

**Charakterisierung von *N*-Acyl-glutamin-
konjugaten aus dem Regurgitat von Lepidoptera
Larven**

Dissertation

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

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

von Diplom-Chemiker
Dieter Spittler

geboren am 23.10.1974 in Göttingen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland
2. Prof. Dr. Rainer Beckert
3. Prof. Dr. Dieter Strack

Tag der öffentlichen Verteidigung: 11.12.2002

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Abwehrmechanismen von Pflanzen	3
1.2	Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen	9
1.2.1	Elicitoren von Pathogenen	9
1.2.2	Elicitoren aus Herbivoren	11
2	Aufgabenstellung	13
3	Ergebnisse und Diskussion	16
3.1	Analyse des Regurgitates von Herbivoren	16
3.1.1	Untersuchung des Regurgitates von Arthropoden mittels LC-MS	16
3.1.2	Screening von Arthropoden nach <i>N</i> -Acyl-aminosäurekonjugaten	18
3.1.3	Abhängigkeit der Zusammensetzung des <i>N</i> -Acyl-glutaminkonjugat-spektrums von der Nahrung	20
3.1.4	<i>N</i> -(17-Hydroxy-acyl)-L-glutamin-konjugate	22
3.1.5	<i>N</i> -(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin und <i>N</i> -(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin	27
3.1.6	<i>N</i> -(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugate	37
3.1.7	<i>N</i> -(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminkonjugate	49
3.1.8	Bedeutung der <i>N</i> -(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminkonjugate	52
3.1.9	Untersuchungen zur Biosynthese der <i>N</i> -Acyl-glutamin-konjugate	54
3.1.10	Bedeutung und Wirkmechanismus der <i>N</i> -Acyl-glutaminkonjugate	75
3.1.11	Weitere Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen	83
3.2	8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäure, ein Alkaloid im Regurgitat von <i>Spodoptera</i> Larven	88
3.3	Bildung von Aminosäurekonjugaten beim Riechprozess des Seidenspinners (<i>Bombyx mori</i>)	90
3.3.1	Signalprozesse bei der Geruchswahrnehmung	90
3.3.2	Wahrnehmung von Benzoesäure durch <i>B. mori</i>	93
3.3.3	Identifikation des Benzoesäuremetaboliten	94
3.3.4	Dient die Konjugation zur Desaktivierung von Signalstoffen?	97
3.4	Untersuchungen zur Biosynthese von Geosmin	98

3.4.1	Vorkommen und Bedeutung von Geosmin	98
3.4.2	Studium der Biosynthese von Geosmin	100
4	Zusammenfassung und Ausblick	116
5	Summary	122
6	Experimenteller Teil	127
6.1	Materialien und Geräte	127
6.2	Allgemeine Arbeitsmethoden	129
6.3	Haltung der Herbivoren	130
6.4	Sammlung von Regurgitat	131
6.5	Screening von Insekten nach <i>N</i>-Acyl-aminosäurekonjugaten	131
6.6	Synthese von <i>N</i>-Acyl-aminosäurekonjugaten	132
6.6.1	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin (21)	132
6.6.2	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamat (25)	133
6.7	Stereochemie des Volicitins (19)	134
6.7.1	(17 <i>S</i> ,1' <i>R</i>)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17 <i>S</i>)- 31]	134
6.7.2	(17 <i>R</i> ,1' <i>R</i>)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17 <i>R</i>)- 31]	135
6.7.3	Hydrierung von (1' <i>R</i>)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)- linolensäuremethylester (31)	136
6.7.4	Konfiguration der 17-Hydroxygruppe von natürlichem Volicitin (19)	136
6.8	<i>N</i>-(15,16-Epoxy-linolenoyl)-glutamin (32) und <i>N</i>-(15,16-Dihydroxy- linoleoyl)-glutamin (33)	138
6.8.1	Strukturaufklärung von <i>N</i> -(15,16-Epoxy-linolenoyl)-glutamin (32) und <i>N</i> -(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (33)	138
6.8.2	Synthese von <i>N</i> -(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32) und <i>N</i> -(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)	139
6.9	<i>N</i>-(17-Acyloxy-acyl)-glutamine	145
6.9.1	Strukturaufklärung von <i>N</i> -(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten per LC-MS-MS	145
6.9.2	Bestimmung der Doppelbindungspositionen durch Ozonolyse	146
6.9.3	Synthese von (17 <i>S</i>)- <i>N</i> -(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)	147
6.9.4	Synthese von (17 <i>S</i>)- <i>N</i> -(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-L-glutamin (47)	156

