auf die applizierte Substanz zurückgeführt werden kann.

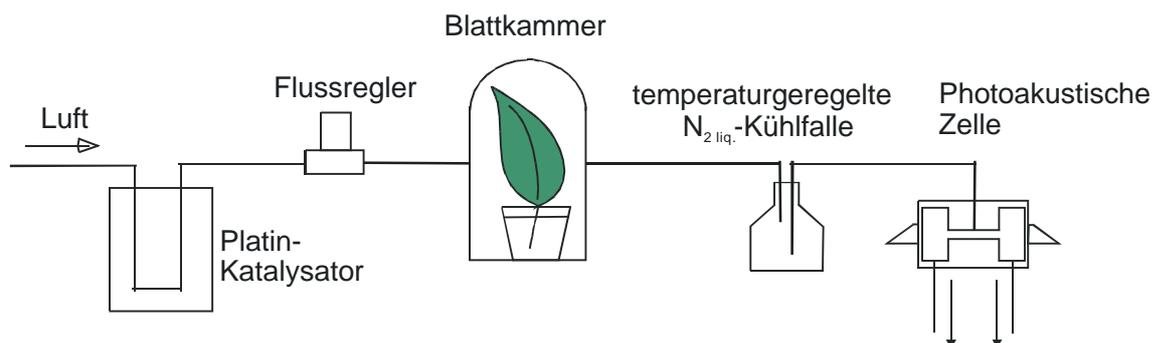


Abbildung 3-62 schematischer Aufbau des Photoakustikspektrometers zur Messung biologischer Proben [118]

In Abbildung 3-63 ist die Ethylenproduktion über zwei Tage nach Applikation von 1 mM Cantharidin 1 gezeigt. Die grauen Balken deuten die Dunkelphasen in der Probenkammer an. Das Licht wird jedoch nicht abrupt an- oder ausgeschaltet, sondern über eine halbe Stunde gedimmt, um die Dämmerung zu simulieren und die Pflanzen nicht durch plötzlichen Lichtwechsel zu stressen.

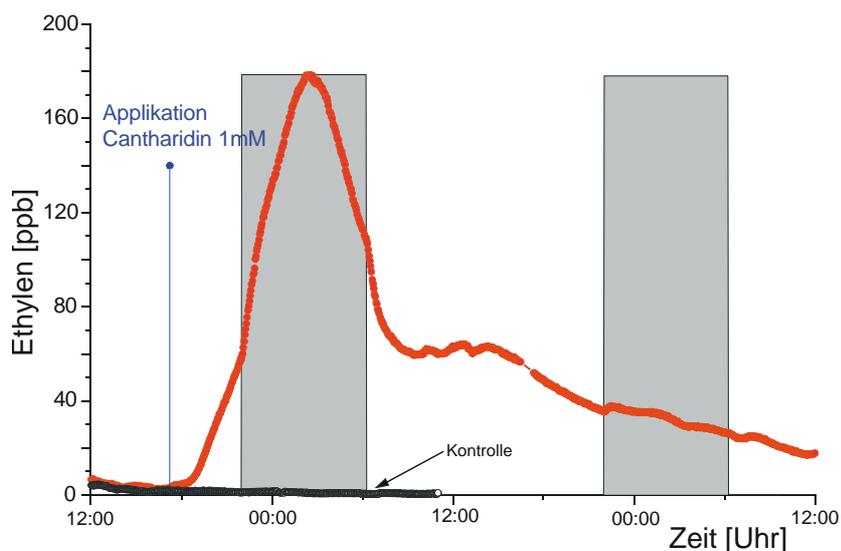


Abbildung 3-63 Ethylenproduktion von *P. lunatus* nach Cantharidinapplikation

Man erkennt, daß die Pflanze bereits nach einer Stunde mit der Ethylenproduktion auf die Applikation des Cantharidins **1** reagiert und nach etwa 9 Stunden im Maximum 180 ppb Ethylen **12** emittiert. Danach nimmt die Konzentration stetig ab, wobei im Verlaufe des zweiten Tages ein Plateau durchlaufen wird. Ganz interessant ist, daß in der Dunkelphase die Produktion stärker ist; beim Ein- und Ausschalten des Lichts zeigt die detektierte Ethylenkonzentrationskurve eine Unstetigkeit. Beim Wechsel von Hell nach Dunkel steigt die Ethylenkonzentration schneller an und am nächsten Morgen nimmt die Konzentration mit dem Wiedereinschalten des Lichts schneller ab.

Vergleicht man die Ethylenproduktion nach der Applikation mit Cantharidin mit anderen Elicitoren, z.B. Alamethicin (Abbildung 3-55), so stellt man fest, daß dieses eine ähnliche Kinetik mit nur einem Maximum zeigt. Anders ist dies, wenn man herbivore Insekten, z.B. Larven von *Spodoptera frugiperda*, auf die Bohnen setzt. In diesem Fall zeigt sich eine tageszeitlich abhängige Kinetik der Ethylenemission mit einem deutlichen Maximum am dritten Tage [110]. Der Unterschied ist mit Sicherheit darin zu sehen, daß die Tiere immer weiter fressen und die Pflanze immer wieder neu verletzen, während das Applizieren eines Elicitors über das Wasser eine einmalige Reaktion hervorruft. Auch ein Erneutes Einbringen von Elicitor nach einer Pause von einem Tag ruft keine neue Reaktion hervor.

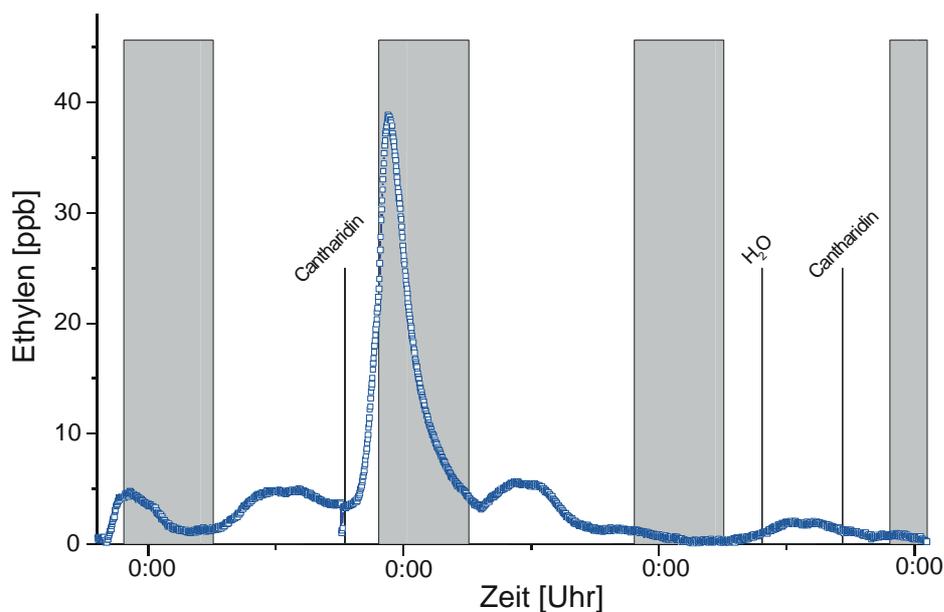


Abbildung 3-64 Ethylenemission von *P. lunatus* nach Applikation von 50 μ M Cantharidin **1**; jedoch keine Reaktion nach erneuter Zugabe des Elicitors nach 2 Tagen

In diesem Beispiel ist die abgegebene Ethylenmenge sehr viel geringer als in Abbildung 3-63. Dies resultiert aus einer weniger starken Reaktion bei niedrigerer Elicitorkonzentration. In Abbildung 3-64 ist die applizierte Menge Cantharidin mit 50 μM wesentlich geringer, die Pflanze zeigt jedoch immer noch eine sehr deutliche Reaktion. Da in diesem Fall die Pflanze emboliefrei geschnitten wurde, konnte sie eine größere Menge an Lösung aufnehmen (etwa 10 ml/Tag), während sonst und unter den Duftbioassay-Bedingungen im Exsikkator nur etwa 1-4 ml/Tag aufgenommen werden. Somit scheint die Schwellenkonzentration für das Auslösen der Ethylenbiosynthese durch Cantharidin **1** in der gleichen Größenordnung zu liegen wie die Produktion der Homoterpene im Duftbioassay, wobei zu berücksichtigen ist, daß der Nachweis von Ethylen mit dem Photoakustikspektrometer sensitiver ist.

Welches die molekularen Ursachen für diese spezifische Reaktion sind, die durch Cantharidin bei *Phaseolus lunatus* ausgelöst wird, kann nicht bestimmt gesagt werden. Cantharidin besitzt auch in vielen anderen pflanzlichen Systemen eine biologische Aktivität. In der Bohne *Phaseolus vulgaris* und in Tabak BY-2-Zellkulturen wird ein Oxidativer Burst ausgelöst, der durch die Produktion von H_2O_2 und Superoxid O_2^- aus NAD(P)H-abhängigen Oxidasen in Plasmamembran-Vesikeln als reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen werden kann [61,62]. Allerdings kann in dem von uns untersuchten System kein erhöhter Salicylatgehalt festgestellt werden, so daß man nicht von einer Reaktion im Sinne einer Hypersensitiven Response sprechen kann, die im Rahmen der SAR bis zur Apoptose befallener Zellen führen kann. Auch in Protoplasten von Kichererbsenzellen (*Cicer arietinum* L.) wird ein Oxidativer Burst durch den Protein-Phosphatase-Inhibitor **1** ausgelöst. Dieser kann jedoch durch den Protein-Kinase-Inhibitor Staurosporin **49**, ein Alkaloid aus *Streptomyces staurosporeus*, das auch antibiotische Wirkung zeigt, inhibitiert werden [119].

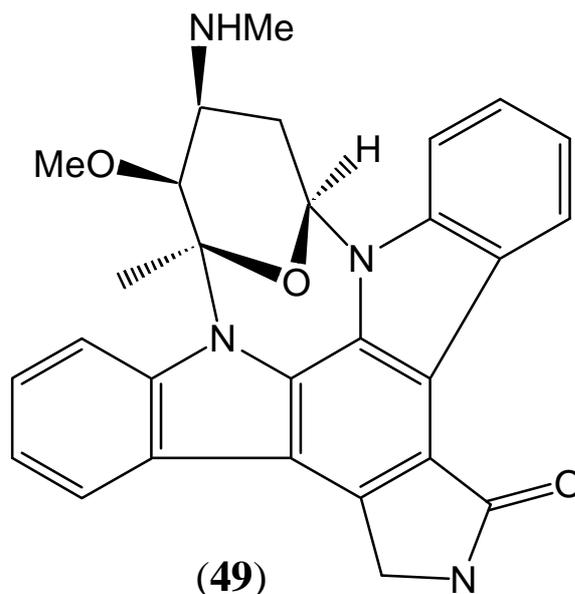


Abbildung 3-65 Staurosporin **49**, ein Protein-Kinase-Inhibitor

Somit kann die Wirkung des Cantharidins wahrscheinlich auf seine Aktivität als Inhibitor der PP1 und PP2A zurückgeführt werden, die auch in Pflanzen nachgewiesen wurden.

Ansonsten wird die Wirkweise des Cantharidins in der Literatur eher mit der der Jasmonsäure verglichen. Im Reis (*Oryza sativa*) werden durch 100–500 μM Lösungen von Cantharidin **1** oder Endothal **5** die Phytoalexine Sakurantin und Momilacton A freigesetzt, die ebenfalls als Reaktion auf erhöhte Jasmonat-Level im Sinne einer Wundantwort gebildet werden [120]. Andere Protein-Phosphatase-Inhibitoren bewirken in diesem System keine Reaktion. Weitere Beispiele für die jasmonatähnliche Wirkung von Cantharidin an pflanzlichen Zellen wird für acide Phosphatasen in Tabakblättern und für Tomatenzellkulturen, bei der die gleiche Wundantwort wie durch das Pilztoxin Xylanose ausgelöst wird, beschrieben [121]. AGRAWAL und RAKWAL gelang es, zwei Gene, die an der Wundantwort von Reis (*Oryza sativa*) beteiligt sind zu isolieren und charakterisieren [122,123]. Die Transkription beider Gene, OsPR1a und OsBBPI, kann unter anderem durch Applikation von Cantharidin oder Endothal gesteigert werden, Staurosporin **49** ist in diesem System als Gegenspieler der Protein-Phosphatase-Inhibitoren jedoch wirkungslos.

In der Signalkaskade des Alamethicins ist ein Protein-Kinase-Phosphatase-System zur Regulation des Signals involviert. Wird die Dephosphorylierung durch Cantharidin **1** blockiert, so wird das Signal nicht mehr abgeschwächt, und es kommt zu einer Reizüberflutung. In diesem Fall kann der Proteinphosphatase eine dämpfende Wirkung im Sinne der dualen Funktion (vgl. Abbildung 1-6) zugeordnet werden. Im Falle der Kichererbsen kann die Protein-Kinase durch Staurosporin **49** inhibiert werden. Somit unterbleibt die Phosphorylierung, die zur Aktivierung nötig ist, und die Signalkaskade ist unterbrochen [119].

Anhand dieses Modells ist auch die Reaktion der Limabohne zu erklären. Die Protein-Phosphatase, die durch Cantharidin **1**, oder seine Analoga Palasonin **2** und Endothal **5**, inhibiert wird, liegt sehr spät auf einer Signalkaskade, die lediglich noch die Biosynthese der Homoterpene reguliert. Daraus ergibt sich, daß keine erhöhten Level von Salicylsäure **10** oder Jasmonsäure **11** festzustellen sind, und auch nur die Homoterpene DMNT **45** und TMTT **46** gebildet und emittiert werden. Auch kann die Inhibierung der LOX durch Phenidon **48**, die im Octadecanoid-Weg an der Synthese von Jasmonsäure **11** beteiligt ist, keine Auswirkung haben. Ein solches Kinase-Phosphatase-System könnte durch die Inhibierung mittels eines passenden Kinase-Inhibitors bewiesen werden. Aber auch der Nachweis einer Protein-Phosphatase in Bohnen, die durch Cantharidin inhibiert und durch JA vielleicht sogar expremiert wird wäre ein Hinweis.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die zuvor oft beschriebenen hydrophilen Präkursoren von Cantharidin **1** und Palasonin **2** sind deren Dicarbonsäuren. Die Identifizierung gelang durch den Einsatz der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) und der Einbindung dieser Methode in die LC-MS. Der direkte Nachweis durch Veresterung der freien Säure im wässrigen Medium erbrachte weitere Bestätigung. Abgesichert wurden die Ergebnisse durch Vergleich mit dem synthetisch dargestellten racemischen Standard von Palasonin **2** und Cantharidin **1**.

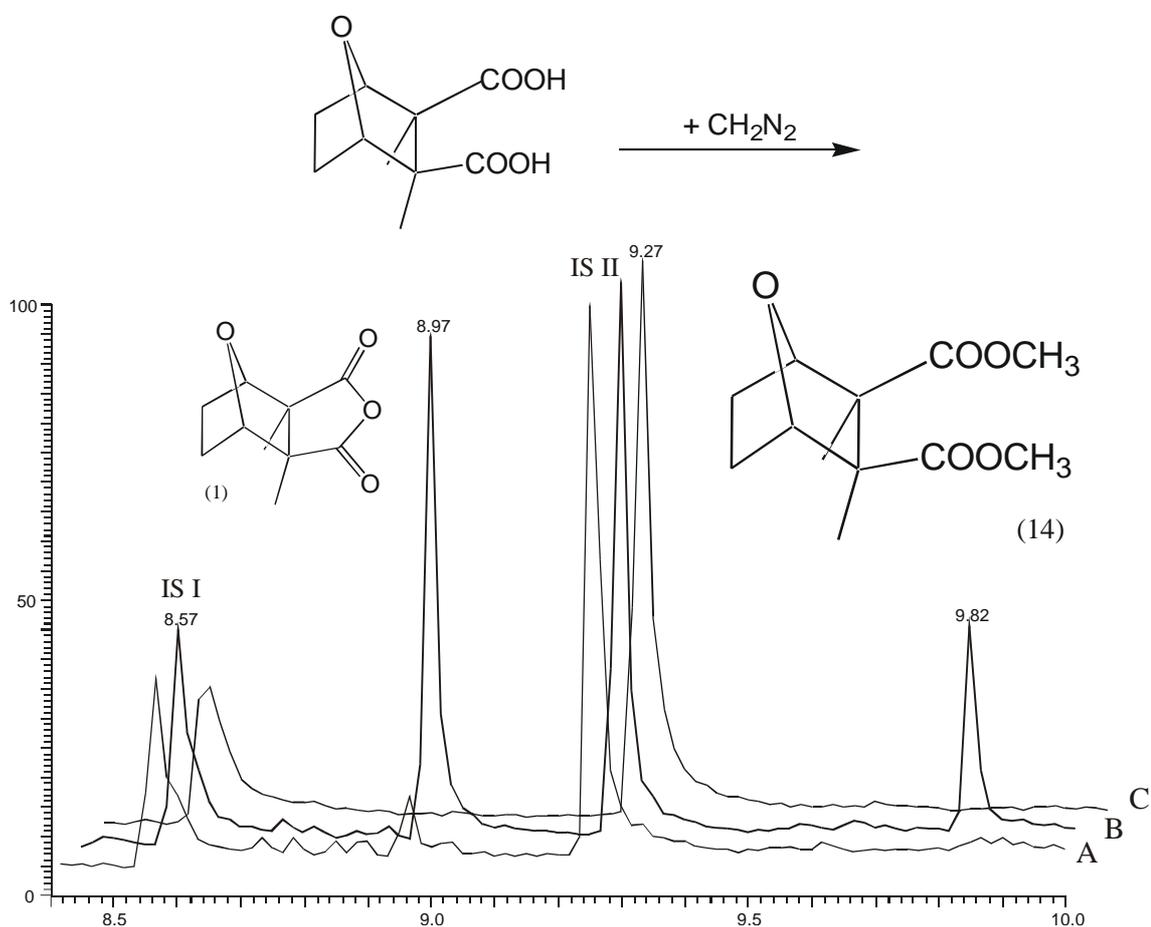


Abbildung 4-1 Nachweis der freien Cantharidindicarbonsäure durch Veresterung mit Diazomethan
 A: org. Extrakt der wässrigen Lösung enthält kein Cantharidin; IS = int. Standard
 B: org. Extrakt des wässrigen Überstandes nach Veresterung mit CH_2N_2
 C: org. Extrakt nach saurer Aufarbeitung des wässrigen Überstandes der Veresterung

Palasonin **2** als Naturstoff konnte in dieser Arbeit nicht nur aus der Pflanze *Butea frondosa* isoliert werden, sondern auch in verschiedenen Insekten neben Cantharidin **1** nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß neben der strukturellen und chemischen Ähnlichkeit beider Naturstoffe, auch ihre Biosynthese über eine vergleichbare Sequenz verläuft. Da Palasonin **2** im Gegensatz zu Cantharidin **1** chiral ist, kann die Enantiomerenverteilung einen näheren Einblick in den gemeinsamen Biosynthese-Weg der beiden Moleküle ermöglichen. Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse in den Proben konnte eine gaschromatographische Methode an einer chiralen Phase entwickelt werden. Darüberhinaus wurde die absolute Konfiguration des Palasonins mit Hilfe einer Kristallstrukturanalyse eindeutig abgesichert.

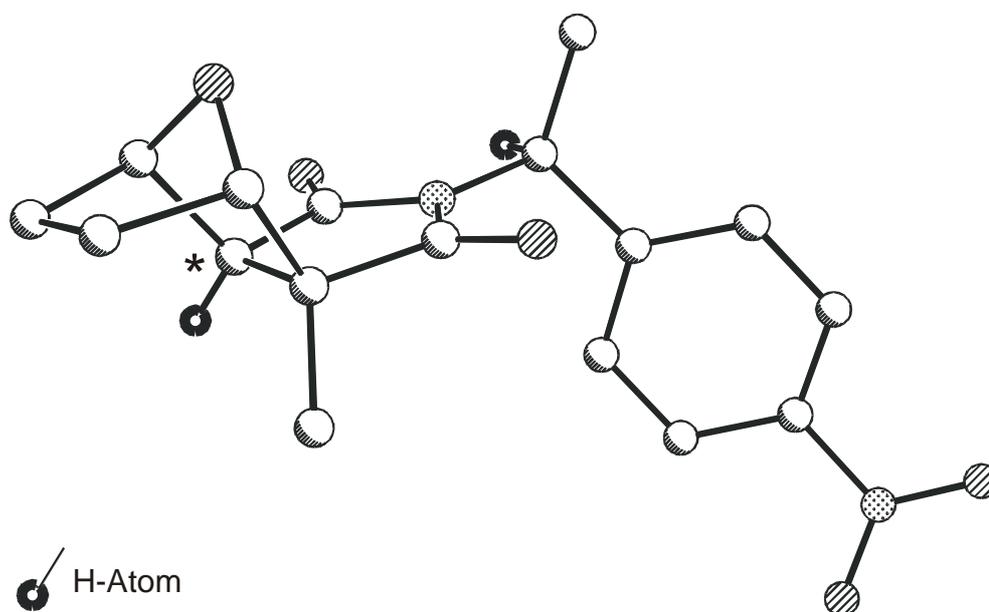


Abbildung 4-2 Die Kristallstruktur des (S)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimids von (-)-Palasonin **41** beweist die S-Konfiguration

In *B. frondosa* liegt ausschliesslich das S(-)-Enantiomer von Palasonin **2** vor, während in den Insekten beide Enantiomere mit einem geringen Enantiomerenüberschuß zu Gunsten des R(+)-Palasonins vorliegen. Aus dieser Enantiomerenverteilung lässt sich ableiten, daß die Biosynthese von Palasonin in den Pflanzen und Insekten charakteristische Unterschiede aufweisen sollte.