6.10	Identifizierung von <i>N</i>-(17-Phosphonooxy-acyl)glutaminen	156
6.11	Versuche zur Biosynthese von <i>N</i>-Acyl-glutaminen	158
6.11.1	Einfluss des Substratangebots auf die Bildung von <i>N</i> -Acyl-aminosäurekonjugaten	158
6.11.2	Bildung von <i>N</i> -Acylaminosäurekonjugaten durch Darmbakterien aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven und <i>Manduca sexta</i> Larven	159
6.11.3	Isolierung von Mikroorganismen aus dem Darm von Lepidoptera Larven	159
6.11.4	Biosynthese von <i>N</i> -Acyl-glutaminen durch Mikroorganismen	160
6.11.5	Wachstumskurve der Mikroorganismen	160
6.11.6	Vergleich des Potentials der Mikroorganismen zur Bildung von <i>N</i> -Acyl- aminosäuren	161
6.11.7	Substratspezifität der Mikroorganismen bei der Bildung von <i>N</i> -Acyl- aminosäurekonjugaten	162
6.11.8	LC/APCI-MS Daten von <i>N</i> -Acyl-aminosäurekonjugaten	163
6.12	Untersuchungen zum Stoffwechsel der <i>N</i>-Acyl-aminosäuren	165
6.12.1	Herkunft der Glutaminkomponente in <i>N</i> -Acyl-glutaminen	165
6.12.2	Versuche zur Gewinnung mikroorganismenfreier Raupen	167
6.13	Anzucht von Limabohnen (<i>Phaseolus lunatus</i>)	169
6.14	Duftassay mit Limabohnen	169
6.14.1	Inkubation von Limabohnen mit <i>N</i> -Acyl-aminosäurekonjugaten und Volicitin	169
6.14.2	Inkubation von Limabohnen mit NaOH-, KOH- und NaCl-Lösungen	170
6.14.3	Inkubation von Limabohnen mit Tris- und Mes-Pufferlösungen bei verschiedenen pH Werten	172
6.14.4	Inkubation von Limabohnen mit BHI-Medium	173
6.15	Tensideigenschaften von <i>N</i>-Acyl-aminosäuren	174
6.16	Black-Lipid-Membrane Assay	175
6.17	Ein Alkaloid aus dem Regurgitat von <i>Spodoptera</i> Larven: 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90)	176
6.18	Untersuchungen zur Desaktivierung von Benzoesäure in Antennen von <i>Bombyx mori</i>	177
6.18.1	Herkunft und Haltung von <i>B. mori</i>	177
6.18.2	Beblasen von <i>B. mori</i> Antennen mit Benzoesäure	177

6.18.3	Inkubation der Antennen von <i>B. mori</i> mit Benzoesäure	177
6.18.4	Kontrollversuche	178
6.18.5	Identifikation von Metaboliten	178
6.19	Untersuchungen zur Geosminbiosynthese in <i>Streptomyces</i> spp. und dem Lebermoos <i>Fossombronia pusilla</i>	180
6.19.1	Deuterierte Terpenbiosynthesevorstufen	180
6.19.2	Kultivierung des Lebermooses <i>Fossombronia pusilla</i>	180
6.19.3	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> sp. JP95 und „ <i>Streptomyces maritimus</i> “	181
6.19.4	Fütterung markierter Terpenbiosynthesevorstufen und Sammlung der Duftstoffe	181
6.19.5	GC-MS Analyse der Duftproben	181
6.19.6	EI-MS Spektren von Geosmin (96)	182
6.19.7	Inkubation von <i>Streptomyces</i> sp. JP95 mit [² H ₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97)	183
6.19.8	Stereochemie von Geosmin (96) aus <i>Streptomyces</i> spp. und <i>Fossombronia pusilla</i>	184
7	Literaturverzeichnis	185
8	Anhang	199
8.1	Spektren	199
8.1.1	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin (21)	199
8.1.2	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamat (25)	201
8.1.3	(17 <i>S</i> ,1' <i>R</i>)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17<i>S</i>)-31]	203
8.1.4	15,16-Epoxylinolsäure (38)	206
8.1.5	<i>N</i> -(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)	209
8.1.6	<i>N</i> -(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)	212
8.1.7	Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)	215
8.1.8	9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)	217
8.1.9	(2 <i>S</i>)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)	219
8.1.10	(4 <i>S</i>)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)	221
8.1.11	(1 <i>S</i>)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)	223
8.1.12	(17 <i>S</i>)-17-Linolenoyloxy-linolsäure-(2-trimethylsilyl)-ethylester (62)	225
8.1.13	(17 <i>S</i>)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (63)	227

8.1.14	(17S)- <i>N</i> -(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)	229
8.2	Abkürzungsverzeichnis	231
8.2.1	Allgemeine Abkürzungen	231
8.2.2	Abkürzungen bei NMR-Spektren	234
8.2.3	Abkürzungen bei IR-Spektren	234
8.3	Publikationen und Vorträge	235
8.3.1	Publikationen	235
8.3.2	Vorträge und Poster	236
8.4	Lebenslauf	237
9	Dank	238

1 Einleitung



Abbildung 1: Kupferstich aus dem Buch von Marie Sybilla Merian „Der Raupen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung“ (1679), der den Lebenszyklus eines Tagpfauenauges darstellt^[1]

Vor etwa 350 Jahren stellte Marie Sybilla Merian (1647-1717) in ihrem Buch „Der Raupen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung“^[1] den Lebenszyklus eines Schmetterlings vom Larvenstadium zur Puppe und schließlich zum Schmetterling dar (Abbildung 1). Insekten galten zu dieser Zeit generell als

Ungeziefer und Raupen hielt man für „Teufelsgeziefer“, das sich von Dreck ernährt. Marie Sybilla Merian war nicht nur Naturmalerin, sondern auch Naturforscherin, die von der Metamorphose einer Raupe zum Schmetterling fasziniert war (siehe Abbildung 2):