Zur Darstellung des S(-)-Enantiomers muß die Pflanze einen sehr spezifischen, gerichteten Mechanismus entwickelt haben. Denkbar ist die Entfernung des C11' oder

C12 des Farnesols **21** auf einer farnesolnahen Stufe durch Decarboxylierung. Danach verlaufen die weiteren Cyclisierungs- und Funktionalisierungsschritte in einer definierten Richtung, da es sonst zu einer Randomisierung käme. Das Auftreten beider Antipoden in den Käferproben kann durch eine geringere Selektivität in diesen Schritten erklärt werden. Denkbar ist aber auch die Demethylierung auf einer cantharidinnahen Stufe oder des Cantharidins selbst.

Zur näheren Untersuchung der Biosynthese von Cantharidin wurden erstmals Fütterungsexperimente mit fünffach deuteriertem Mevalolacton **43** an Oedemeriden-Larven durchgeführt. Die erfolgreiche Inkorporation des Präkursors und die daraus resultierende Markierung des Cantharidins **1** zeigen, daß die Biosynthese in den Oedemeriden nach dem gleichen Mechanismus erfolgt, wie bei den Meloiden. Der Erhalt der Deuteriummarkierung an C10 des Farnesols **21** belegt (vgl. Abbildung 3-41), daß alle Zwischenstufen an dieser Position maximal einen einfachgebundenen Sauerstoff enthalten können.

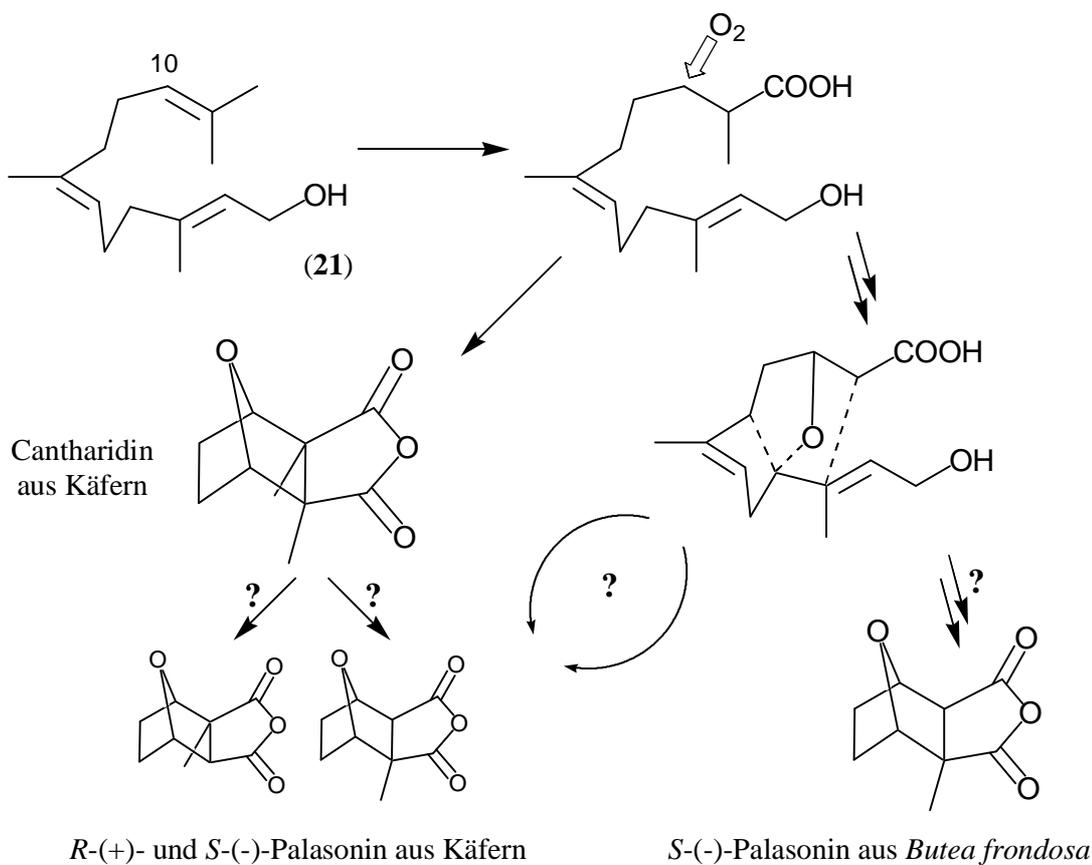


Abbildung 4-3 Die Biosyntheserouten von Cantharidin **1** und Palasonin **2** in Käfern und in *B. frondosa*

Aufschluß über die Richtung der Cyclisierungsschritte kann in weiteren Versuchen durch die Analyse von Palasonin als asymmetrische Sonde erhalten werden. Dabei ist es denkbar, zuerst die Biosynthese von *S*-(-)-Palasonin in *B. frondosa*, z.B. durch Pflanzenzellkulturen, aufzuklären und die Ergebnisse auf die Cantharidin- und Palasoninbiosynthese in Käfern zu übertragen. Eine weitere Möglichkeit ist auch der Versuch einer Inkorporation von spezifisch deuterierten Norfarnesolvorstufen in die Cantharidinbiosynthese von Oedemeriden. Dies könnte in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie beim Mevalolacton durchgeführt werden. Man würde dann Palasonin erhalten, und die Enantiomerenverhältnisse könnten eine Aussage über den Mechanismus der Cyclisierung liefern.

Cantharidin **1** zeigt an Limabohnen (*Phaseolus lunatus*) eine biologische Aktivität, die sich in der Freisetzung eines sehr spezifischen Duftmusters ausdrückt. Nach Applikation von 500 μM Cantharidin wird lediglich die Biosynthese der beiden Homoterpene Dimethylnonatrien **45** (DMNT, (E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien) und Trimethyltridecatetraen **46** (TTMT, (E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen) sowie von Ethylen **12** als allgemeinem Stress-Phytohormon beobachtet.

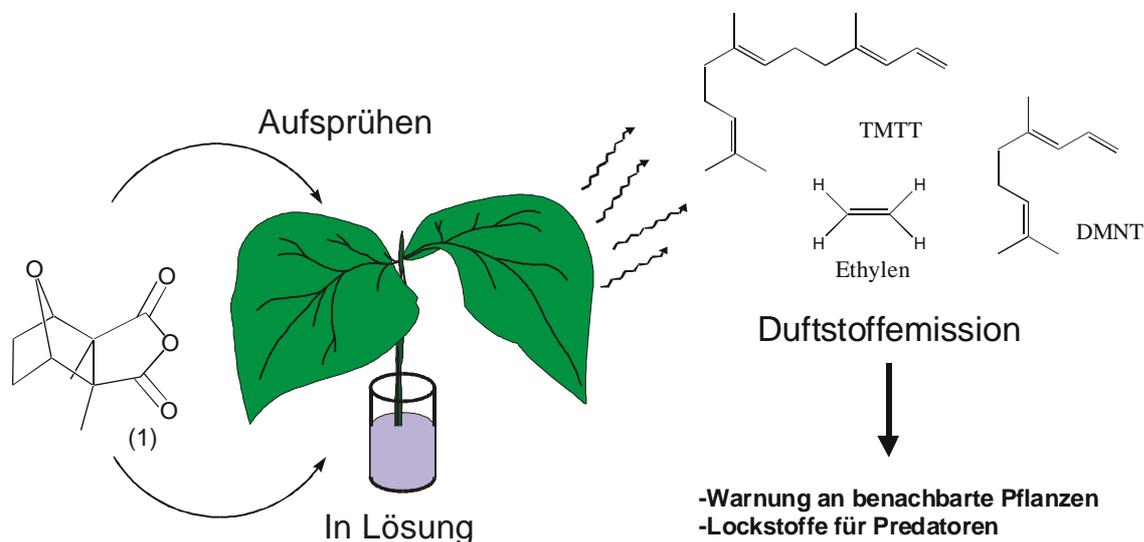


Abbildung 4-4 Cantharidin eliciert ein spezifisches Duftprofil in Blättern von *Phaseolus lunatus*

Die genaue Wirkweise auf die Signalkaskaden der induzierten Abwehr der Pflanzen ist noch nicht bekannt. Vergleicht man die Reaktion der Pflanzen mit der auf Alamethicin, so stellt man fest, daß dieses als Depolarisator von Zellmembranen sehr früh die SAR und HR über die Phytohormone Jasmonsäure **11** (JA) und Salicylsäure **10** (SA) und weiter die Biosynthese der Homoterpene anspricht. Bei der Induktion durch Cantharidin **1** sind weder diese Phytohormone, noch die Lipoxygenasen (LOX), an der Duftproduktion beteiligt. Die Aktivität des Cantharidins **1** greift erst sehr spät in die Biosynthese der Homoterpene ein. Aus seiner bekannten Aktivität als Protein-Phosphatase-Inhibitor und der vergleichbaren Wirkung wie Alamethicin stellt Cantharidin ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung der Homoterpen-Biosynthese und der Signalkaskaden der induzierten pflanzlichen Verteidigung bei *P. lunatus* dar.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Chemikalien

Geräte

NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500
Massenspektrometer	Micromass MasSpec 2
IR-Spektrometer	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
UV-Spektrometer	Perkin-Elmer Lambda 2 Spektrometer
Kristallstruktur	Nonius KappaCCD Diffraktometer
Schmelzpunkte	Büchi B-540
GC/MS	Finnigan GCQ Finnigan MAT Magnum
LC/MS	Finnigan LCQ
Äkta	Äkta <i>explorer</i> 10, Pharmacia Biotech
HPLC	Kontron: Pumpe 325, Gradient-Former 340, UV-Detektor 330
Lichtstreu-Detektor	Polymer-Laboratories P 940
Analytische DCs	PSC Fertigplatten Si 60 F254, 2mm, Merck
Strippingpumpen	Miniaturdrehchieberpumpen Fa. Fürgut, 88139 Aitrach, Nennspannung 12V, Betriebsspannung 9-10 V

Chemikalien

Alle Chemikalien sind, sofern nicht anders angegeben, kommerziell erhältlich.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Nachweis von Cantharidin und Palasonin

Cantharidin und Palasonin in ihrer wasserlöslichen Form (Dicarbonsäuren) wurden durch Erhitzen der angesäuerten Lösung (1 N HCl) in die Anhydride überführt und mittels GC/MS nachgewiesen.

Die Reaktion wurde standardmäßig in einem 4-ml-Reaktionsvial mit Schraubkappe durchgeführt. Man nimmt bis zu 2 ml der wässrigen Lösung und versetzt diese mit 1/10 Volumen konzentrierter Salzsäure. Die saure Lösung wird für etwa 30 Min im Heizblock auf 110° C erhitzt und nach dem Abkühlen drei mal mit je mind. 200 µl Chloroform extrahiert. Die Naturstoffe liegen nun als Anhydride in der organischen Lösung vor.

Die gaschromatographische Trennung erfolgte nach einer split- oder splitless-Injektion von 0,1 – 3 µl der Chloroform-Lösung auf einer fused-silica-Säule (DB-5) unter temperaturprogrammierten Bedingungen (60° C, 2 min isotherm, 20° C/min bis 280° C, 3 min isotherm).

Palasonin und Cantharidin konnten durch Vergleich mit Standards aufgrund ihrer Retentionszeiten und ihrer typischen Massenspektren (vgl. Abbildung 3-1 und Abbildung 3-22) sicher nachgewiesen werden. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Peakflächen im Totalionenstromchromatogram und der Ionenspektren der Basispeaks ($m/z = 82$ und 114 , bzw. $m/z = 96$ und 128).

Veresterung von wässrigen Proben mit Diazomethan

Zum Nachweis der Dicarbonsäuren von Palasonin und Cantharidin in wässriger Lösung wurden diese mit Diazomethan zu den Dimethylestern umgesetzt und mittels GC/MS nachgewiesen.

Dazu nimmt man ein möglichst geringes Volumen der wässrigen Lösung, nicht mehr als 0,5 ml, verdünnt diese Lösung mit dem doppelten Volumen Methanol und säuert mit wenigen Tropfen verdünnter Salzsäure bis auf einen pH-Wert von 0 bis 1 an. Zu dieser

Lösung gibt man langsam(!) soviel einer frisch hergestellten etherischen Lösung von Diazomethan, bis das starke Aufschäumen bei der Zugabe unterbleibt. Es entsteht eine homogene, schwach gelbe Lösung. Dieser Schritt kann nach dem Abdampfen des Ethers aus der Reaktionslösung wiederholt werden. Man wartet bis das überschüssige Diazomethan abreagiert hat, und engt die Lösung im Argonstrom ein. Die wässrige Lösung wird dreimal mit mind. 200 µl Dichlormethan extrahiert und dann unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie die Anhydride analysiert. Die Identifizierung der Diester erfolgt im GC/MS anhand ihrer Retentionszeiten (vgl. Abbildung 3-19, IS II = **26**) und durch Vergleich ihrer Massenspektren (s. Abbildung 3-11 und Abbildung 3-20).

Dimethylester **26** von Palasonin:

MS m/z (%): 197 (100); 169 (60); 141 (40); 137 (30); 127 (25);
125 (15); 109 (30); 81 (35)

HR-MS (APCI) m/z $[M+H]^+$: berechnet 229,1076; gemessen 229,1071

IR (GC) ν $[cm^{-1}]$: 941, 1009, 1054, 1105, 1181, 1222, 1353, 1439, 1764

1H -NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 1,44 (s, 3H, CH_3); 1,65-1,87 (m, 4H, 2x CH_2);
2,34 (s, 1H, CH); 3,65 (s, 3H, OCH_3); 3,66 (s, 3H, OCH_3);
4,73 (d, 5,2 Hz, 1H, OCH); 4,83 (d, 4,9 Hz, 1H, OCH)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 21,6 (CH_3); 23,8 (CH_2); 29,9 (CH_2); 51,9 (OCH_3);
52,4 (OCH_3); 57,9 ($C_{qu.}$); 60,1 (CH); 79,0 (OCH);
82,2 (OCH); 172,4 (COO); 174,2 (COO)

Dimethylester **27** von Cantharidin:

MS m/z (%): 211 (100); 183 (70); 155 (10); 141 (10); 139 (10); 91 (20)

HR-MS (APCI) m/z $[M+H]^+$: berechnet 243,1232; gemessen 243,1216

Die Salzlösung zur Maskierung der Dicarbonsäuren bestand aus 4,4 mg/ml $(NH_4)_2SO_4$, 14,2 mg/ml NaCl, 3,0 mg/ml $CaCl \times 2 H_2O$ und 1,0 mg/ml $MgSO_4 \times 7 H_2O$.

5.3 Insekten

Sammeln und Haltung der *Oedemera*-Käfer

Die Käfer wurden im Zeitraum von April bis August 2000 im Freiland an verschiedenen Standorten in der Umgebung von Jena und Karlsruhe gesammelt. Gute Standorte zeichnen sich durch eine sonnige Lage und einen dichten Bewuchs mit wilden, blühenden Pflanzen wie der Gemeinen Schafgarbe, Margeriten, Wiesen-Bärenklau, Kriechendem Hahnenfuß und Kamille aus. Von diesen wurden die Käfer einzeln heruntergesammelt, und im Labor mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels identifiziert [101]. Die einzelnen *Oedemera*-Arten wurden separat in belüfteten Plastikbehältern an einem warmen Ort, direkt unter den Neonröhren, mit einer Tag/Nacht-Rhythmik von 16/8 Stunden gehalten. Als Nahrung diente käufliches Pollengranulat (Reformhaus) und Wasser. Zur Erleichterung der Eiablage wurde ein aufgeschnittener, getrockneter Bärenklaustengel mit in das Bassin gelegt. Dieses wurde jeden zweiten Tag gesäubert und auf Eier, die bevorzugt in Nischen am Bärenklaustengel abgelegt wurden, untersucht.

Aufzucht und Fütterungsexperimente mit *Oedemera*-Larven

Jedes Eigelege wurde vorsichtig in eine Petrischale (ohne Nocken) überführt und der Deckel mit einem angefeuchteten Filterpapier ausgelegt. Um eine Auskühlung und das Eintrocknen der Petrischalen durch Zugluft zu verhindern, wurden diese in einen Behälter gestellt und mit Alufolie abgedeckt. Auch die Eigelege wurden spätestens jeden zweiten Tag kontrolliert. Nach 6 bis 10 Tagen schlüpfen die Larven. Nachdem diese ihre eigene Eihülle verzehrt hatten, wurden sie entsprechend ihres Schlüpfdatums in eine neue Petrischale umgesetzt. Die beste Nahrung für die Larven ist ein fester Brei, dem die isopenmarkierte Testverbindung, z.B. Mevalolacton **43**, zugegeben wurde:

150 mg	feines Mehl von weißen Bohnen
100 mg	Pollengranulat
100 mg	Agar
2,5 mg	Mevalolacton-d ₅ 43
1 ml	Leitungswasser

Die Komponenten wurden alle zusammengegeben, verrührt und durch kurzes Erwärmen verfestigt. Die Nahrung kann mehrere Wochen im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.

Die Larven mußten spätestens alle zwei Tage auf frisches Futter umgesetzt werden, da der Brei sehr schnell austrocknet und Schimmelpilz ansetzen kann, dessen Sporen dann mit den Käfern immer weiter übertragen werden. Es wurde noch kein Versuch unternommen, dem Brei ein Konservierungsmittel zuzugeben. Bei der Kontrolle der Larvenzucht wurden tote Tiere unter Angabe ihrer Art, dem Legedatum, dem Schlüpfdatum und ihrem Alter bzw. der Tage auf markierten Futter in Eppendorfgläsern bis zur Analyse auf -80°C eingefroren.

Herstellen und Analytik der *Oedemera*-Extrakte

Erst wenn alle Larven eines Eigelege verendet oder getötet waren, wurden sie in einem einheitlichen Ansatz aufgearbeitet. Dazu wurden sie mit Hilfe eines Mini-dispergiergerätes in 500 μl einer alkalischen Lösung (1% $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH = 10) aufgeschlossen und parallel mit je drei mal 200 μl Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde durch kurzes Zentrifugieren (1 Min. 14.000 rpm 4°C) von der alkalischen Phase separiert und durch Pipettieren abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 200 μl konzentrierter Salzsäure angesäuert und für 30 Min. auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die saure Lösung drei mal mit 200 μl Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungen wurden im Argonstrom eingengt, mit 100 μl Chloroform verdünnt und direkt im GC/MS vermessen.

Bestimmung des Markierungsgrads

Der Markierungsgrad von Cantharidin nach Verfütterung von d_5 -Mevalolacton an *Oedemera*-Larven wurden aus den integrierten Ionenspuren von deuteriertem und natürlichem, nichtdeuteriertem Cantharidin **1** der Gaschromatogramme bestimmt. Prinzipiell ist dazu das $[M+H]^+$ -Ion geeignet, das man unter CI-Bedingungen erhält. Weiterhin wurde die Fragmentation des 2,3-Dimethylbernsteinsäureanhydrids mit der Masse $m/z = (128 + d_x)$, das man unter EI-Bedingungen erhält. Das 2,3-Dimethylfuranradikalkation der Masse $m/z = (96 + d_x)$ ist nicht geeignet, da die vierfach deuterierte Fragmentation von einer undeuterierten Fragmentation der Masse $m/z = 100$ überlagert wird; ihre relativen Anteile können deshalb nicht quantifiziert werden.