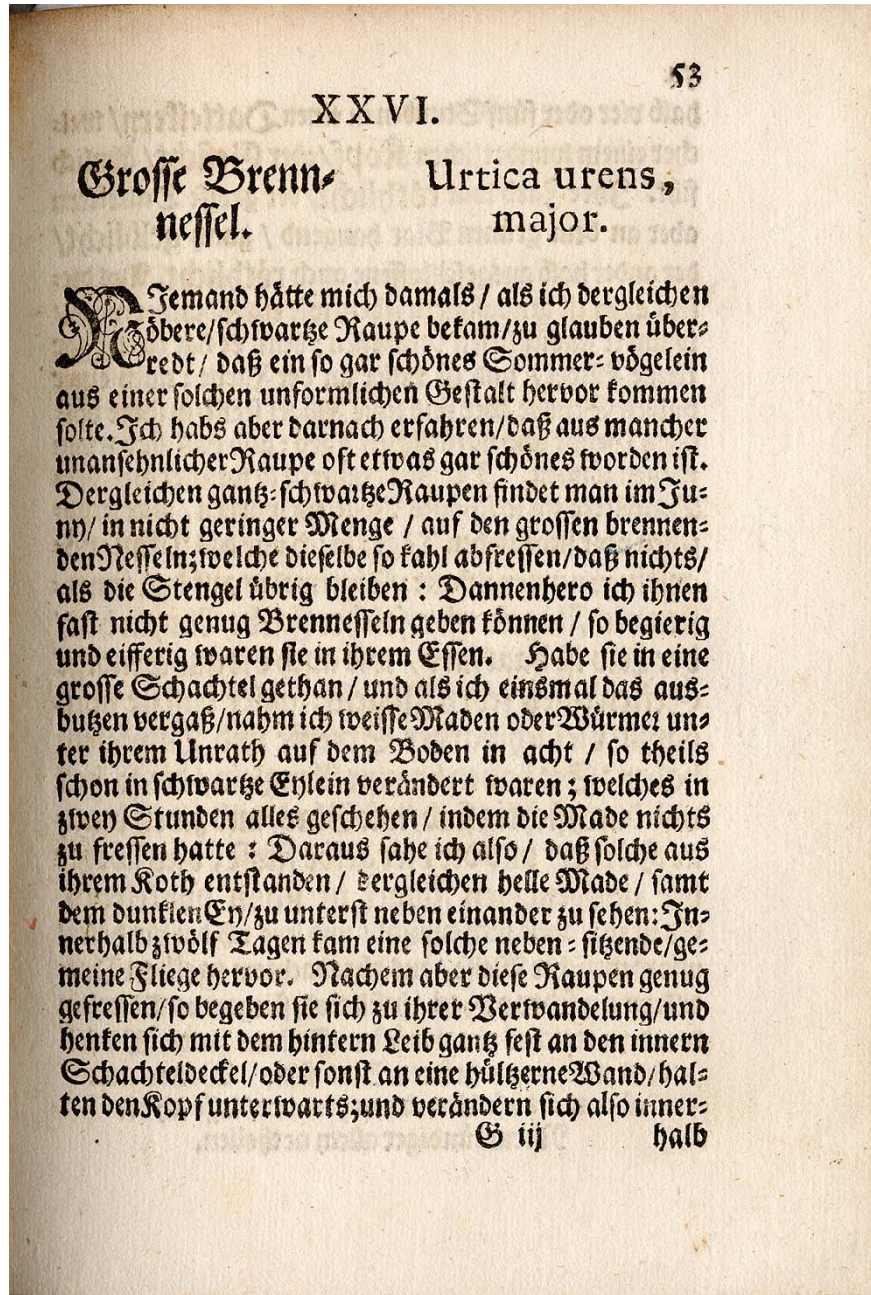


Abbildung 2: Beschreibung des Lebenszykluses von Schmetterlingslarven^[1]

Sie beschreibt sehr anschaulich, dass Raupen in erster Linie fressen und dabei ihre Futterpflanzen häufig beträchtlich schädigen.

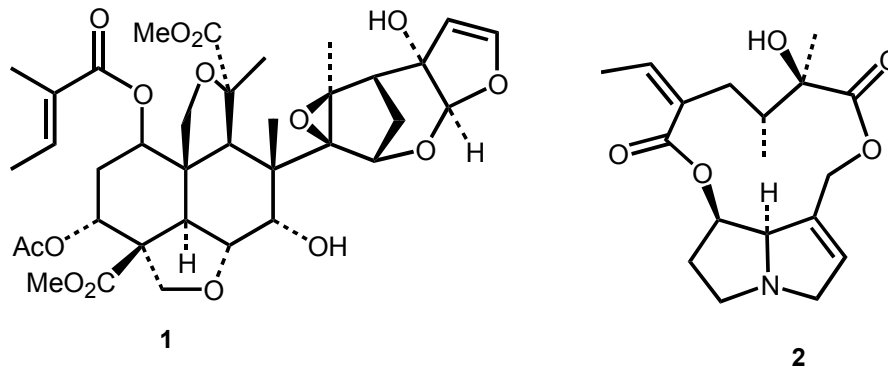
1.1 Abwehrmechanismen von Pflanzen



Abbildung 3: *Spodoptera littoralis* Raupe, die an einem Blatt frisst. (Foto: Dr. Sabine Thiessen)

Um sich gegen Herbivore, z. B. *Spodoptera littoralis* Larven (siehe Abbildung 3) schützen zu können, haben viele Pflanzen effektive Abwehrmechanismen entwickelt. So dienen Stacheln oder ledrige Blätter als mechanischer Schutz.^[2] Neben mechanischen Barrieren bedienen sich Pflanzen oftmals einer chemischen Verteidigung gegen Fraßfeinde. Beispielsweise enthält der indische Nimbaum (*Azadirachta indica*) ein äußerst wirksames Insektizid, das Azadirachtin (**1**) (siehe Schema 1).^[3]

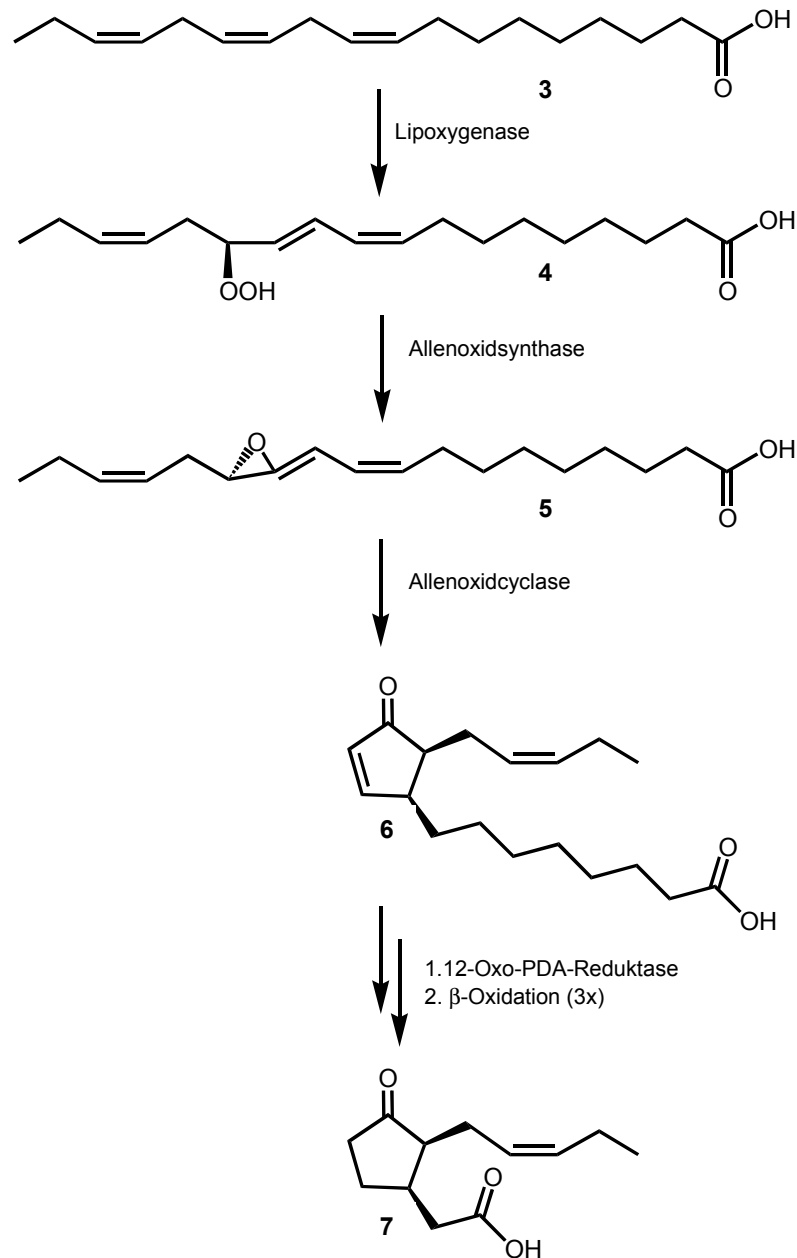
Allerdings gibt es auch Herbivore, die durch Anpassung gelernt haben, mit Giftstoffen von Pflanzen fertig zu werden.^[4] Dadurch haben sie den Vorteil, Konkurrenz um das Futter nicht fürchten zu müssen. Außerdem nutzen manche Insekten die Toxine ihrer Futterpflanze für die eigene Verteidigung. Ein intensiv studiertes Beispiel für eine solche coevolutionäre Anpassung sind die Pyrrolizidinalkaloide wie Senecionin (**2**) (siehe Schema 1), die spezialisierte Raupen mit ihrer Nahrung aufnehmen und in inaktivierter Form, z. B. als N-Oxide, speichern, um sie bei Gefahr für die eigene Verteidigung einzusetzen.^[5, 6]



Schema 1: Azadirachtin (**1**) und das Pyrrolizidinalkaloid Senecionin (**2**) als Beispiele für pflanzliche Toxine