In der Nettoreaktion (vgl. Abbildung 3-41) werden lediglich die Markierungen aus zwei Isopreneinheiten in das Cantharidin eingebracht, da alle Markierungen aus der dritten Isopreneinheit durch das Entfernen eines C4-Segments verloren gehen. Ein Molekül, das zwei markierte IPP enthält, ist demnach 100 % markiert, während der Einbau von nur einer Isopreneinheit in das Cantharidin nur einen Markierungsgrad von 50 % ergibt. Aus diesem Grund werden die Quantitäten von einfach markiertem Cantharidin nur zur Hälfte eingerechnet, und für den Markierungsgrad ergibt sich folgende Grundformel:

$$\% \text{Isotopenmarkierung} = \frac{1x/2 + 2x}{\Sigma} * 100 \quad \text{Gleichung 5-1}$$

Eine Isopreneinheit (A) bringt drei Deuteriumatome in einer Methylgruppe (C3' des Farnesols) mit ein und die andere Einheit (B) ein Deuteriumatom (C10) und drei weitere Deuteriumatome aus einer zweiten Methylgruppe (C12) nur zu 50 %. Somit ergibt sich:

$$1x = A + (B + CD_3) + (B - CD_3) \quad \text{Gleichung 5-2}$$

$$2x = [A + (B + CD_3)] + [A + (B - CD_3)] \quad \text{Gleichung 5-3}$$

Der Gesamtgehalt an Cantharidin setzt sich zusammen aus den Anteilen der deuterierten Produkte und dem natürlichen Cantharidin. Bei diesem muß zusätzlich noch der Anteil des natürlichen Isotopomeren berücksichtigt werden, während dieses bei den Anteilen des deuterierten Cantharidin vernachlässigt werden konnte.

$$\sum = 0x + 0x_{\text{Isotop}} + 1x + 2x \quad \text{Gleichung 5-4}$$

Bei der Berechnung des Markierungsgrads über das $[M+H]^+$ -Ion werden die Integrale aus fünf Ionenspuren berücksichtigt:

$$\begin{aligned} m/z = 197 & \quad 0x \\ m/z = 198 & \quad 0x_{\text{Isotop}} + (\text{B-CD}_3) \\ m/z = 200 & \quad \text{A} \\ m/z = 201 & \quad (\text{B+CD}_3) + [\text{A} + (\text{B-CD}_3)] \\ m/z = 204 & \quad [\text{A} + (\text{B+CD}_3)] \end{aligned}$$

Aus diesen Integralen kann man die Anteile der einzelnen Einheiten berechnen:

$$\begin{aligned} [\text{A} + (\text{B+CD}_3)] &= [\text{A} + (\text{B-CD}_3)] = [204] \\ (\text{B+CD}_3) &= (\text{B-CD}_3) = [201] - [204] \\ \text{A} &= [200] \end{aligned}$$

Damit ergibt sich für die Berechnung des Markierungsgrads über das $[M+H]^+$ -Ion folgende, bereits vereinfachte, Formel:

$$\% \text{ Isotopenmarkierung} = \frac{\left(\frac{1}{2}[200]\right) + [201] + [204]}{[197] + [198] + [200] + [201] + [204]} * 100 \quad \text{Gleichung 5-5}$$

Am Beispiel einer Larve, die 75 Tage auf dem imprägnierten Futter aufgezogen wurde, ergibt sich aus der Integration der Ionenspuren des Cantharidins im Gaschromatogram ein Markierungsgrad von 4,2 % (s. Anhang).

$$\frac{\frac{22201}{2} + 10369 + 3084}{482291 + 59998 + 22201 + 10369 + 3084} * 100 = 4,2\% \text{ Isotopenmarkierung}$$

Im Falle der maximal sechsfach deuterierten Fragmentation des 2,3-Dimethylbernsteinsäureanhydrids setzen sich die einzelnen Ionen wie folgt zusammen:

$$m/z = 128 \quad 0x + (B-CD_3)$$

$$m/z = 129 \quad 0x_{\text{Isotop}}$$

$$m/z = 131 \quad A + (B+CD_3) + [A + (B-CD_3)]$$

$$m/z = 134 \quad [A + (B+CD_3)]$$

Daraus ergibt sich folgende Formel für die Berechnung:

$$\% \text{Isotopenmarkierung} = \frac{\left(\frac{2}{3} * ([131] - [134])\right) + (2 * [134])}{[128] + [129] + [131] + [134]} * 100 \quad \text{Gleichung 5-6}$$

Aus der gleichen Probe wie zuvor ergibt sich aus dem EI-Spektrum des Cantharidins ein Markierungsgrad von 5,2 % (s. Anhang).

$$\frac{\left(\frac{2}{3} * [30823 - 4317]\right) + (2 * 4317)}{437162 + 30852 + 30823 + 4317} * 100 = 5,2\% \text{Isotopenmarkierung}$$

Zur besseren Darstellung und Vergleichbarkeit sind die Werte für den Gesamtcantharidingehalt innerhalb einer Messreihe jeweils auf den höchsten Cantharidingehalt normiert worden (100%). Eine Probe wurde an unterschiedlichen GC/MS-Geräten vermessen; als CI-Gas wurde im GCQ Methan verwendet, während im Magnum Acetonitril eingesetzt wurde.

5.4 Pflanzen

Anzucht von *Phaseolus lunatus*

Die Pflanzenanzucht von *P. lunatus* Ferry Morse var. *Jackson Wonder Bush* erfolgte in handelsüblicher Anzuchterde, die vor Gebrauch 3 Minuten bei 900 W in der Mikrowelle sterilisiert wurde. Die Temperatur im Pflanzraum schwankte zwischen 22 und 26° C, bei einer Luftfeuchtigkeit von 70-80%. Die Photophase betrug 14 Stunden ($270 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$). Jeweils 2 Samen wurden in einem Plastiktopf ($d = 5,5 \text{ cm}$) über 10-15 Tage angezogen, bis sie zwei voll entwickelte Primärblätter hatten.

Elicitierungsexperimente

In diesem Stadium wurden die Elicitierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen mit einer Rasierklinge 3 cm unterhalb der Blattansätze abgeschnitten und sofort in Eppendorfgefäße mit 2 ml der Testlösung gestellt. Jeweils eine Pflanze wurde mitsamt der Nährlösung in einen geschlossenen Exsikkator gestellt und für 28 h bei 25° C und einem 16/8-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

Herstellen der Testlösungen

Für die Testlösung wurde der Elicitor in 10 μl DMSO vorgelöst und dann mit 10 ml Leitungswasser verdünnt. Bei schwer wasserlöslichen Verbindungen hat es sich als vorteilhaft herausgestellt, die DMSO-Lösung in schnell gerührtes Wasser langsam einzubringen, da ansonsten die Substanz wieder ausfallen kann. Kontrollversuche mit wässrigen DMSO-Lösungen zeigten keine biologische Aktivität.

Sammeln und Analytik der Duftstoffe

Die Duftstoffe wurden im sogenannten „Closed-Loop“-Verfahren (Abbildung 3-50) 4 h nach Elicitierung für 24 Stunden gesammelt. Bei diesem wird die Luft im Exsikkator durch eine Miniaturdrehchieberpumpe kontinuierlich über einen Aktivkohlefilter (1 mg Aktivkohle, CLSA-Filter, Le Rousseau de Montbrun, F-09350) geleitet, wobei die flüchtigen Verbindungen aus der Luft adsorbiert werden [124]. Diese wurden mit 40 μl

einer Dichlormethanolösung mit internem Standard (50 μM 1-Bromdecan) wieder von dem Filter eluiert und die Lösung wurde direkt im GC/MS unter standardisierten Bedingungen getrennt und detektiert.

GC: fused-silica-Säule (DB-5; 0,25 μm x 30 m x 0,25mm)

Helium als Trägergas mit 40 cm min^{-1}

50° (2 min), dann mit 10° min^{-1} bis 200°, und mit 35° min^{-1} bis 280° C (3 min)

MS-Detektor, Messbereich: 35-450 Da.

Kinetik der Duftstoffbiosynthese

Bei den Versuchen zur Kinetik der Duftstoffbiosynthese wurde unmittelbar nach dem Einsetzen der Pflanzen in die Testlösung und mit dem Stripping begonnen und nach der jeweiligen Zeit (4, 8, 12 Std.) abgebrochen. Alle Tests wurden zur gleichen Tageszeit (10:00 Uhr) angesetzt, um eventuelle Tag/Nacht-Effekte auszuschliessen.

Inhibierungsexperimente der Duftstoffbiosynthese

Um die Lipoxygenasen (LOX) des Octadecanoid-Weg zu inhibieren, wurden die Bohnen vor der Elicitierung mit 1 mM bzw. 2 mM Phenidon **48** (1-Phenyl-3-pyrazolidinon) für 16 bzw. 22 Stunden über Nacht vorinkubiert. Am Folgetag wurde ab 10:00 Uhr eine Duftstoffkinetik aufgenommen. Dazu wurde die Phenidon-Lösung zusätzlich mit 500 μM bzw. 750 μM Cantharidin versetzt. Eine Leerreihe wurde nur mit Phenidon behandelt und eine Blindreihe wurde nur mit Wasser vorinkubiert und nur mit Cantharidin elicitiert.

5.5 Extraktionen und Aufreinigungen

Dicarbonsäure von Palasonin aus den Samen von *Butea frondosa*

Für die Extraktion der vermuteten hydrophilen Vorstufe des Palasonins aus den Samen von *Butea frondosa* wurde eine schonende Methode entwickelt, die keine Hitzefällung zur Abtrennung von Proteinen, sowie Entfetten im Soxhleth-Extraktor oder Reinigung an Kieselgel beinhaltet, da eine Spaltung eines empfindlichen Konjugats unterbunden werden sollte. Nach allen Schritten der Aufreinigung wurde durch saure Aufarbeitung und GC/MS-Analyse (s S. Seite 95) auf das Vorliegen der Vorstufe getestet. Zusätzlich wurde je ein Blind- und ein Leerwert untersucht.

Zuerst wurden 20,32 g Samen grob gemörsert und anschliessend mit dem Ultra-Turrax fein gemahlen und gleichzeitig mit Essigsäureethylester extrahiert. Das Lösungsmittel wurde dreimal abfiltriert und ersetzt, bis eine nur noch leicht gelbe Lösung entstand. Nach Abtrennen des Essigsäureethylesters, der frei von Palasonin war, wurde der Präkursor mit Wasser aus dem Rückstand extrahiert. Dies geschah durch Schütteln der Suspension auf einem Kreisschüttler über Nacht. Viermal 6,25 ml Filtrat wurden jeweils mit 25 ml Methanol versetzt, so daß eine 80 %ige methanolische Lösung entstand, aus der über Nacht bei 4° C ein Teil der denaturierten Proteine ausfiel, die durch Zentrifugation (3', 10.000 rpm, 50 ml Falcon-Tube) abgetrennt wurden. Der Überstand wurde im Vakuum vorsichtig eingeengt bis der größte Teil des Methanols entfernt war und das ursprüngliche Volumen von jeweils ca. 6 ml erreicht war. Ein weiterer Teil der Proteine wurde durch Ultrafiltration in einer 10 ml Amicon-Zelle durch sukzessive Verringerung der Molekulargewichtausschlußgrenze (MWCO) von 10 kDa über 3 kDa auf 1 kDa abgetrennt. Über die Schritte der Proteinabtrennung verblieb die Palasonindicarbonsäure immer in Lösung. Die Filtrate wurden durch Gefriertrocknung entwässert und man erhielt 919 mg (entspricht einem Drittel der Gesamtmenge) eines bräunlichen Feststoffs. Dieser wurde wieder mit 5 ml einer 20 mM Lösung von Ammoniumacetat aufgenommen, so daß eine Lösung mit einer Endkonzentration von 183,8 mg/ml des extrahierten Material entstand; diese diente als Stammlösung für die weitere chromatographische Aufreinigung.

Die beiden wichtigsten Schritte zur Aufreinigung und Charakterisierung des Palasonin-Präkursors aus den Samen von *B. frondosa* waren die Anionenaustausch- (AEX) und die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC).

Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde an einer *Resource Q*-Säule am Äkta explorer 10-System der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Säule hat bei einem Gesamtvolumen von 2 ml ein Gelvolumen von 1 ml, das aus einer Polystyren / Divinylbenzen-Matrix, welche quartäre Ammoniumionen als Anionenbindungspartner besitzt. In seinem Verhalten wird dieses Material als starker Anionenaustauscher eingestuft. Die Chromatographie wurde mit Ammoniumacetat-Lösung (pH = 7,2) bei einer Flußrate von 2 ml/min und einem linearen Gradienten von 20 mM (Laufmittel A) bis 1 M (Laufmittel B) durchgeführt. Nach Injektion von 100 µl der Probenlösung wurde nichtgebundenes Material durch Spülen mit 5 Säulenvolumina Laufmittel A eluiert. Danach setzte der Gradient mit 5 % / ml von Laufmittel A auf Laufmittel B ein. Es wurden Fraktionen von 1 ml geschnitten, aus denen Palasonin nach der AAV (s. S. 95) nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde die UV-Absorbtion bei 215, 254 und 280 nm und die Leitfähigkeit der Lösung detektiert.

Hydrophile-Interaktions-Chromatographie

Die hydrophile Interaktionschromatographie wurde an einer Diol-Säule (Merck Diol-100 5 µm 4/240 mm) durchgeführt. Der Fluß wurde mit einem Laufmittelgemisch aus Acetonitril (A) und 6 mM Ammoniumacetat (B) konstant bei 1 ml/min gehalten. Nach der Injektion von 20 µl Probenlösung wurde 20 min isokratisch mit 80:20 (A:B) chromatographiert, ehe ein linearer Gradient über 10 min die Laufmittelzusammensetzung auf 70:30 (A:B) änderte, welche für weitere 10 min beibehalten wurde. Detektiert wurde die UV-Absorbtion bei 190 und 215 nm. Zusätzlich konnte ein Lichtstredetektor integriert oder manuell fraktioniert werden.

Dicarbonsäure von Cantharidin aus *Oedemera flavipes*

Die Aufreinigung der wässrig extrahierbaren Vorstufe des Cantharidins aus Käfern gleicht weitestgehend der Reinigung der Dicarbonsäure von Palasonin aus den Samen von *Butea frondosa*. Es wurden vier adulte Käfer der Species *Oedemera flavipes*, die im Sommer 1999 in der Umgebung von Karlsruhe gefangen wurden, zuerst gemörsert und dreimal mit je 3 ml Ethylacetat mit einem Minidispergiergerät aufgeschlossen. Die organische Lösung, die kein Cantharidin enthielt, wurde im Vakuum abfiltriert und anschliessend der wasserlösliche Präkursor dreimal mit 2 ml 20 mM Ammoniumacetat extrahiert. Die erhaltenen wässrigen Lösungen wurden in Portionen zu 1,5 ml mit jeweils 6 ml Methanol versetzt. Aus dieser 80 %igen methanolischen Lösung fielen über Nacht bei 4° C ein Teil der mitgelösten Proteine aus, welche durch Zentrifugation (15 min., 15.000 rpm) abgetrennt wurden. Die anschliessende Ultrafiltration bis zu einer Molekulargewichtsausschlußgrenze (MWCO) von 3 kDa wurde direkt mit der methanolischen Lösung durchgeführt. Die Cantharidindicarbonsäure verblieb über diese Aufreinigungsschritte immer in der Lösung. Das Filtrat wurde danach im Vakuum auf 200 µl aufkonzentriert und diente als Stammlösung für weitere Reinigungsschritte.

Neben den schon zur Aufreinigung der Palasonindicarbonsäure verwandten Chromatographie-Techniken kam auch die Größenausschlußchromatographie (SEC) zum Einsatz.

Größenausschlußchromatographie

Die Gelfiltration wurde am Äkta *explorer* 10 an einer *Superdex Peptide PE 7,5/300*-Säule der Firma Pharmacia Biotech (Trennbereich von 50 bis 7000 Da) durchgeführt. Als Laufmittel wurde 20 mM Ammoniumacetat verwendet und mit einem Fluß von 0,2 ml/min isokratisch eluiert. Das Probenvolumen wurde möglichst klein gehalten, meist 10 µl, und nach der Injektion wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 ml geschnitten. Detektiert wurde die UV-Absorbtion bei 215, 254 und 280 nm, sowie die Leitfähigkeit des Eluenten. Zusätzlich konnte der Präkursor aus den Fraktionen durch saure Aufarbeitung, Veresterung mit Diazomethan (s S. 95) oder durch ESI-MS nachgewiesen werden.

(-)-Palasonin aus den Samen von *Butea frondosa*

Für die Extraktion von hochreinem Palasonin aus den Samen von *Butea frondosa* zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde eine modifizierte Variante des in der Literatur beschriebenen Verfahrens angewandt [4,11,125].

140 g Samen wurden fein gepulvert und über 24 Std. in einer 500 ml Soxhlet-Apparatur mit Petrolether (PE 40-60) entfettet. In dem unpolaren Extrakt konnte kein Palasonin, auch nicht nach saurer Aufarbeitung, nachgewiesen werden. Der Rückstand wurde dann mit *iso*-Propanol / HCl_{konz.} (500 / 5 ml) über Nacht bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Filtration wurde die klare alkoholische Lösung im Vakuum aufkonzentriert und mit 2 N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Lösung wurde intensiv mit Chloroform ausgeschüttelt, und die organische Phase auf 1 g Kieselgel aufgezogen. Dieses wurde erneut in einer Soxhlet-Apparatur (100 ml) mit PE 40-60 und Ether extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 1,266 g eines rohen Produktes, das durch Umkristallisation aus PE 40-60 weiter aufgereinigt wurde. Etwa die Hälfte des aufgereinigten Palasonins (255 mg von 466 mg) wurde für die Derivatisierung mit dem enantiomerenreinen (*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylamin **40** zur Kristallstrukturbestimmung eingesetzt. Unter der Annahme einer vollständigen Extraktion und einer quantitativen Umsetzung, wurde von dem gereinigten Derivatisierungsprodukt auf den Gesamtgehalt an Palasonin zurückgerechnet. Dieser betrug mindestens 700 mg/kg Samen. Für eine weitere Aufreinigung des Anhydrids wurde dieses als Dicarboxylat in einer wässrigen Bicarbonat-Lösung gelöst und intensiv mit PE 40-60 und Chloroform extrahiert. Nach Ansäuern mit 2 N Salzsäure auf pH = 0 konnte Palasonin wieder als Anhydrid mit Chloroform extrahiert werden. Dieser Extrakt wurde wiederum nach Entfernen des Lösungsmittels in Wasser gelöst und auf eine SPE-LC-18-Kartusche (500 mg) geladen. Von dieser konnte Palasonin mit Wasser als Dicarboxylat eluiert werden, und man erhielt das Anhydrid durch Ansäuern und Extraktion mit Chloroform zurück.

Auf diese Weise erhält man enantiomerenreines *S*-(-)-Palasonin, das in seinem Schmelzpunkt und den spektroskopischen Daten mit dem racemischen, synthetischen Palasonin übereinstimmt.

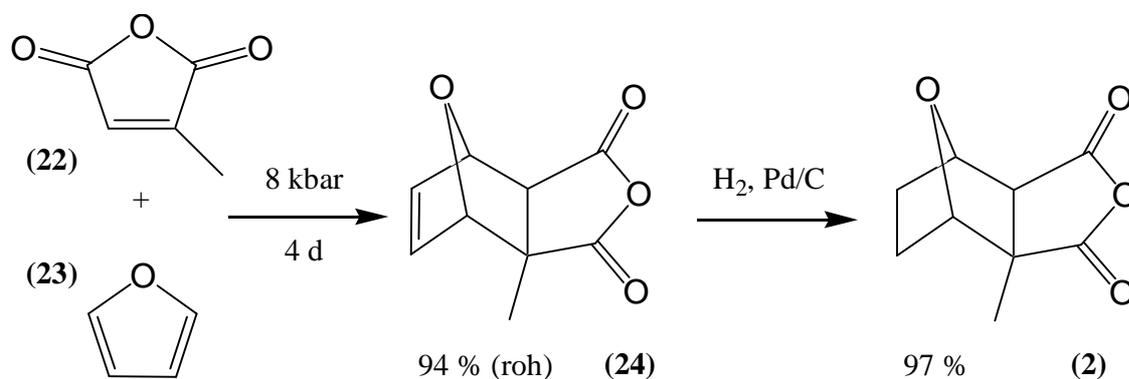
Drehwert $[\alpha]_D^{RT}: -2,18^\circ$ aus ORD ($c = 4,4$ mg/ml in CHCl_3)

CD $[\Theta]_M$: Extremum: 212 nm, -1020 [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$] (17mM, H_2O)

ORD $[\alpha]^{RT}$: 212 nm = 0; 230 nm = $-11,3$ (Minimum) [mdeg] (17mM, H_2O)

5.6 Synthesen

Palasonin, racemisch



Racemisches Palasonin lässt sich nach DAUBEN durch eine Diels-Alder-Reaktion unter hohem Druck mit anschliessender Hydrierung darstellen [97]. Eine Lösung von 4,82 ml (6,0 g, 53,6 mmol) Citraconsäureanhydrid **22** und 4,28 ml (4,0 g, 58,8 mmol) frisch destilliertem Furan **23** werden für vier Tage unter 8 kbar Druck gesetzt. Man erhält 9,08 g eines farblosen Feststoffs (94 % Ausbeute), der ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt wird. 3,95 g des Dehydropalasonin **24** werden mit 0,3 g Pd/C (10%) als Katalysator in 30 ml absolutem THF mit Wasserstoff bei Atmosphärendruck in 24 Std. hydriert. Der Katalysator wird durch Filtration abgetrennt und man erhält 3,88 g (\pm)-Palasonin (97 % Ausbeute) nach Entfernen des Lösungsmittel und Umkristallisation aus PE 40/60.