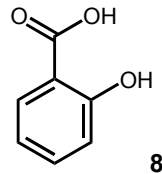
Statt einer energieaufwendigen konstitutiven Abwehr durch die fortwährende Produktion von Toxinen verwenden viele Pflanzen ressourcensparendere induzierte Abwehrmechanismen.^[7-9] Erst bei Schädigung durch Herbivore oder Pathogene werden Toxine, Proteinase-Inhibitoren^[10] oder Duftstoffe^[11, 12] gebildet. Letztere dienen zur Anlockung der natürlichen Feinde von Herbivoren.^[13, 14] Außerdem wird bei der induzierten Bildung von Pflanzenabwehrstoffen im Gegensatz zur konstitutiven Abwehr eher verhindert, dass Schädlinge durch Anpassung gegen Toxine resistent werden.^[15]

Durch Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes von Signaltransduktionsmechanismen^[16, 17] können Pflanzen auf unterschiedliche Schädigungen mitunter spezifisch reagieren.^[18] Einer der am besten und intensivsten studierten Signalwege ist der Octadecanoid-Weg: Bei Schädigung der Zellmembran wird Linolensäure (**3**) aus Phospholipiden freigesetzt. Freie Linolensäure (**3**) wird durch eine 13-Lipoxygenase zu 13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (**4**) umgesetzt. Eine Allenoxidsynthase bildet das Allenoxid (**5**), das zu 12-Oxophytodiensäure (**6**) cyclisiert wird. Nach 3-maliger β -Oxidation entsteht aus 12-Oxophytodiensäure (**6**) Jasmonsäure (**7**).^[19, 20] Jasmonsäure (**7**), die erstmals aus Kulturen von *Lasiodiplodia theobromae* isoliert wurde,^[21] wirkt als Phytohormon^[22] auf viele pflanzliche Prozesse wie z. B. Wachstum^[23] und Alterung.^[24] Sie leitet aber auch Abwehrreaktionen ein.^[10, 25-29] Der biosynthetische Vorläufer der Jasmonsäure (**7**), die 12-Oxophytodiensäure (**6**), induziert ebenfalls Verteidigungsreaktionen.^[27] Interessanterweise beobachtet man im Vergleich zu Jasmonsäure (**7**) aber qualitative und quantitative Unterschiede.^[18]



Schema 2: Octadecanoid-Weg: Bildung von (9*S*,13*S*)-12-Oxophytodiensäure (12-Oxo-PDA) (**6**) und (3*R*,7*S*)-Jasmonsäure (**7**)

Abgesehen von 12-Oxophytodiensäure (**6**) und Jasmonsäure (**7**) wird aus Linolensäure (**3**) eine Vielfalt weiterer Oxylipine gebildet,^[30-32] die ebenfalls in Abwehrmechanismen der pflanzlichen Verteidigung involviert sind. Neben solchen lipidischen Signalmolekülen ist auch Salicylsäure (**8**) ein bedeutendes Signalmolekül, insbesondere bei der pflanzlichen Verteidigung gegen Pathogene und Mikroorganismen (siehe Schema 3).^[33]



Schema 3: Strukturformel von Salicylsäure (8)

Eine weitere wichtige Rolle bei Signalprozessen spielen Ionenflüsse.^[34] Durch Änderung des Membranpotentials können Signale extrem schnell weitergeleitet werden, beispielsweise durch Regulation des intrazellulären Calciumhaushaltes.^[35, 36]

Nach Durchlaufen der geschilderten Signalkaskaden kommt es letztendlich zur Genaktivierung,^[37] der Produktion von Proteinase-Inhibitoren,^[38] der Emission von Ethylen^[39] und Duftstoffen.^[26] In Abbildung 4 ist der gegenwärtige Kenntnisstand der Signalprozesse bei pflanzlicher Abwehr grob skizziert:

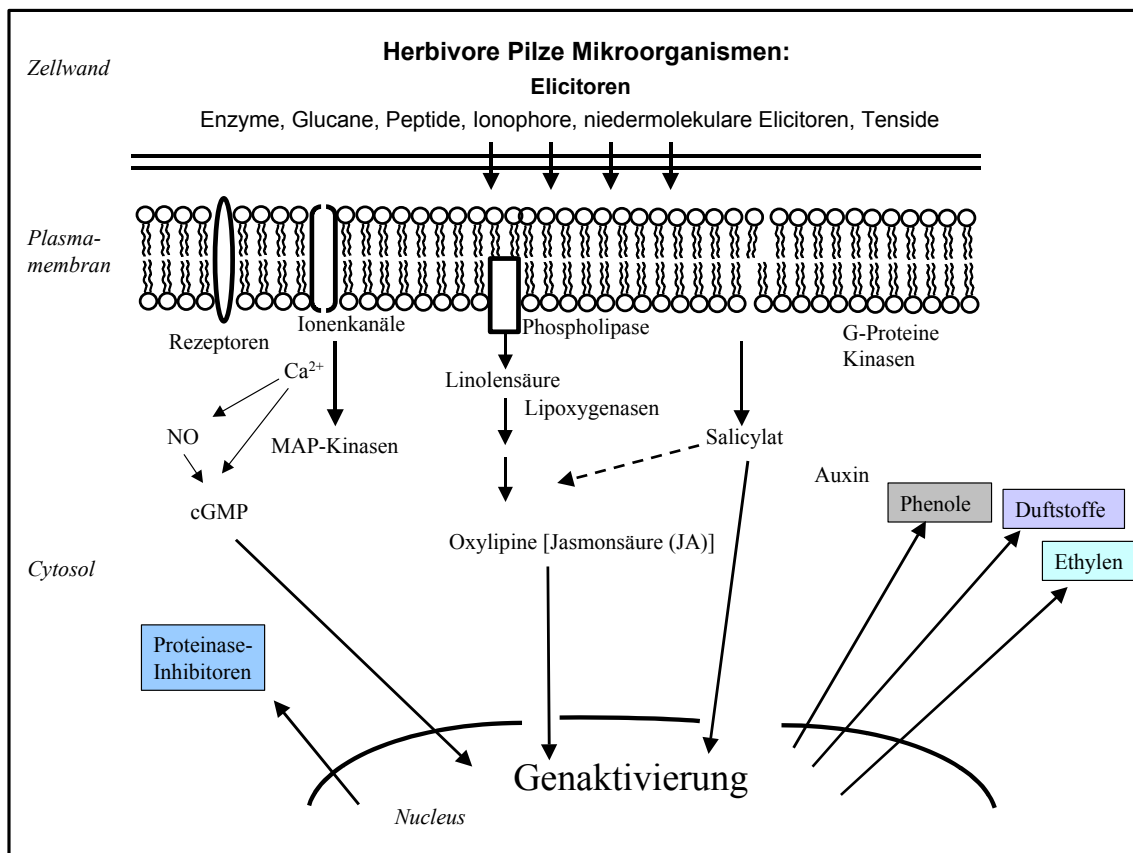


Abbildung 4: Signalwege pflanzlicher Reaktionen gegen Herbivore, Pathogene und Umwelteinflüsse

Wie bereits erwähnt reagieren viele Pflanzen auf Schädigung mit der Produktion von Duftstoffen.^[11, 12] Die flüchtigen Stoffe sind als „molekularer Hilferuf“ zu verstehen.^[40]

So konnten beispielsweise Turlings *et al.* zeigen, dass parasitische Schlupfwespen (*Cotesia marginiventris*) vom Duft angelockt werden, den Maispflanzen nach Fraßschädigung durch *Spodoptera exigua* Larven emittieren.^[12, 13, 41] Dicke *et al.* beobachteten Gleiches für Raubmilben (*Phytoseilus persimilis*), die vom Duftbouquet einer mit Spinnmilben befallenen Bohne angezogen werden.^[14] Am Beispiel von Tabakpflanzen wurde in Freilandversuchen die Effizienz der indirekten pflanzlichen Abwehr durch Duftstoffe gezeigt.^[42] In den letzten Jahren gelang der Beweis, dass die einer befallenen Pflanze benachbarten Pflanzen auf die freigesetzten Duftstoffe mit der Eigenproduktion von Abwehrstoffen reagieren.^[43-45]

In Abbildung 5 ist ein Gaschromatogramm eines typischen Duftmusters einer Limabohne (*Phaseolus lunatus*) nach 24 h Fraßschädigung durch *Spodoptera* Larven reproduziert.