Schmelzpunkt: 85°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,45 (s, 3H, CH_3); 1,55-1,63 und 1,73-1,83 (m, 1H, endo- CH_2); 1,87-1,98 (m, 2H, exo- CH_2); 2,65 (s, 1H, CH); 4,79 (d, $J=5,1\text{Hz}$ 1H, CHO); 4,92 (d, $J=5,3\text{Hz}$ 1H, CHO) δ [ppm]:

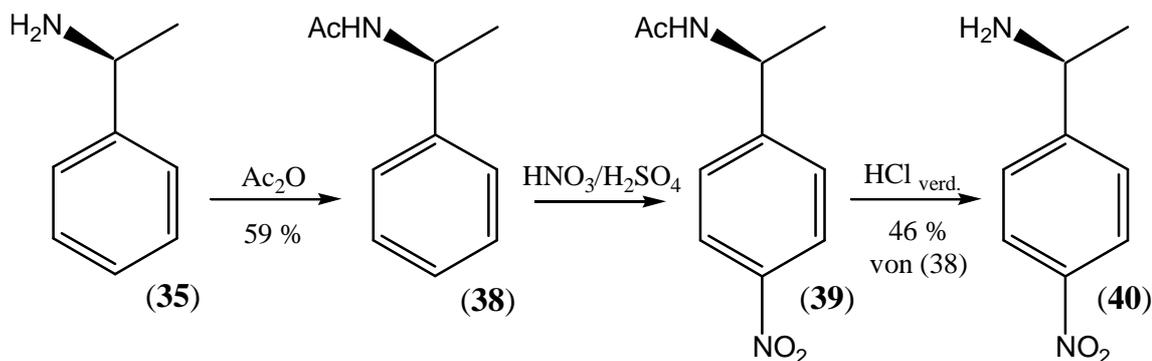
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) :16,2 (CH_3); 23,7; 28,2 (CH_2); 54,9 ($\text{C}_{\text{qu.}}$); 56,4 (CH); 81,3;
83,3(CHO); 171,0; 175,5 (COO) δ [ppm]

Hydrolyse des racemischen Palasonins

Zur Untersuchung des Hydrolyseverhaltens von Palasonin **2** wurden 18,4 mg **2** in 0,6 ml Wasser gegeben und permanent geschüttelt. Der pH-Wert des Wassers wurde vor der Zugabe mit einer Glaselektrode auf 5,90 bestimmt. Nach einer Stunde war das Anhydrid noch nicht komplett hydrolysiert, erst nach weiteren 13 Stunden waren in der Lösung keine Kristalle mehr zu beobachten. Der pH-Wert fiel auf 2,45.

Im NMR ließ sich die Hydrolyse anhand der Änderung der chemischen Verschiebung des angularen Protons von 3,21 ppm auf 2,72 ppm kinetisch verfolgen. Dazu wurden 7,09 mg Palasonin **2** in 200 μl $\text{d}_3\text{-MeCN}$ gelöst und 150 μl dieser Lösung mit 450 μl Deuteriumoxid versetzt. Von diesem Gemisch wurde etwa alle 5 Min. das Protonenspektrum bei 300 K gemessen. Der Hydrolyseverlauf ergibt sich aus dem Verhältnis der Integrale der Peakflächen bei 3,21 und 2,72 ppm gegen die Zeit.

(S)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylamin



Für die Synthese des *p*-Nitrophenylethylamins wurde zuerst die Aminofunktion von *S*-(-)- α -Phenylethylamin **35** durch Acetylierung nach einer allg. Arbeitsvorschrift [126] geschützt. Dazu gibt man 2 ml (1,88 g, 1,55 mmol) des Amins **35** langsam zu 1,46 ml (1,58 g, 1,55 mmol) Acetanhydrid in 8 ml absolutem Dioxan und läßt 15 Min. bei Raumtemperatur rühren. Dann gießt man die Reaktionslösung in Eiswasser, säuert die

wässrige Lösung mit Salzsäure an und filtriert das Reaktionsprodukt (1,48 g, 9,1 mmol, 59 % Ausbeute) ab, und wäscht dies mit Wasser.

MS m/z (%): 163 [M^+] (40); 148 (20); 120 (25); 106 (100); 105 (40); 77 (15)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,38 (3H, d, 7,0 Hz); 1,86 (s, 3H); 5,01 (quin., 7,0 Hz, 1H); 6,24 (s, 1H, NH); 7,14-7,26 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$) δ [ppm]

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 21,7 (CH_3); 23,1 (CH_3); 48,8 (CH); 126,1 (2x $\text{CH}_{\text{arom.}}$); 127,4 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$); 128,5 (2x $\text{CH}_{\text{arom.}}$); 143,2 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$ qu.); 169,3 (CO) δ [ppm]

Die Nitrierung und Entschützung folgte den Angaben von BAUMGARTEN und PETERSON [127]. Zu einer Lösung von 0,7 g (4,3 mmol) des *N*-Acetyl- α -phenylethylamins **38** in 5 ml Eisessig und 1 ml konz. Schwefelsäure tropft man langsam eine Mischung aus 300 μl rauchender Salpetersäure, 100 μl Wasser und 600 μl konz. Schwefelsäure; die Reaktionstemperatur wurde unter 15° C gehalten. Nach einer Stunde Rühren bei RT ist die Reaktion beendet, und man gießt die Reaktionslösung in Eiswasser. Das Reaktionsprodukt **39** fällt aus und kann durch Filtration abgetrennt werden.

MS m/z (%): 208 [M^+] (60); 193 (15), 165 (20); 151 (100); 119 (50); 105 (25); 91 (15); 77 (15)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,44 (d, 6,9 Hz, 3H); 1,96 (s, 3H); 5,10 (quin., 6,9 Hz, 1H); 5,81 (s, 1H); 7,40 (d, 8,8 Hz, 2H); 8,12 (d, 8,2 Hz, 2H) δ [ppm]

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 20,2 (CH_3); 21,6 (CH_3); 47,0 (CH); 122,3 (2x $\text{CH}_{\text{arom.}}$); 125,3 (2x $\text{CH}_{\text{arom.}}$); 145,5 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$); 149,2 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$); 167,8 (CO) δ [ppm]

Die Acetylschutzgruppe wird durch refluxieren für 4 Std. in 20% Salzsäure abgespalten. Durch Kühlen der Lösung auf 4° C fällt das Aminohydrochlorid von **40** als Feststoff aus, und wird abfiltriert. Zur Darstellung von **40** wurde das Hydrochlorid wieder in Wasser gelöst, und die Lösung durch Zugabe von 1 N Natronlauge alkalisch (pH = 10) gemacht. Daraufhin wird das (*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylamin **40** mit Diethylether extrahiert; die organische Lösung mit Magnesiumsulfat getrocknet, und man erhält nach

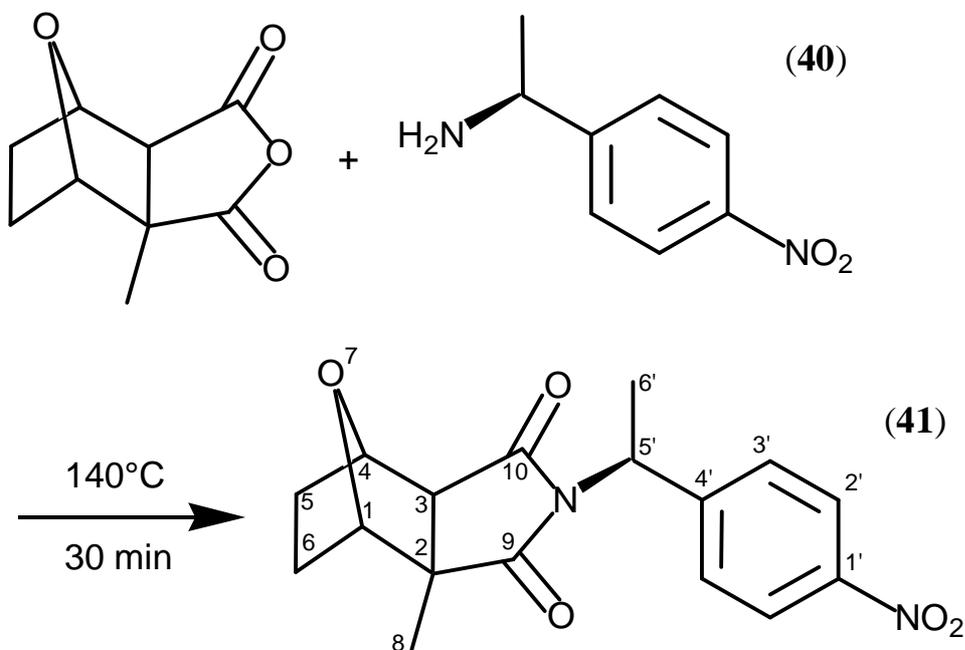
Entfernen des Lösungsmittels 327 mg (1,97 mmol, 45,8 % Ausbeute) eines rotbraunen Öls als Produkt.

MS m/z (%): 166 (15); 151 (100); 121 (10); 105 (40); 104 (35)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,38 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3); 4,23 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H, CH); 7,51 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{H ortho}$); 8,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{H ortho}$) δ [ppm]

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 25,8 (CH_3); 50,9 (C^*H); 123,8 (2x $\text{CH}_{\text{arom. meta}}$); 126,7 (2x $\text{CH}_{\text{arom. ortho}}$); 147,2 (CNO_2 *para*); 155,1 (C_{qu}) δ [ppm]

(S)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylimid von (-)-Palasonin



255 mg des grob aufgereinigten Palasonins aus den Samen von *Butea frondosa* (s. S. 107) wurden mit 180 mg (S)-1-(4-Nitrophenyl)-ethylamin **40** in einem 4 ml-Reaktionsvial in 30 Min. bei 140° C umgesetzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung in Dichlormethan gelöst, erst mit einer alkalischen (1 % $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$; pH = 10), dann mit einer sauren Lösung (2 N HCl; pH = 0) und zum Schluß mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE 40-60 / Et_2O 3:5 ($R_f = 0,12$) gereinigt. Man erhält 101 mg reines Palasimid; die Ausbeute konnte nicht bestimmt werden, da

die Menge des eingesetzten Palasonins nicht exakt bekannt war. In Vorversuchen mit synthetischem Palasonin wurden Ausbeuten von mehr als 80 % erzielt. Um Kristalle für die Röntgenbeugungsexperimente zu erhalten, wurde das diastereomerenreine Imid aus PE 40-60/Et₂O (3:1 v:v) umkristallisiert.

Das Röntgenbeugungsexperiment wurde an einem Nonius KappaCCD Diffraktometer unter Verwendung von Mo-K_α-Strahlung durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden für Lorentz- und Polarisierungseffekte korrigiert, aber nicht für die Absorption [128,129]. Mit Hilfe von SHELXS [130] wurde die Struktur gelöst, und mit SHELXL-97 [131] verfeinert. Zur Darstellung der Kristallstruktur wurde XP (Siemens Analytical X-ray Instruments, Inc.) benutzt. Weitere Einzelheiten zu der Kristallstruktur sind auf Nachfrage unter der Nummer CCDC 168993 vom Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1 EZ erhältlich.

Schmelzpunkt: 111° C

MS (EI 70eV) (%): 330 (100); 312 (20); 300 (15); 285 (20); 262 (60); 244 (15); 208 (15); 151 (60); 113 (40); 82 (40); 70 (60) [m/z]

HR-MS m/z [M⁺]: berechnet 330,121572; gemessen 330,121643

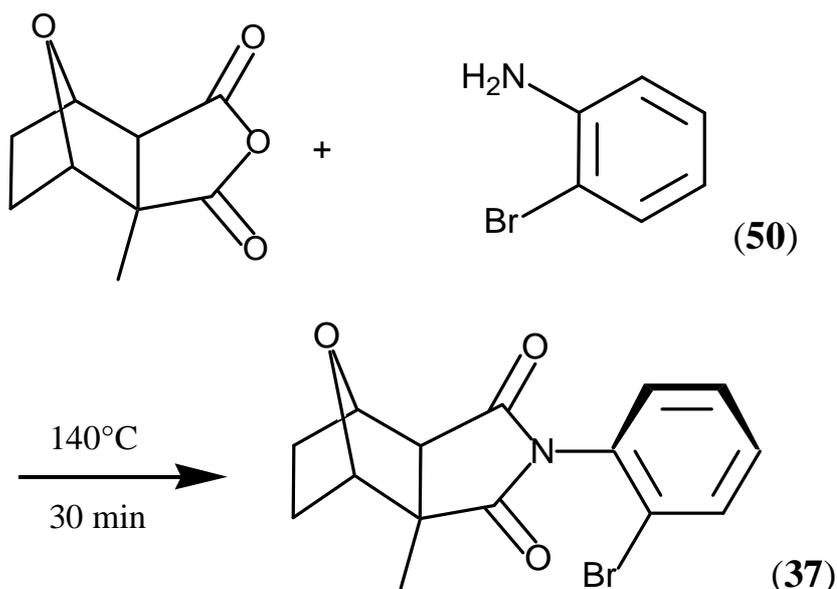
IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3050 (ν-(CH) Aromat); 1751, 1699 (ν-(CO) cyclic Imid); 1516, 1343 (sym. and asym. ν-(NO)); 1392 (ν-(COC)); 858 (δ-(CH) *para*-subst. Aromat)

¹H-NMR (d₆-Aceton): 1,34 (s, 3H (C8H₃)), 1,61-1,73 (m, 2H (*exo*-C5,6H)), 1,75-1,83(m, 1H (*endo*-C5H)), 1,79 (d, J = 7,0 Hz, 3H (C6'H₃)), 1,95-2,01 (m, 1H (*endo*-C6H)), 2,59 (s, 1H (C3H)), 4,56 (d, J = 4,9 Hz, 1H (C1H)), 4,61 (d, J = 5,5 Hz, 1H (C4H)), 5,43 (q, 7,1 Hz, 1H (C5'H)), 7,61 (d, J = 8,85 Hz, 2H (C3'H)), 8,18 (d, J = 8,85 Hz, 2H (C2'H)) δ [ppm]

¹³C-NMR (d₆-Aceton): 16,1 (C8H₃), 17,0 (C6'H₃), 24,7 (C5H₂), 28,9 (C6H₂), 49,8 (C5'H), 53,7 (C2_q), 56,7 (C3H), 81,5 (C4H), 83,3 (C1H), 124,2 (C2'H_{arom.}), 128,6 (C3'H_{arom.}), 148,0 (C4'_{q arom.}), 148,5 (C1'_{q arom.}), 177,3 (C10_q), 181,7 (C9_q) δ [ppm]

Kristalldaten: $C_{17}H_{18}N_2O_5$, $M_r = 330.33 \text{ g mol}^{-1}$, farblose Prismen, Größe $0.18 \times 0.10 \times 0.08 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe $P2_1$, $a = 11.3905(8)$, $b = 6.5844(6)$, $c = 12.0322(8) \text{ \AA}$, $\beta = 117.016(4)^\circ$, $V = 803.9(1) \text{ \AA}^3$, $T = -90 \text{ }^\circ\text{C}$, $Z = 2$, $\rho_{\text{berech.}} = 1.365 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu (\text{Mo-K}\alpha) = 1.02 \text{ cm}^{-1}$, $F(000) = 348$, 3134 Reflexe in $h(-14/14)$, $k(-7/8)$, $l(-15/15)$, gemessen im Winkel $3.40^\circ \leq \Theta \leq 27.40^\circ$, Vollständigkeit $\Theta_{\text{max}} = 99.1 \%$, 3134 symmetrie-unabhängige Reflexe, 2573 Reflexe mit $F_o > 4\sigma(F_o)$, 289 Parameter, 1 Zurückgehaltener, $R1_{\text{obs}} = 0.085$, $wR^2_{\text{obs}} = 0.112$, $R1_{\text{all}} = 0.115$, $wR^2_{\text{all}} = 0.120$, GOOF = 1.149, Flack-Parameter 1.7(16), größter Abstand zwischen Maximum und Minimum: $0.207 / -0.236 \text{ e \AA}^{-3}$.

2-Bromanilid von (-)-Palasonin



Die Synthese der Bromanilide von Palasonin entspricht in der Durchführung des diastereomerenreinen Imid **41**. 4,18 mg Palasonin **2** und ein Überschuss ortho-Bromanilin **50** werden zusammengegeben, und für 30 Min. auf 140°C erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird in Dichlormethan gelöst, und überschüssiges Amin wird durch Extraktion mit 0,1 N Salzsäure abgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE 40-60 / Et₂O 5:3 ($R_f = 0,21$) gereinigt. Man erhält 3,47 mg des reinen Anilid **37** (45% Ausbeute).

MS m/z (%):	335 und 337 [M^+] (2); 257 (50); 256 (100); 189 (45); 188 (35); 82 (40)
HR-MS m/z [M^+]:	gemessen 335,015788; berechnet 335,015705 (für ^{79}Br) gemessen 337,013592; berechnet 337,013658 (für ^{81}Br)
IR (GC) ν [cm^{-1}]:	1203, 1376, 1481, 1740
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	1,43 und 1,47 (s, 3H); 1,53-1,62 (m, 1H); 1,68-1,78 (m, 1H), 1,84-1,93 (m, 2H); 2,49 und 2,54 (s, 1H); 4,71 und 4,74 (d, 5,2 Hz, 1H); 4,83 und 4,88 (d, 5,1 Hz, 1H); 7,18-7,28 (m, 2H); 7,31-7,42 (m, 1H); 7,60-7,66 (m, 1H) δ [ppm]
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	15,7 und 17,0 (CH_3); 24,4 und 24,6 (CH_2); 29,2 und 29,3 (CH_2); 54,4 ($\text{C}_{\text{qu.}}$); 57,5 (CH); 81,1 (CH); 82,8 (CH); 122,6 129,0 130,6 131,4 133,8 134,4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$); 175,8 (CO); 179,9 (CO) δ [ppm]

5.7 Struktur- und Frequenzberechnung

Die Bindungslängen und -winkel und die IR-Absorptionsfrequenzen der drei Anhydride Cantharidin **1**, Palasonin **2** und **14**, wurden mit Hilfe des Programms Gaussian 98 (Gaussian Inc.) *ab-initio* berechnet. Nach Eingabe der Strukturformeln wurden Dichtefunktional-Theorie-Rechnungen auf B3LYP-Niveau mit einem 6-31+G(d)-Basissatz angewendet. Die Strukturen wurden geometrieoptimiert und aus den berechneten Molekülen konnten die Strukturparameter abgelesen und die Frequenzen bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Maheshwari, J.K. (1966) Illustrations to the flora of Delhi, pp. 287 S., Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.
- [2] Sequeira, V. and Bezkorowajnyj, P.G. (1998) Improved management of *Butea monosperma* (Lam.) Taub for lac production in India. *Forest Ecology & Management* 102, 225-234.
- [3] Raj, R.K. and Kurup, P.A. (1961) Investigation on the anthelmintic principle of *Butea frondosa* seeds. *Indian J. Pharm.* 24, 63-65.
- [4] Raj, R.K. and Kurup, P.A. (1967) Isolation and characterisation of Palasonin, an anthelmintic principle of the seeds of *Butea frondosa*. *Indian J. Chem.* 5, 86-87.
- [5] (1966) Brockhaus-Enzyklopädie : in zwanzig Bänden. -Volume 17., völlig neu bearb. Aufl.), Brockhaus, Wiesbaden.
- [6] Bochis, R.J. and Fischer, M.H. (1968) The structure of Palasonin. *Tetrahedron Lett.* 16, 1971-1974.
- [7] Raj, R.K. and Kurup, P.A. (1967) Mode of action of palasonin. II. Effect of palasonin on some glycolytic enzymes and succinic acid production in *Ascaris lumbricoides* (human). *Indian J. Biochem.* 4, 178-181.
- [8] Raj, R.K. and Kurup, P.A. (1967) Mode of action of palasonin. I. Effect of palasonin on total glycogen and reducing sugar contents, and glycogen synthetase activity of *Ascaris lumbricoides*. *Indian J. Biochem.* 4, 90-3.
- [9] Raj, R.K. and Kurup, P.A. (1968) Anthelmintic activity, toxicity and other pharmacological properties of palasonin, the active principle of *Butea frondosa* seeds and its piperazine salt. *Indian J. Med. Res.* 56, 1818-25.
- [10] Kumar, D., Mishra, S.K., Tandan, S.K. and Tripathi, H.C. (1995) Possible mechanism of anthelmintic action of palasonin on *Ascaridia galli*. *Indian J. Pharmacol.* 27, 161-166.
- [11] Schmid, H., Peter, M.G., Snatzke, G., Snatzke, F. and Nagarajan, K.N. (1974) Über die absolute Konfiguration der Cantharsäure und des Palasonins. *Helv. Chim. Acta* 57, 32-64.

- [12] Ali, M.S., Azhar, I., Ahmad, F., Ahmad, V.U. and Usmanghani, K. (1999) Antimicrobial screening of some Papilionaceous (Fabaceous) plants. *J. Chem. Soc. Pakistan*. 21, 73-77.
- [13] Kasture, V.S., Chopde, C.T. and Deshmukh, V.K. (2000) Anticonvulsive activity of *Albizzia lebbek*, *Hibiscus rosa sinesis* and *Butea monosperma* in experimental animals. *J. Ethnopharm.* 71, 65-75.
- [14] Mengi, S.A. and Deshpande, S.G. (1999) Anti-inflammatory activity of *Butea frondosa* leaves. *Fitoterapia* 70, 521-522.
- [15] Sinha, A.P. and Kumar, R. (1999) Extraction of colouring material from *Butea monosperma*, Frondosa (Tesu, palash flowers). *Asian J. Chem.* 11, 1546-1548.
- [16] Mishra, M., Shukla, Y.N. and Kumar, S. (2000) Euphane triterpenoid and lipid constituents from *Butea monosperma*. *Phytochemistry* 54, 835-838.
- [17] Yadava, R.N. and Reddy, K.I.S. (1998) A novel flavone glycoside from the stems of *Butea superba*. *Fitoterapia* 69, 269-270.
- [18] Bishnoi, P. and Gupta, P.C. (1979) A new lactone from the seeds of *Butea frondosa*. *Planta Med* 35, 286-8.
- [19] Wongkham, S., Taketa, K., Liu, M. and Taga, H. (1996) Affinity Electrophoretic Determination of Oligosaccharide *Butea Monosperma* Agglutinin. *Electrophoresis* 17, 98-103.
- [20] Wongkham, S., Wongkham, C., Trisonthi, C., Boonsiri, P., Simasathiansophon, S. and Atisook, K. (1994) Isolation and Properties of a Lectin From the Seeds of *Butea Monosperma*. *Plant Science* 103, 121-126.
- [21] Padmanabhan, S., Demin, V.V., Telezhinskaya, I.N., Zaitseva, E.V., Golubeva, T.B. and Chertov, O.Y. (1991) Studies on the N-terminal sequences of lectins isolated from the seeds of *Butea frondosa*. *Biomed. Sci.* 2, 646-50.
- [22] Chatelain, C.A., A.; Rouge, P. (1993) Isolation and further Charakterisation of the Galactose/Lactose-specific Lectin from *Butea frondosa* seeds. In: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (van Driessche, E.F., H.; Beeckmans, S.; Pfüller, U.; Kallikorm, A.; Bog-Hansen, T. C., ed.), pp. 123-126, Textop, Hellerup (Denmark).
- [23] Puri, B. and Seshadri, T.R. (1955) Survey of Anthoxanthins .9. Isolation and Constitution of Palasitrin. *J. Chem. Soc.*, 1589-1592.

- [24] Guha, P.K., Poi, R. and Bhattacharyya, A. (1990) An Imide From the Pods of *Butea Monosperma*. *Phytochemistry* 29, 2017.
- [25] Barua, A.K., Chakrabarti, P., Das, K.G. and Nair, M.S. (1970) A new imide from *Butea frondosa*. *Chem. Ind.* 43, 1376.
- [26] Homolka, B. (1886) Ueber das Cantharidin. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 19, 1082.
- [27] Lempertz, D.T.F. (1980) *Bewährte Heilmethoden für die Praxis : Schröpfen, Blutegel, Cantharidenpflaster, Baunscheidtismus*, pp. 75 S., D.-Münks-Verl. für Medizin, Krefeld.
- [28] Weidner, H. (1990) *Die Beziehungen zwischen Mensch und Insekten in Nordostoberfranken: die nutzbaren Insekten; ein Beitrag zur Geschichte der Entomologie*, pp. 160 S. : Ill., graph. Darst., Nordoberfränkischer Verein für Natur-, Geschichts- und Landeskunde, Hof.
- [29] <http://www.naturheilpraxis-rau.de/therapie/ausl.htm>.
- [30] <http://www.naturheilkunde-aktuell.de/therapie-diagnose/a/ausleitende-verfahren.html>.
- [31] Till, J.S. and Majmudar, B.N. (1981) Cantharidin Poisoning. *Southern Med. J.* 74, 444-447.
- [32] Wang, C.C., Wu, C.H., Hsieh, K.J., Yen, K.Y. and Yang, L.L. (2000) Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology* 147, 77-87.
- [33] Lin, P.Y., Shi, S.J., Hsu, F.L. and Chen, C.F. (1998) New Cantharidinimides From Cantharidin and 2-Arylethylamines - Efficient Synthesis Under High Pressure. *J. Chinese Chem. Soc.* 45, 323-326.
- [34] Zhou, Z.H. and Chen, R.Y. (2000) Synthesis of glycerophospholipid conjugates of cantharidin and its analogues. *Synthetic Commun.* 30, 3527-3533.
- [35] Zhou, Z.H. and Chen, R.Y. (2000) Synthesis of 1,2-cyclic monoacyl-rac-glycerothio-phosphates of cantharidin analogues. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* 158, 31-38.
- [36] Plumlee, K.H. (1999) Cantharidin toxicosis. *Vet. Med.* 94, 850-+.
- [37] Capinera, J.L., Gardner, D.R. and Stermitz, F.R. (1985) Cantharidin Levels in Blister Beetles Coleoptera Meloidae Associated With Alfalfa in Colorado Usa. *J. Econ. Entomol.* 78, 1052-1055.

- [38] Zhu, Y.C., Charlton, R.E. and Higgins, R.A. (1997) Factors Influencing Quantity of Cantharidin Transferred to Alfalfa From *Epicauta Occidentalis* Werner (Coleoptera, Meloidae). *Journal of Economic Entomology* 90, 1665-1671.
- [39] Tagwireyi, D., Ball, D.E., Loga, P.J. and Moyo, S. (2000) Cantharidin poisoning due to "Blister beetle" ingestion. *Toxicon* 38, 1865-1869.
- [40] Karras, D.J., Farrell, S.E., Harrigan, R.A., Henretig, F.M. and Gealt, L. (1996) Poisoning From Spanish Fly (Cantharidin). *Am. J. Emergency Med.* 14, 478-483.
- [41] Matsuzawa, M., Graziano, M.J. and Casida, J.E. (1987) Endothall and Cantharidin Analogues Relation of Structure to Herbicidal Activity and Mammalian Toxicity. *J. Agric. & Food Chem.* 35, 823-829.
- [42] Kawamura, N., Li, Y.M., Engel, J.L., Dauben, W.G. and Casida, J.E. (1990) Endothall Thioanhydride Structural Aspects of Unusually High Mouse Toxicity and Specific Binding Site in Liver. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 318-324.
- [43] Enz, A., Zenke, G. and Pombovillar, E. (1997) 7-Oxa[2.2.1]bicycloheptane-2,3-dicarboxylic acid derivatives as Phosphatase Inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 7, 2513-2518.
- [44] Sodeoka, M., Baba, Y., Kobayashi, S. and Hirukawa, N. (1997) Structure-Activity Relationship of Cantharidin Derivatives to Protein Phosphatases 1, 2a(1), and 2b. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 7, 1833-1836.
- [45] McCluskey, A., Taylor, C., Quinn, R.J., Suganuma, M. and Fujiki, H. (1996) Inhibition of Protein Phosphatase 2a By Cantharidin Analogues. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 6, 1025-1028.
- [46] Graziano, M.J., Pessah, I.N., Matsuzawa, M. and Casida, J.E. (1988) Partial characterization of specific cantharidin binding sites in mouse tissues. *Mol. Pharmacol.* 33, 706-12.
- [47] Ruzycki, E.M., Axler, R.P., Owen, C.J. and Martin, T.B. (1998) Response of phytoplankton photosynthesis and growth to the aquatic herbicide Hydrothol 191. *Environmental Tox. Chem.* 17, 1530-1537.

- [48] Fechtel, G., Kaplonek, R., Lange, N., Wolter, G., Mory, W. and Pallas, M. (1983) Metal complexes of oxabicyclodicarboxylic acids as herbicides. Patent DD295076A5: 9 pp., Chemie A.-G. Bitterfeld-Wolfen, Germany, Ger. (East).
- [49] Kaplonek, R., Fechtel, G., Baumeister, U. and Hartung, H. (1993) Complex formation of 5,6-dihydroxy-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3- dicarboxylic acid with 3d-transition elements. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 619, 1616-23.
- [50] Smith, G., Lynch, D.E., Kennard, C.H.L. and Mak, T.C.W. (1991) The preparation and crystal structure of the calcium complex with the herbicide endothall, catena-[diaqua(7-oxabicyclo-[2.2.1]-heptane-2,3- dicarboxylato)calcium(II)]. *Polyhedron* 10, 1569-72.
- [51] Kaplonek, R., Baumeister, U. and Hartung, H. (1994) Complex formation of 5,6- dihalo-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3- dicarboxylic acid with 3d transition elements. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 620, 574-80.
- [52] Wang, Y.-H., Huang, Z.-X. and Wu, G. (1996) Synthesis and x-ray crystal structure of 1,2-diaminepropane platinum(II) cantharidinate. *Polyhedron* 16, 57-59.
- [53] McCluskey, A., Keane, M.A., Mudgee, L.M., Sim, A.T.R., Sakoff, J. and Quinn, R.J. (2000) Anhydride modified cantharidin analogues. Is ring opening important in the inhibition of protein phosphatase 2A? *Eur. J. Med. Chem.* 35, 957-964.
- [54] Li, Y.M. and Casida, J.E. (1992) Cantharidin-Binding Protein Identification As Protein Phosphatase 2a. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89, 11867-11870.
- [55] Honkanen, R.E. (1993) Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett* 330, 283-6.
- [56] Krauss, G. (1997) *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion : das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner*, pp. 496 S. : Ill., graph. Darst., Wiley-VCH, Weinheim.
- [57] Sheppeck, J.E., Gauss, C.M. and Chamberlin, A.R. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg. & Med. Chem.* 5, 1739-1750.

- [58] Berndt, N., Campbell, D.G., Caudwell, F.B., Cohen, P., Silva, E.F.D., Silva, O.B.D. and Cohen, P.T.W. (1987) Isolation and Sequence-Analysis of a Cdna Clone Encoding a Type-1 Protein Phosphatase Catalytic Subunit - Homology with Protein Phosphatase-2a. *FEBS Letters* 223, 340-346.
- [59] Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C. and Kuriyan, J. (1995) 3-Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1. *Nature* 376, 745-753.
- [60] Gauss, C.M., Sheppeck, J.E., Nairn, A.C. and Chamberlin, R. (1997) A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg. & Med. Chem.* 5, 1751-1773.
- [61] Van Gestelen, P., Ledeganck, P., Wynant, I., Caubergs, R.J. and Asard, H. (1998) The cantharidin-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. *Protoplasma* 205, 83-92.
- [62] Van Gestelen, P., Asard, H., Horemans, N. and Caubergs, R.J. (1998) Superoxide-producing NAD(P)H oxidases in plasma membrane vesicles from elicitor responsive bean plants. *Physiol. Plant.* 104, 653-660.
- [63] Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N. and Gallois, P. (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 647-655.
- [64] Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692.
- [65] Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Rev. Phytopathol.* 37, 285-306.
- [66] Hunt, M.D. and Ryals, J.A. (1996) Systemic acquired resistance signal transduction. *Critical Rev. Plant Sci.* 15, 583-606.
- [67] Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477, 112-121.
- [68] Kitajima, S. and Sato, F. (1999) Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125, 1-8.
- [69] Dempsey, D.A., Shah, J. and Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Rev. Plant Sci.* 18, 547-575.

- [70] Walling, L.L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19, 195-216.
- [71] Ecker, J.R. (1995) The Ethylene Signal-Transduction Pathway in Plants. *Science* 268, 667-675.
- [72] Dettner, K., Bauer, G., Caldwell, M.M., Heldmaier, G., Lange, O.L., Mooney, H.A., Sommer, U., Schulze, E.D. and Volkl, W. (1997) Vertical Food Web Interactions: Evolutionary Patterns & Driving Forces.
- [73] Jacobs, W.R., Maximilian (1988) *Biologie und Oekologie der Insekten : ein Taschenlexikon* Volume 2., ueberarb. Aufl.), pp. 690 S., Fischer, Stuttgart.
- [74] Düttemeyer, J. (1997) Zur Biosynthese von Cantharidin und Palasonin in *Oedemera flavipes* (Coleoptera: Oedemeridae) und in *Butea frondosa* (Fabaceae). In: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- [75] Oldham, N.J. and Boland, W. (1996) Chemical Ecology - Multifunctional Compounds and Multitrophic Interactions. *Naturwissenschaften* 83, 248-254.
- [76] Frenzel, M. (1993) Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) und Cantharidin: Die Gier nach einem außergewöhnlichen Naturstoff. In: Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- [77] Seidl, V. (1999) Pharmakokinetik von Cantharidin und Cantharidinanaloga in südafrikanischen Ölkäfern (*Hycleus lunata* PALL.). In: Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- [78] Carrel, J.E., McCairel, M.H., Slagle, A.J., Doom, J.P., Brill, J. and McCormick, J.P. (1993) Cantharidin Production in a Blister Beetle. *Experientia* 49, 171-174.
- [79] Holz, C., Streil, G. and Dettner, K. (1994) Intersexual transfer of a toxic terpenoid during copulation and its paternal allocation to developmental stages: Quantification of cantharidin in cantharidin-producing oedemerids (Coleoptera: Oedemeridae) and canthariphilous pyrochroids (Coleoptera: Pyrochroidae). *Zeitschrift Fuer Naturforschung Section C Biosciences* 49, 856-864.
- [80] Fietz, O. (1997) Isolierung und Charakterisierung eines Palasoninkonjugates aus *Butea frondosa* (Fabaceae). In: Kekule- Institut für Organische Chemie und Biochemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

- [81] Rath, B. (1995) Charakterisierung und Aufreinigung des Cantharidin-Konjugats aus Larvenextrakten von *Pyrochroa coccinea* L. (Coleoptera: Pyrochroidae). In: Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- [82] Daloz, D. and Pasteels, J.M. (1994) Isolation of 8-Hydroxygeraniol-8-O-Beta-D-Glucoside, a Probable Intermediate in Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes, from Defensive Secretions of *Plagioderia Versicolora* and *Gastrophysa Viridula* (Coleoptera, Chrysomelidae). *J. Chem. Ecol.* 20, 2089-2097.
- [83] Weibel, D.B., Oldham, N.J., Feld, B., Glombitza, G., Dettner, K. and Boland, W. (2001) Iridoid biosynthesis in staphylinid rove beetles (Coleoptera : Staphylinidae, Philonthinae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 583-591.
- [84] Guenther, H., Ramstad, E. and Floss, H.G. (1969) On the biosynthesis of cantharidin. *J Pharm Sci* 58, 1274.
- [85] McCormick, J.P. and Carrel, J.E. (1991) Stable Isotope Studies of Cantharidin Biosynthesis by *Epicauta pestifera*. *Petroski, R. J. And J. P. McCormick* 44, 14-19.
- [86] Woggon, W.D., Hauffe, S.A. and Schmid, H. (1983) Biosynthesis of Cantharidin - Evidence For the Specific Incorporation of C-4 and C-11' of Farnesol. *J. Chem. Soc.- Chem. Commun.*, 272-274.
- [87] McCormick, J.P.C., James E. (1987) Cantharidin Biosynthesis and Function in Meloid Beetles. In: *Pheromone biochemistry* (Prestwich, G.J.B.G.D., ed.), Academic Press, Orlando.
- [88] McCormick, J.P., Carrel, J.E. and Doom, J.P. (1986) Origin of Oxygen Atoms in Cantharidin Biosynthesized By Beetles. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 8071-8074.
- [89] Veith, M., Lorenz, M., Boland, W., Simon, H. and Dettner, K. (1994) Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects: Defensive secretions from larvae of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron* 50, 6859-6874.
- [90] Veith, M., Dettner, K. and Boland, W. (1996) Stereochemistry of an alcohol oxidase from the defensive secretion of larvae of the leaf beetle *Phaedon armoraciae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron* 52, 6601-6612.

- [91] Carrel, J.E., Doom, J.P. and McCormick, J.P. (1985) Quantitative-Determination of Cantharidin in Biological- Materials Using Capillary Gas-Chromatography with Flame Ionization Detection. *Journal of Chromatography* 342, 411-415.
- [92] McCluskey, A., Bowyer, M.C., Collins, E., Sim, A.T.R., Sakoff, J.A. and Baldwin, M.L. (2000) Anhydride modified cantharidin analogues: Synthesis, inhibition of protein phosphatases 1 and 2A and anticancer activity. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 10, 1687-1690.
- [93] Alpert, A.J. (1990) Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic-Acids and Other Polar Compounds. *J. Chromatography* 499, 177-196.
- [94] Beutler, J.A. (1997) Separation of high molecular weight saponins of *Archidendron ellipticum* by hydrophilic interaction chromatography. *J. Liquid Chrom. & Rel. Techn.* 20, 2415-2426.
- [95] Strege, M.A. (1998) Hydrophilic interaction chromatography electrospray mass spectrometry analysis of polar compounds for natural product drug discovery. *Anal. Chem.* 70, 2439-2445.
- [96] <http://www.netwiz.net/~wap/polylc/HILIC%20introduction.htm>.
- [97] Dauben, W.G., Lam, J.Y.L. and Guo, Z.R. (1996) Total Synthesis of (-)-Palasonin and (+)-Palasonin and Related Chemistry. *J. Org. Chem.* 61, 4816-4819.
- [98] Horeau, A. (1961) Principe Et Applications Dune Nouvelle Methode De Determination. *Tetrahedron Lett.*, 506-512.
- [99] Carey, F.A.S., Richard J. (1995) *Organische Chemie : ein weiterführendes Lehrbuch*, pp. 1635, Wiley-VCH, Weinheim.
- [100] Vidal, T., Petit, A., Loupy, A. and Gedye, R.N. (2000) Re-examination of microwave-induced synthesis of phthalimides. *Tetrahedron* 56, 5473-5478.
- [101] Freude, H.H., Karl Wilhelm; Lohse, G. A. (1969) Band 8; Teredilia, Heteromera, Lamellicornia. In: *Die Käfer Mitteleuropas*, Goecke & Evers, Krefeld.
- [102] Streil, G. (1994) Die Rolle des Naturstoffes Cantharidin bei Oedemeriden und Aspekte zu deren Bionomie. In: *Fachbereich Biologie, Chemie, und Geowissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth.*

- [103] Bell, A.A. (1970) 4-Hydroxybenzaldehyde and Vanillin as Toxins Formed in Leaf Wound Sap of *Phaseolus lunatus*. *Phytopathol.* 60, 161.
- [104] Dicke, M., Sabelis, M.W., Takabayashi, J., Bruin, J. and Posthumus, M.A. (1990) Plant Strategies of Manipulating Predator-Prey Interactions through Allelochemicals - Prospects for Application in Pest- Control. *J. Chem. Ecol.* 16, 3091-3118.
- [105] De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (1999) Interactions in entomology: Plant-parasitoid interaction in tritrophic systems. *Journal of Entomological Science* 34, 31-39.
- [106] Dunleavy, J. (1988) Bacterial, fungal and viral diseases affecting soybean leaves. (Willey, T., ed.), *Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, Minnesota.*
- [107] Fahy, P.C.P., G. J. (1983) Pseudomonads: The fluorescent pseudomonads. In: *Plant bacterial diseases : A diagnostic guide* (Fahy, P.C.P., G. J., ed.), Academic Press, Sydney.
- [108] Cafiso, D.S. (1994) Alamethicin - a Peptide Model for Voltage Gating and Protein Membrane Interactions. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 23, 141-165.
- [109] Sansom, M.S.P. (1993) Structure and Function of Channel-Forming Peptaibols. *Quarterly Reviews of Biophysics* 26, 365-421.
- [110] Koch, T. (2001) Analytik pflanzlicher Signalstoffe: Phytohormone und Abwehr. In: *Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.*
- [111] Engelberth, J., Koch, T., Schüler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J. and Boland, W. (2001) Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiol.* 125, 369-377.
- [112] Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. and Takabayashi, J. (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406, 512-515.
- [113] Krumm, T. (1998) In: *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.*
- [114] Jux, A. (2001) In: *Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller Universität, Jena.*

- [115] Cucurou, C., Battioni, J.P., Thang, D.C., Nam, N.H. and Mansuy, D. (1991) Mechanisms of Inactivation of Lipoxygenases by Phenidone and Bw755c. *Biochemistry* 30, 8964-8970.
- [116] Piel, J., Atzorn, R., Gabler, R., Kühnemann, F. and Boland, W. (1997) Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signalling cascade. *FEBS Lett.* 416, 143-148.
- [117] Kühnemann, F.U., W. (2000) *Physikalische Blätter* 56, 43-46.
- [118] Schüler, G. (2001) Coronatin-Analoga: molekulare Sonden für pflanzliche Signalwege. In: Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- [119] Pachten, A. and Barz, W. (1999) Elicitor-stimulated oxidative burst and extracellular pH changes in protoplast suspensions prepared from cultured chickpea (*Cicer arietinum* L.) cells. *J. Plant Physiol.* 155, 795-797.
- [120] Rakwal, R., Shii, K., Agrawal, G.K. and Yonekura, M. (2001) Protein phosphatase inhibitors activate defense responses in rice (*Oryza sativa*) leaves. *Physiol. Plant.* 111, 151-157.
- [121] Kenton, P., Mur, L.A.J. and Draper, J. (1999) A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J. Exper. Botany.* 50, 1331-1341.
- [122] Agrawal, G.K., Jwa, N.S. and Rakwal, R. (2000) A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 157-165.
- [123] Rakwal, R., Agrawal, G.K. and Jwa, N.S. (2001) Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263, 189-198.
- [124] Donath, J. and Boland, W. (1995) Biosynthesis of Acyclic Homoterpenes - Enzyme Selectivity and Absolute-Configuration of the Nerolidol Precursor. *Phytochemistry* 39, 785-790.

- [125] Sahir, M. and Jawaharlal, S.C. (1978) Modified method for isolation of Palasonin - the anthelmintic principle of *Butea Frondosa* Seeds. Indian J. Pharm. Sci., 97-98.
- [126] Becker, H.G.O. (1993) Organikum : organisch-chemisches Grundpraktikum Volume 19., bearb. und erw. Aufl.), pp. 786 S., Barth, Dt. Verl. der Wiss., Leipzig.
- [127] Baumgarten, H.E. and Peterson, J.M. (1960) Reactions of Amines. V. Synthesis of α -Amino Ketones. J. Am. Chem. Soc. 82, 1960.
- [128] (1998) COLLECT, Data Collection Software. Nonius B. V., Netherlands.
- [129] Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Macromolecular Crystallography, Pt A, pp. 307-326, Academic Press Inc, San Diego.
- [130] Sheldrick, G.M. (1990) Phase Annealing in Shelx-90 - Direct Methods for Larger Structures. Acta Crystallographica Section A 46, 467-473.
- [131] Sheldrick, G.M. (1993) SHELXL-97. University of Göttingen, Germany.

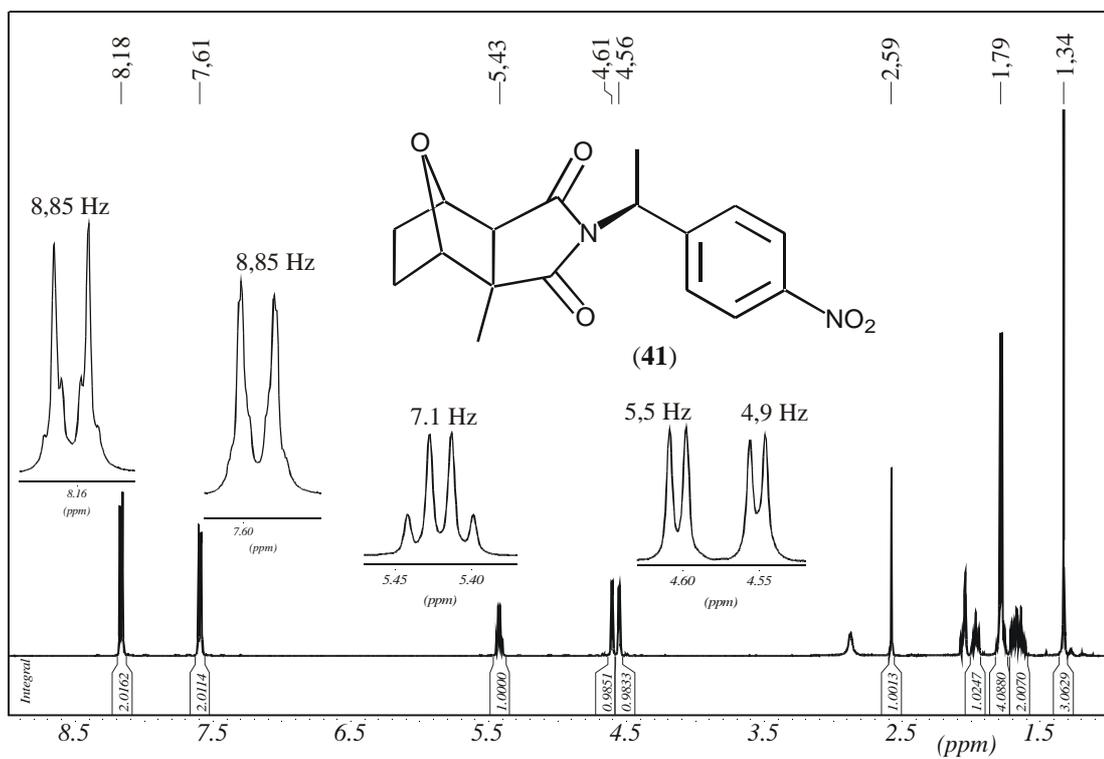
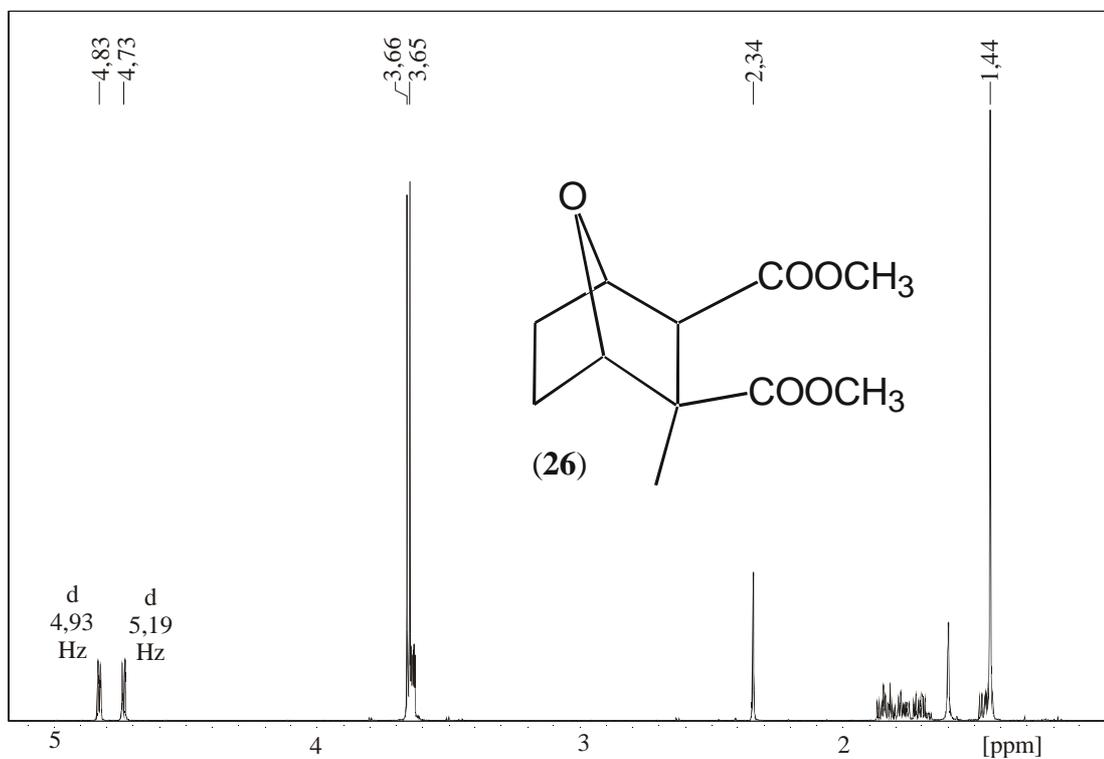
7 Anhang

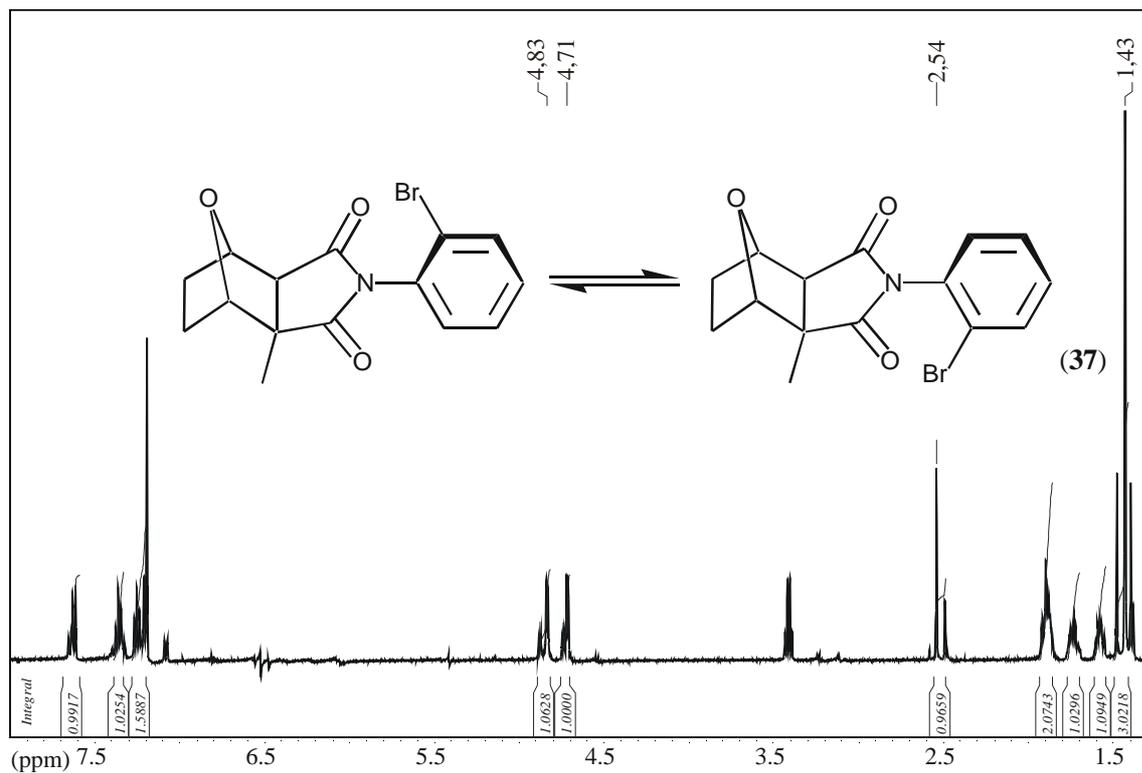
7.1 Abkürzungen

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
APCI, ESI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck, Elektrospray-Ionisation; zwei Methoden der LC/MS
arom.	aromatisch
CD	Circulardichroismus
CH ₂ N ₂	Diazomethan
CLS	closed-loop-stripping
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI, CI	Elektronenstoßionisation (70eV) und chemische Ionisation; zwei Methoden der GC/MS
Et ₂ O	Diethylether
eq.	Äquivalent
FPS	Farnesyl-Diphosphat-Synthase
GC; GC/MS	Gaschromatographie; gekoppelt mit MS
(HP)LC; LC-MS	(Hochleistungs-) Flüssigchromatographie; gekoppelt mit MS
HR	Hypersensitive Reaktion
HR-MS	hochauflösende MS
IPP	Isopentenylidiphosphat
IR; GC-IR	Infrarot(spektrometrie); gekoppelt mit GC
LD ₅₀	Letale Dosis
LOX	Lipoxygenase

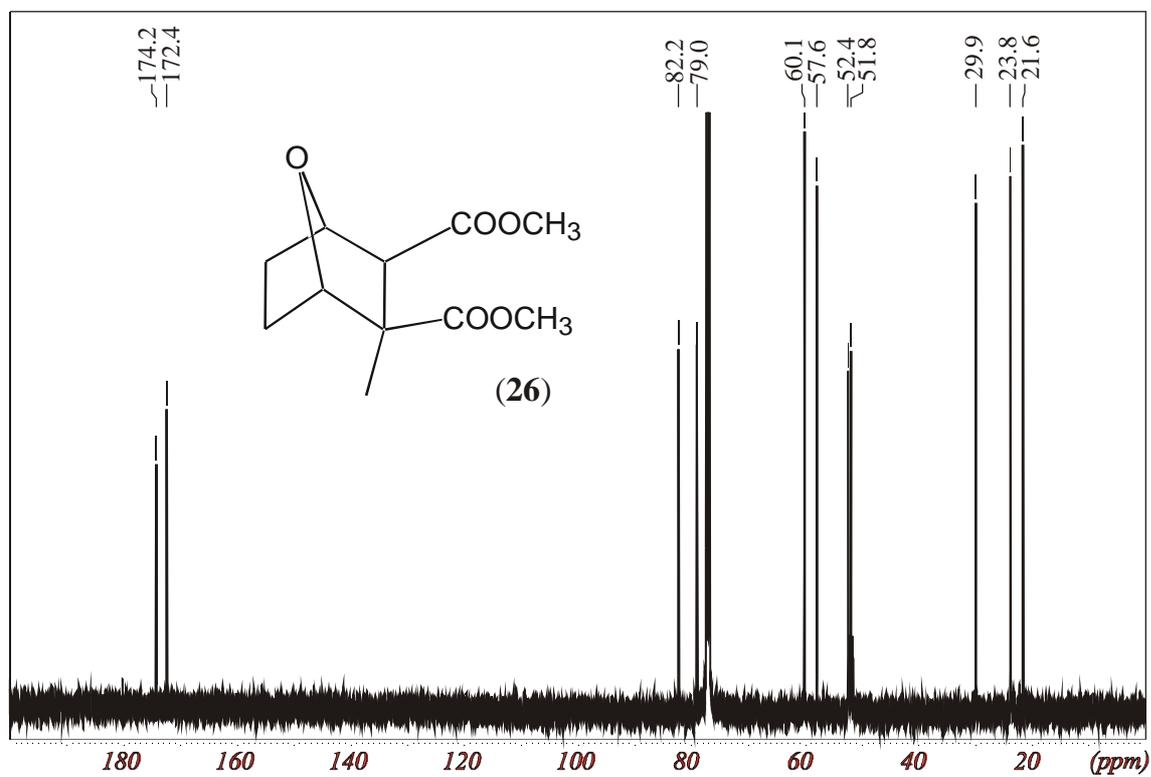
[M] ⁺	Molekülion
[M+H] ⁺	protoniertes Molekülion
MeCN	Acetonitril
MEP	2-C-Methyl-D-erythritolphosphat
MeOH	Methanol
MS; MS/MS, MS ⁿ	Massenspektrometrie; Tandem-MS
MVA	Mevalolacton
NMR	Kernresonanzspektrometrie; -spektrum; -spektrometer
ORD	optische Rotationsdispersion
OsPR1a	saures <i>PRI</i> -Gen aus Reis (<i>Oryza sativa</i> L.)
OsBBPI	Bowman-Birk proteinase inhibitor aus Reis (<i>Oryza sativa</i> L.)
PAL	Phenyl-Ammoniak-Lyase
PE 40/60	Petrolether des Siedebereichs 40° bis 60° C
PP (1, 2A, 2B, 2C)	Proteinphosphatase (1, 2A, 2B, 2C)
PR	pathogen related
SAR	systemic aquired resistance
SPE	Festphasenextraktion
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett(spektrometrie)

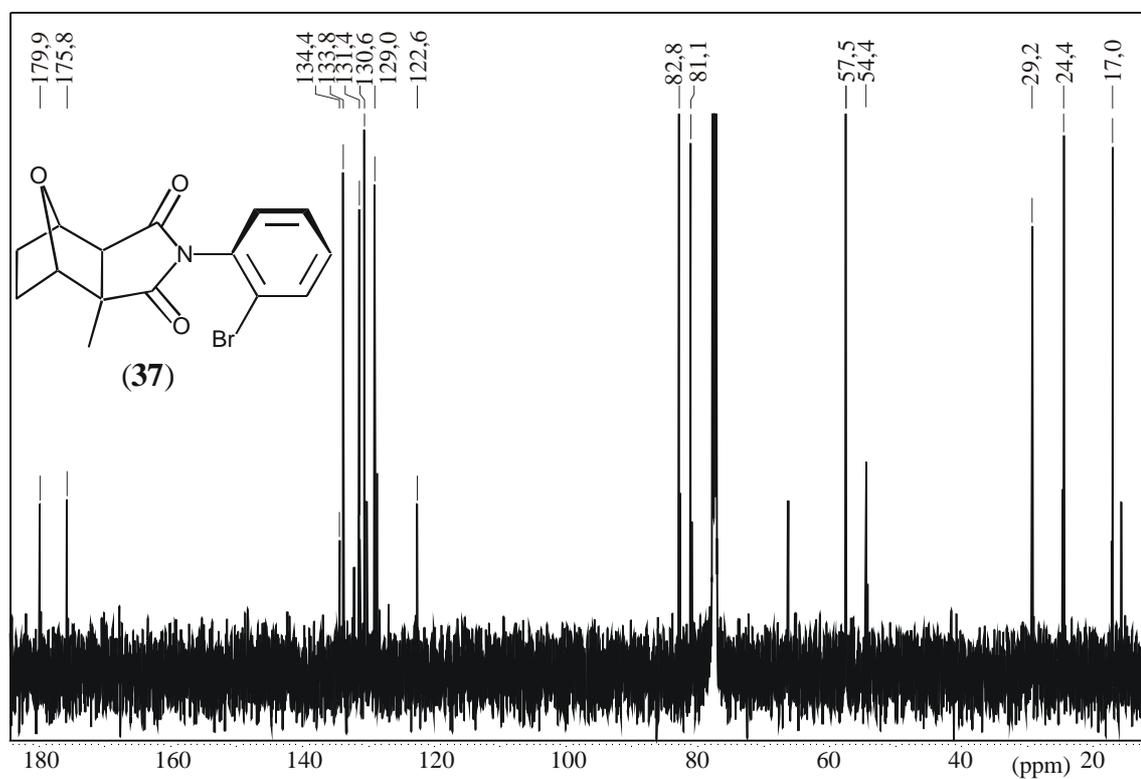
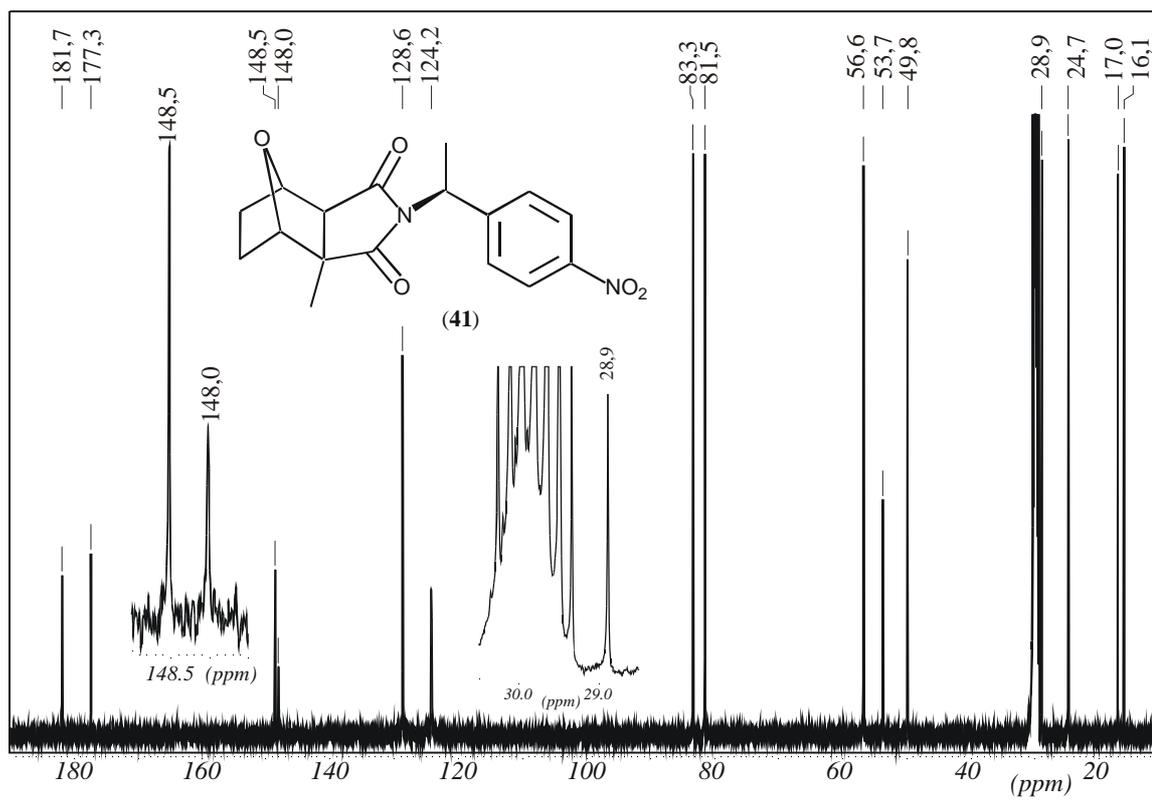
7.2 Spektren

¹H-NMR-Spektren

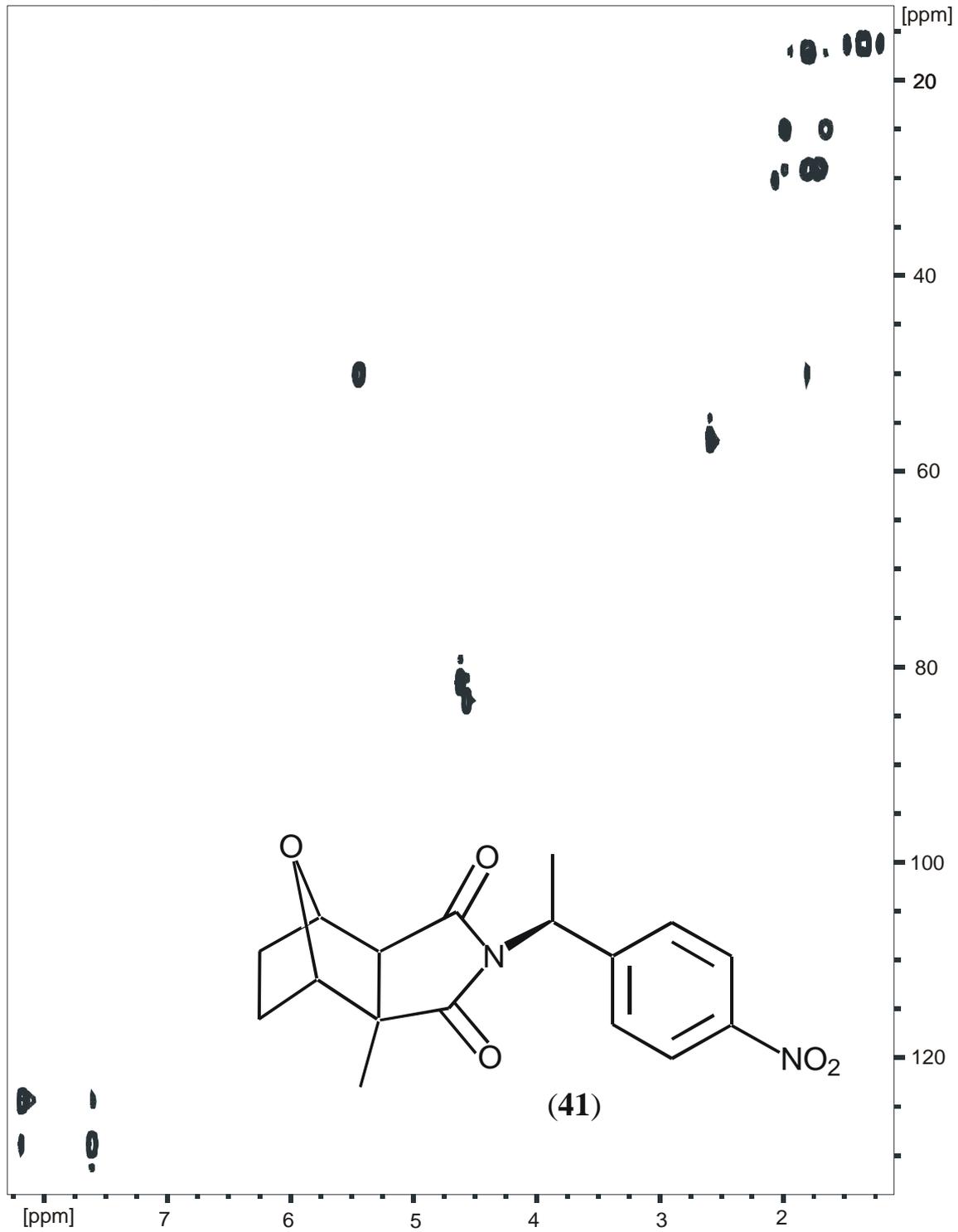


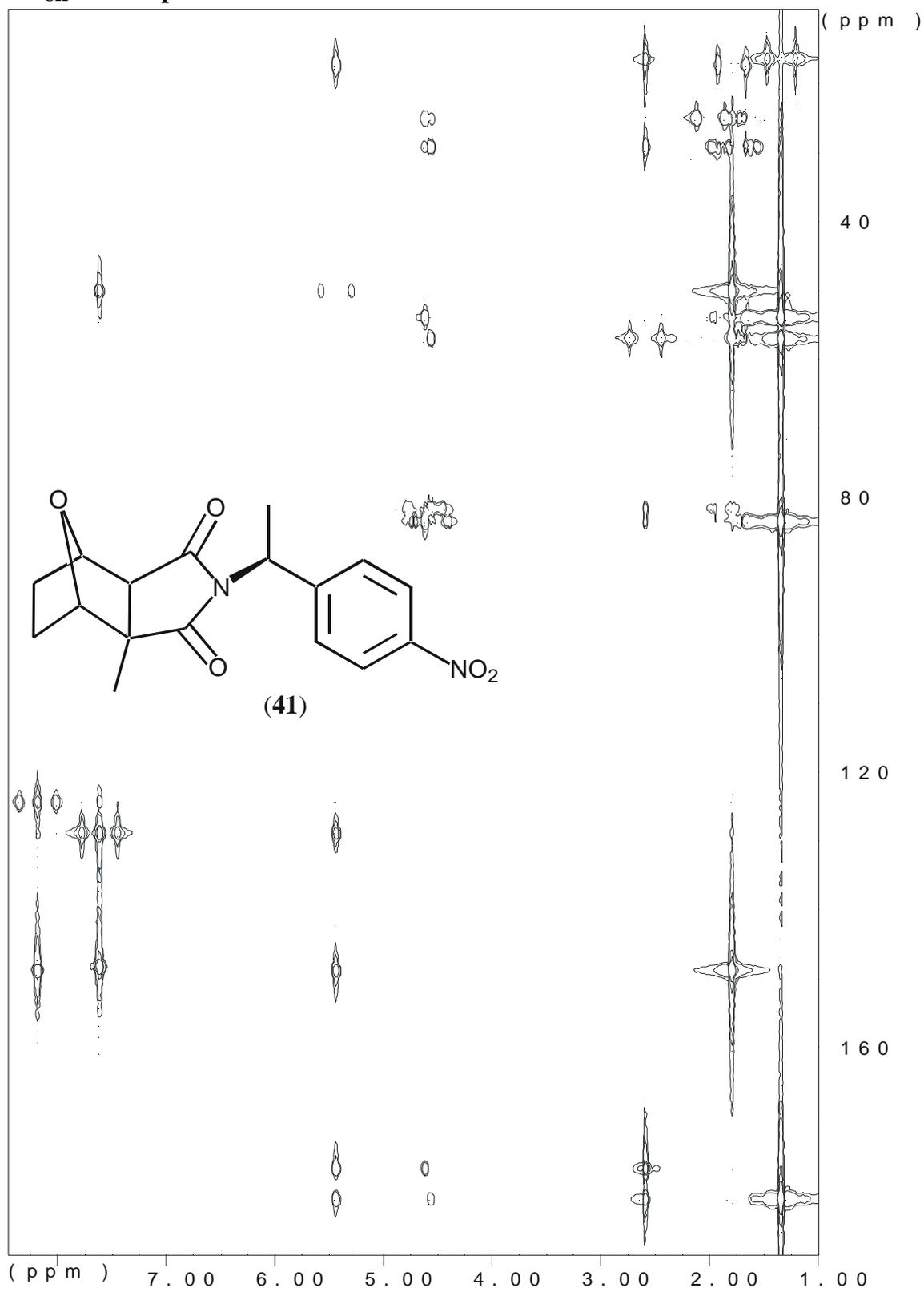
^{13}C -NMR-Spektren



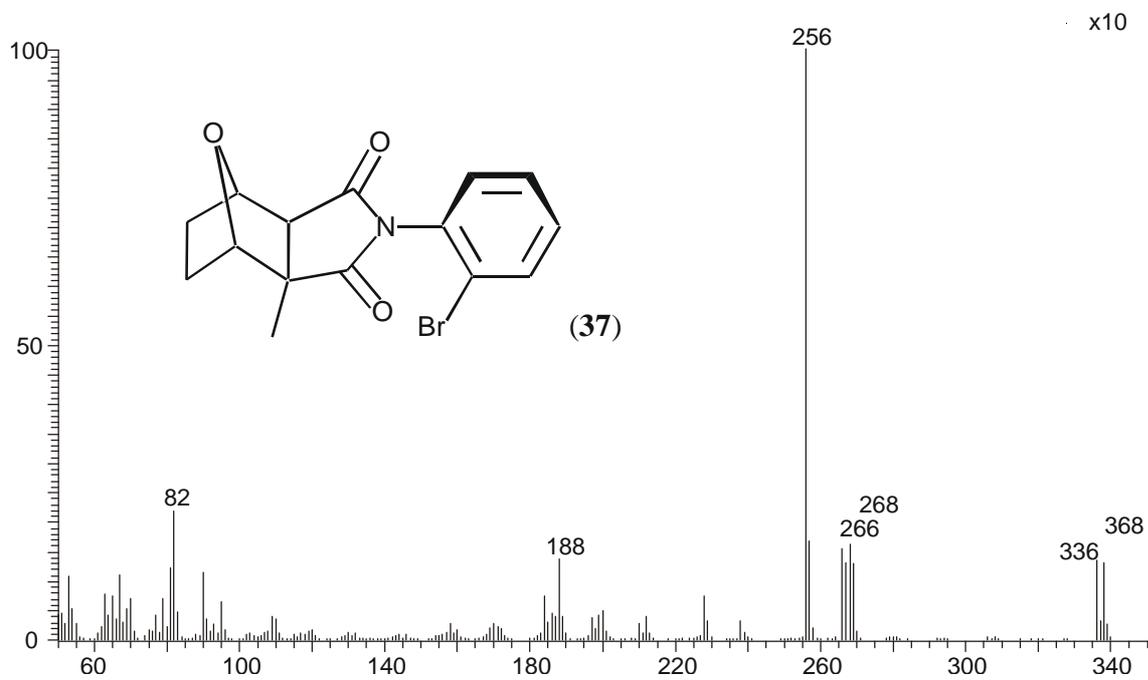
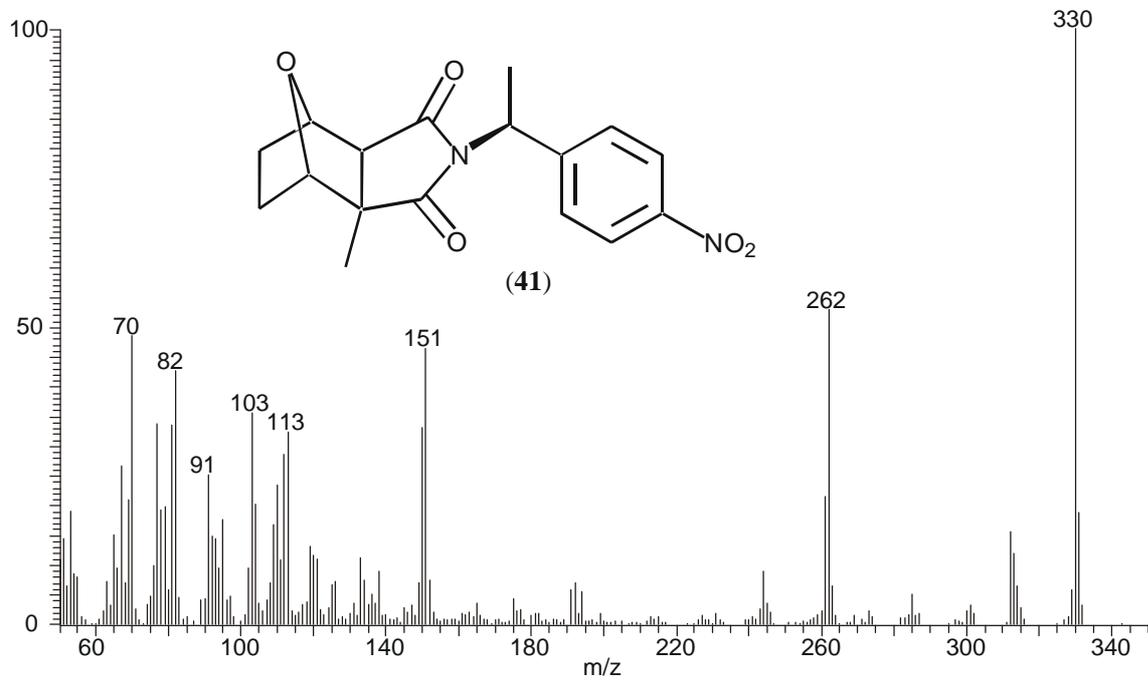


2D-NMR-Spektren

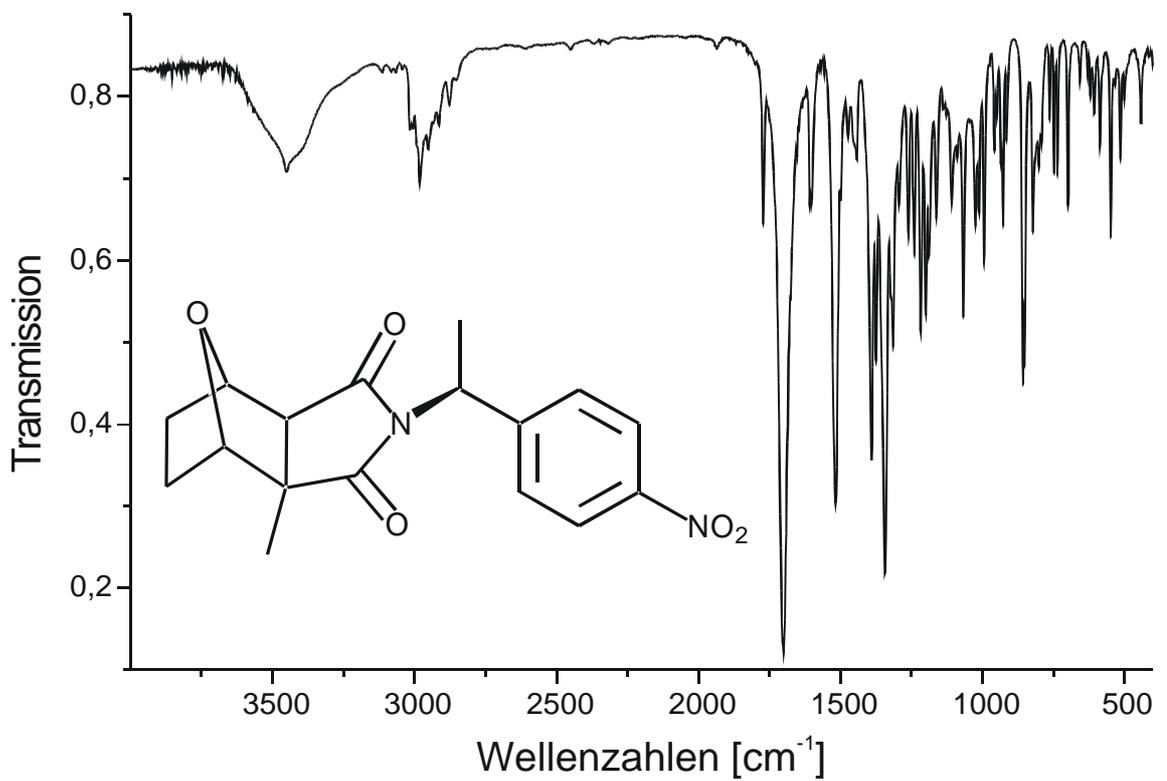
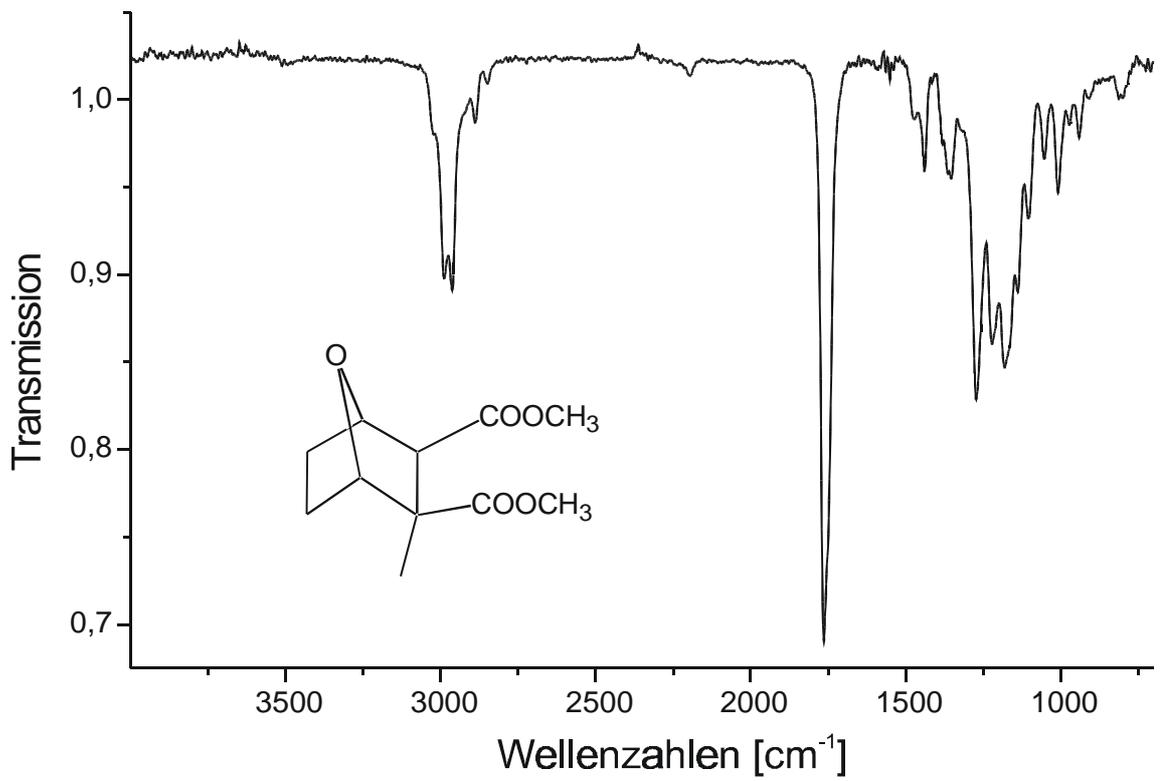
 $^1J_{CH}$ -NMR-Spektrum

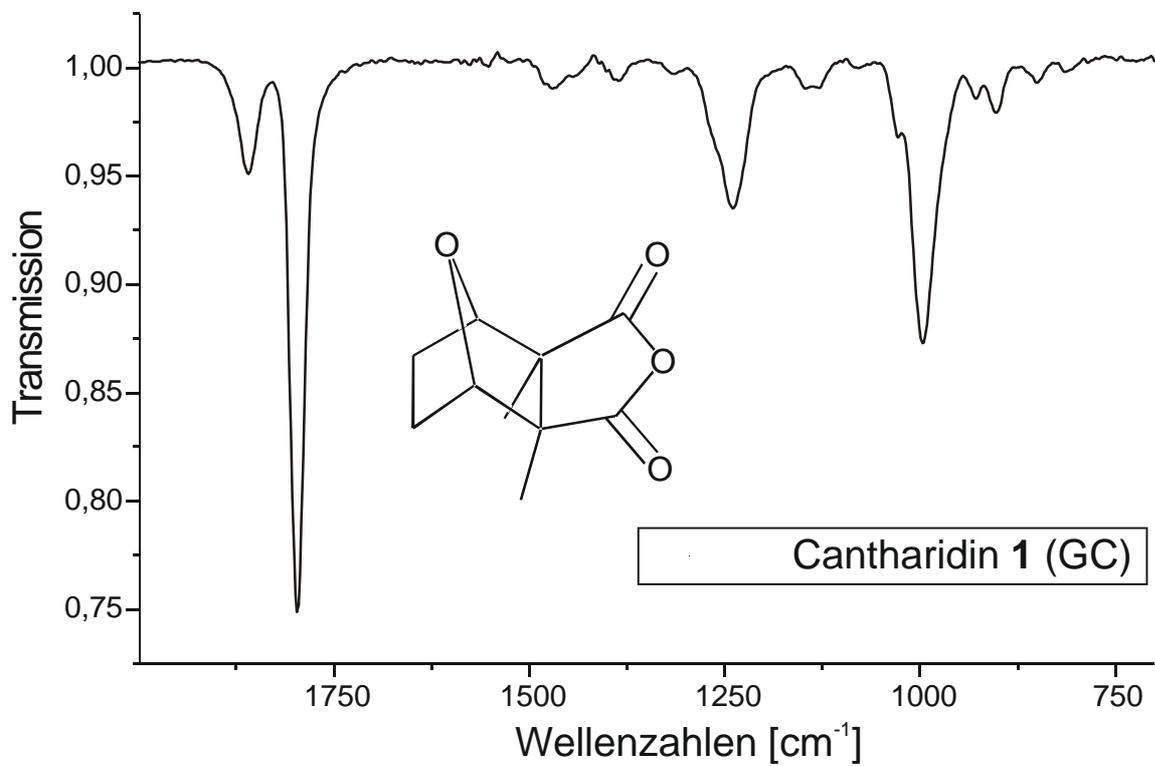
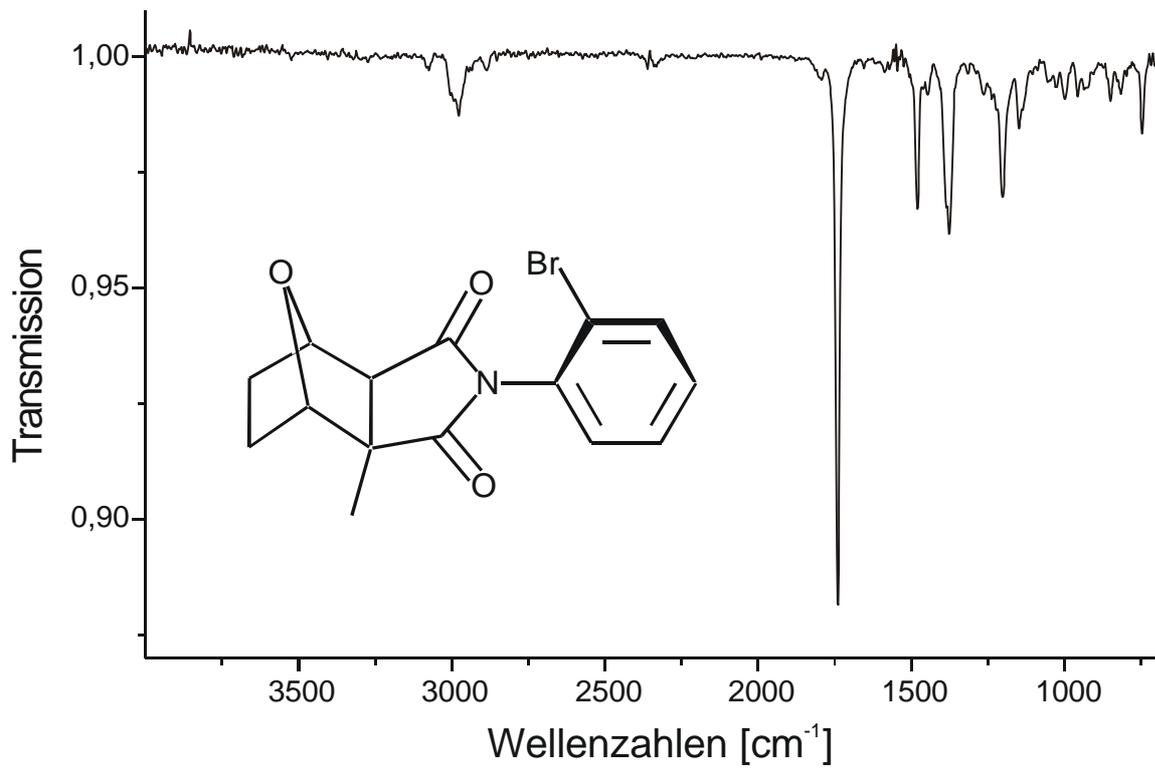
$^{2,3}J_{CH}$ -NMR-Spektrum

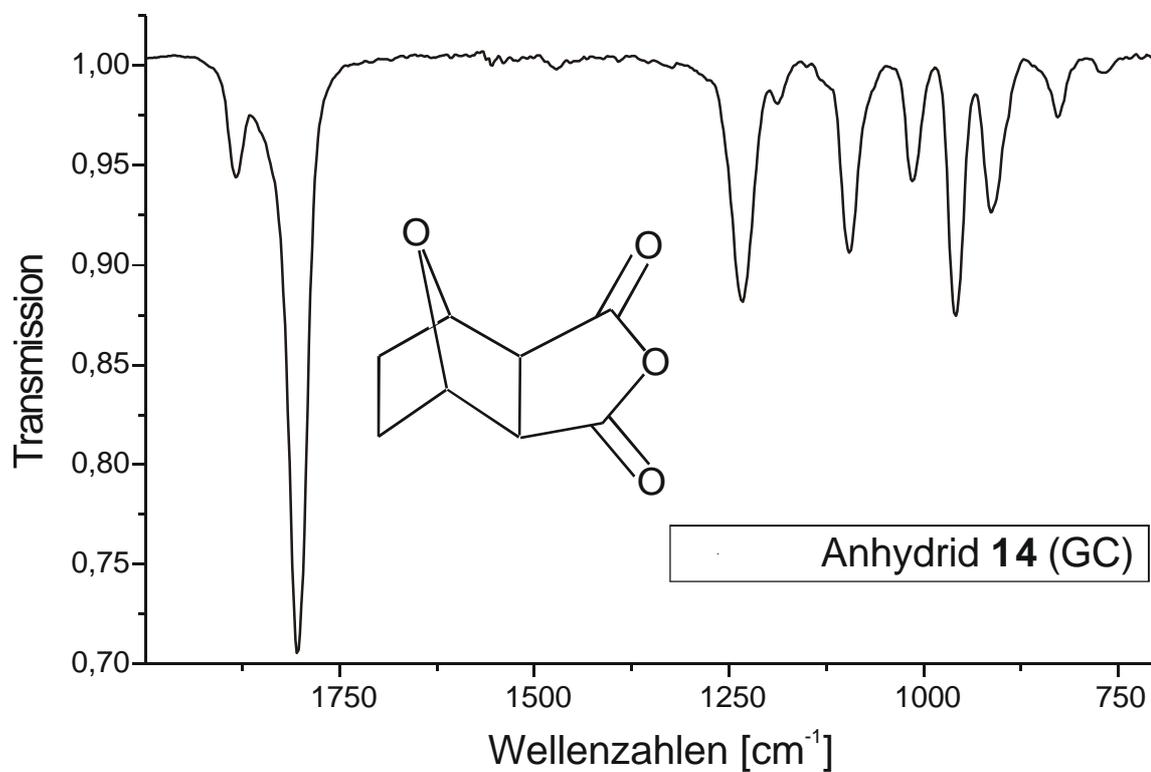
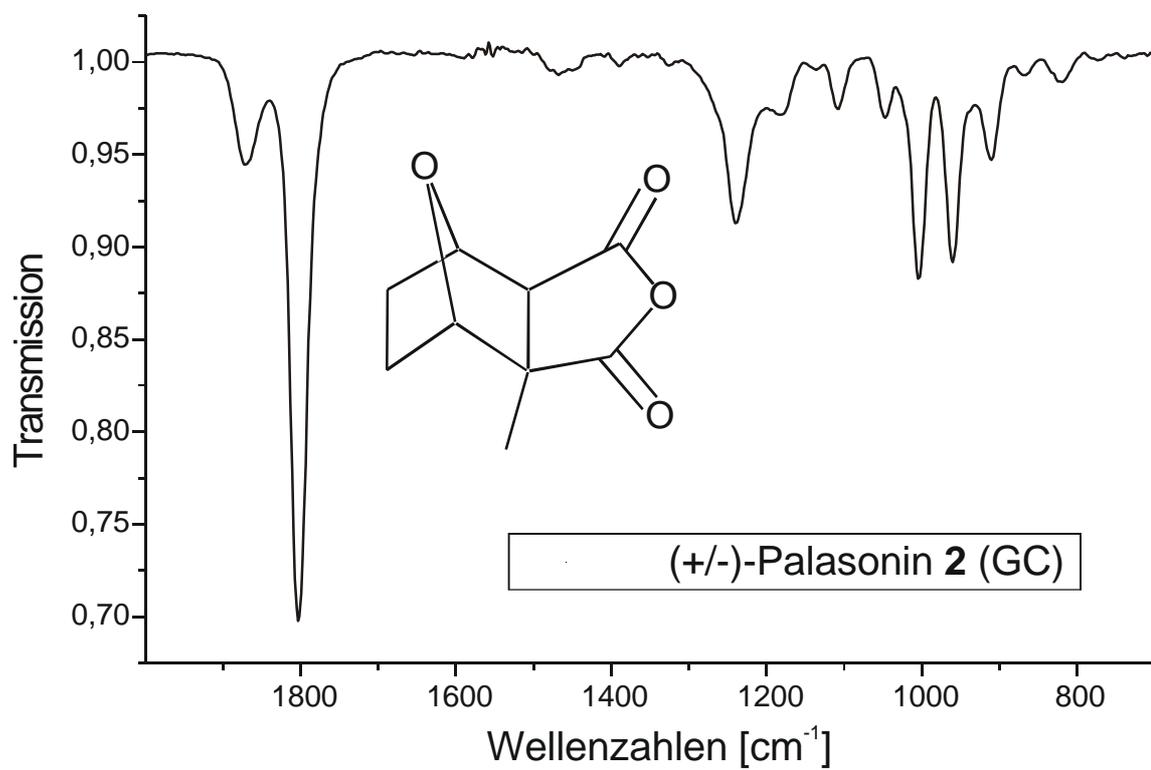
Massenspektren



IR-Spektren







7.3 Markierungsgrad von Cantharidin nach Verfütterung von MVA-d₅ 43 an *Oedemera*-Larven

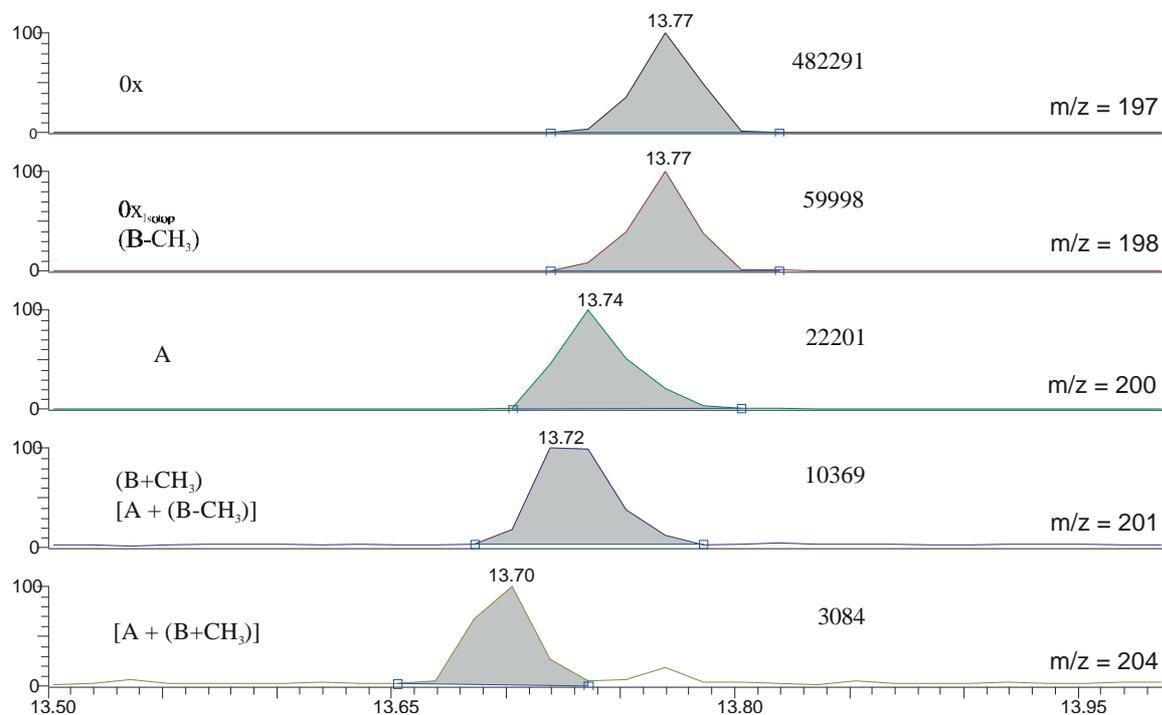


Abbildung 7-1 Bestimmung des Markierungsgrades bei chemischer Ionisation

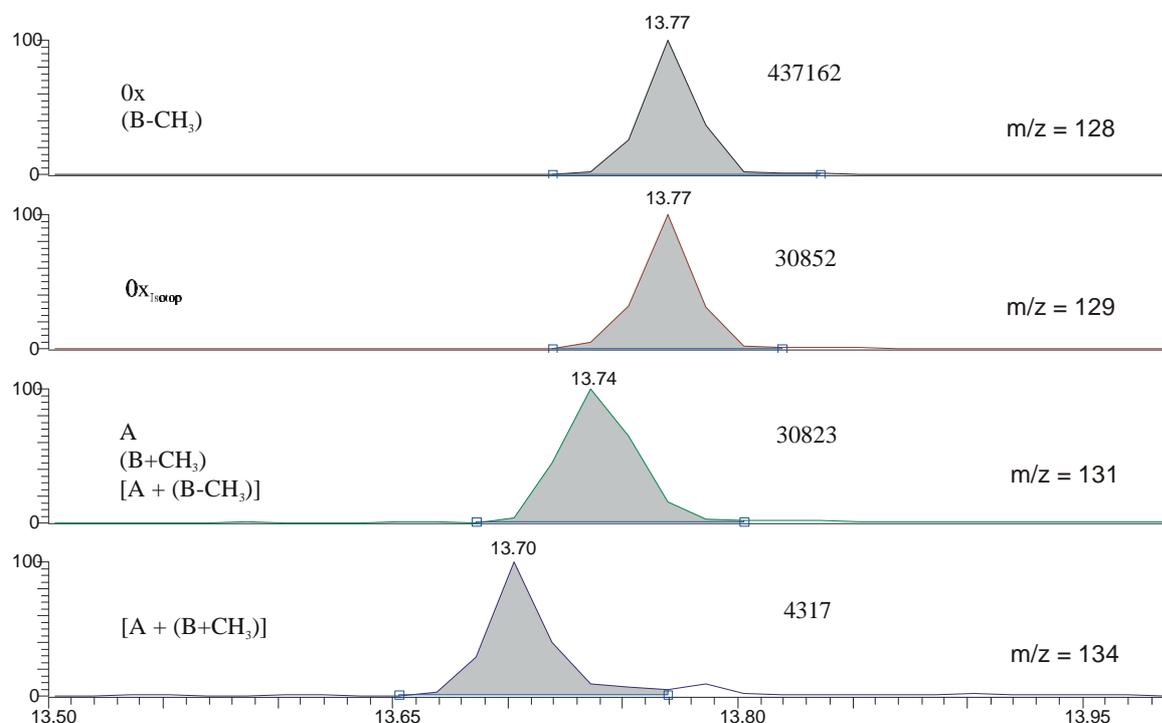


Abbildung 7-2 Bestimmung des Markierungsgrades bei Elektronenstoßionisation

Tabelle 7-1 *Oedemera femorata* Eier 02.08. Larven 09.08. bis 75 Tage

Tage	Magnum CI		Magnum EI		GCQ EI		GCQ CI	
5	1,0		2,1		0,8			
12	1,0		0,8		0,8			
26	7,3		4,8		6,0			
56	34,3		25,6	2,00%	32,0	2,30%		
61	25,3		18,3		23,3			
75	100	4,40%	100	4,50%	100	5,20%		4,25%

Tabelle 7-2 *Oedemera femorata* Eier 21.07. Larven 29.07. bis 59 Tage

Tage	Magnum CI		Magnum EI		GCQ EI	
4	12,7		7,2		6,3	
9	18,6		12,0		11,9	
16	15,7		6,2		13,4	
20	8,0		4,2		5,5	
23	7,8		11,6		2,8	
34	66,5	2,5%	53,0	2,2%	81,3	3,9%
59	100,0	3,3%	100,0	4,2%	100,0	4,8%

Tabelle 7-3 *Oedemera flavipes* Eier 02.07. Larven 16.07. 55 bis 68 Tage

Tage	Magnum CI		GCQ CI		GCQ EI		Magnum EI	
55	66,7	11,0%	62,5	9,9%	50,0	12,6%	50,0	10,9%
58	54,0	12,9%	37,5	11,9%	38,5	15,4%	41,7	14,2%
60	57,1	8,3%	50,0	8,0%	46,2	10,5%	45,8	9,5%
62	34,9	9,1%	25,0	8,3%	30,8	11,2%	25,0	9,4%
64	100,0	4,0%	100,0	4,0%	100,0	5,0%	100,0	4,5%
68	88,9	4,6%	75,0	4,4%	84,6	5,5%	83,3	5,0%

7.4 Lebenslauf

Oliver Ekkehart Fietz

* 07.12.1970 in Porz am Rhein

Familienstand: verheiratet

30.05.1990	Allgemeine Hochschulreife Maximilian-Kolbe-Gymnasium Köln-Porz-Wahn
7/1990 - 6/1991	Grundwehrdienst im Fallschirmjägerbataillon 262 Merzig/Saar
10/1991-22.12.1997	Diplom-Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Diplomarbeit mit dem Thema "Isolierung und Charakterisierung eines Palasonin- konjugates aus <i>Butea frondosa</i> (Fabaceae)"
1.1.1998-30.06.2001	Dissertation am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena unter Prof. Dr. W. Boland zum Thema "Biosynthese von Palasonin und Cantharidin"

Jena, den

7.5 Veröffentlichungen und Vorträge

- Vortrag auf dem 21. Fränkischen Naturstofftreffen mit dem Titel
„Cantharidin und Palasonin im Wehrsekret von Insekten“
- Veröffentlichung zum Vorkommen und zur Enantiomerenanalytik von Palasonin
aus Insekten; in Vorbereitung für J. Chem. Ecol.
- Veröffentlichung zur Biosynthese von Cantharidin; in Vorbereitung für
Chemoecology

7.6 Danksagung

Ich danke

- Herrn Prof. Boland für das interessante Thema, die stete Anregung neuer Ideen und die Begeisterung für die chemische Ökologie.
- Herrn Prof. Beckert für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Universität Jena.
- Herrn Prof. Dettner für die gute Kooperation rund um das Thema ‚Cantharidin‘.
- meinen Laborkollegen Christoph Beckmann, Angelika Berg, Anja Biedermann, Dr. Rita Büchler, Dr. Jürgen Engelberth, Dr. Christian Hertweck, Dr. Michal Hoskovic, Dr. Andrew Jarvis, Verena Jung, Dr. Andreas Jux, Dr. Thomas Koch, Jürgen Kuhn, Dr. Maritta Kunert, Andrea Lehr, Dr. Patrice Marchand, Dr. Jörn Piel, Ryan Lauchli, Dr. Otmar Schaaf, Jana Schubert, Dieter Spittler, Dr. Christoph Steinbeck, Sabine Thiessen, Dr. Elke Trummer für die gute Stimmung und der vielen Hilfe bei allen Kleinigkeiten.
- Dr. Helmar Görls für die Messung der Kristallstruktur.
- Dr. Frank Kühnemann für die Bestimmung der Ethylenkonzentrationen mittels PAS.
- Dr. Neil Oldham und Janine Rattke für die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren.
- Dr. Renate Ellinger und Dr. Bernd Schneider für die Aufnahme der NMR-Spektren.
- dem Bibliotheksteam Linda Müller, Karina Merten, Anett Übel. Und Ulrike Krause für vieles, vieles mehr.

Mein besonderer Dank gilt

- meinen Mitbewohnern Birte und Göde für ein zweites Zuhause
- Grit Winnefeld und den weiteren vier Golmsdorfern für jede Hilfe in der Not
- Dr. Georg Pohnert für viele schöne und immer interessante Kilometer
- Dr. Gereon Glombitza und Dr. Stefan Bartram für noch mehr gemeinsame Kilometer und anregende Gespräche über Gott und die Welt und Chemie

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den