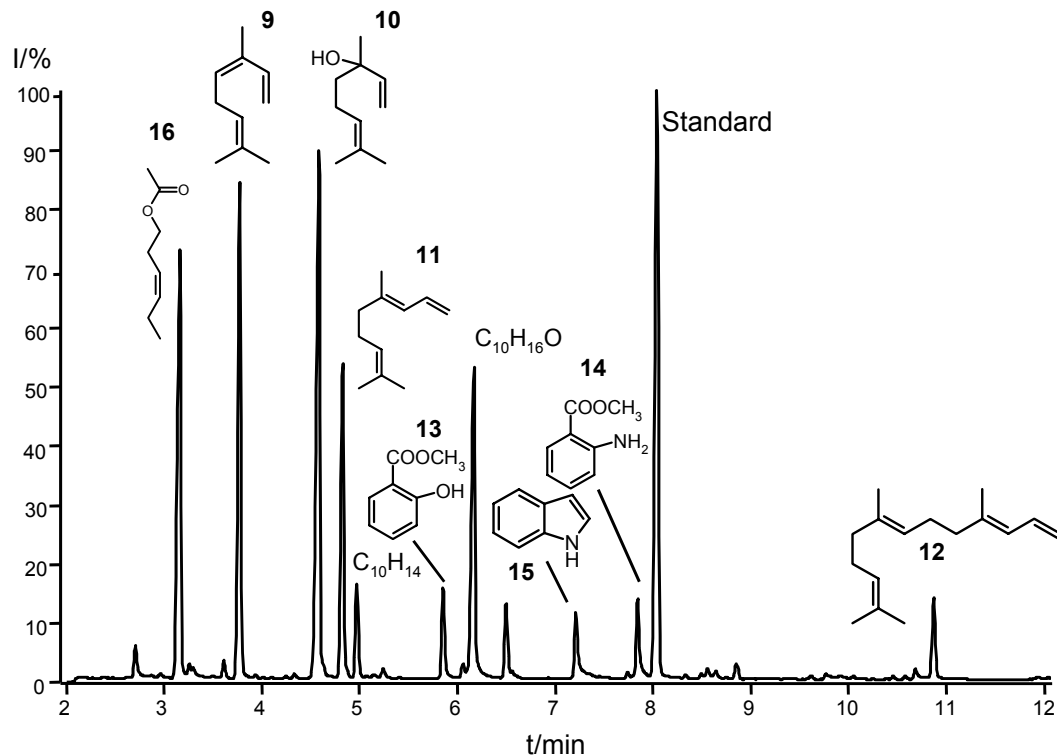


Abbildung 5: Gaschromatogramm^a eines typischen Duftspektrums einer Limabohne, die 24 h dem Fraß von *Spodoptera* Larven ausgesetzt war

^aSammlung der Duftstoffe durch „closed loop stripping“ an Kohlefilter;^[46] GC-MS Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml/min,

Im Duftspektrum^[26, 46] der Limabohne beobachtet man nach Raupenfraß die Freisetzung von Terpenen wie Ocimen (**9**), Linalool (**10**), 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) (**11**)^[47] und 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) (**12**)^[47]. Auch aromatische Verbindungen wie Methylsalicylat (**13**), Methylantranilat (**14**) und Indol (**15**), sowie fettsäureabgeleitete Hexenyl-Verbindungen, z. B. Hexenylacetat (**16**) werden gebildet (siehe Abbildung 5).

Die Terpene werden bei der Limabohne erst nach Aktivierung einer der Signalkaskaden, z. B. des Octadecanoid-Weges, *de novo* produziert und emittiert, wie durch Applikation von Intermediaten des Octadecanoid-Weges und insbesondere durch ein Endprodukt dieses Stoffwechselweges, Jasmonsäure (**7**), gezeigt werden konnte.^[26] Da diese flüchtigen Verbindungen nicht bei bloßer mechanischer Verwundung beobachtet werden,^[48] sollte bei der Erkennung des Fraßfeindes durch die Pflanze eine chemische Komponente, ein Elicitor der Duftstoffbiosynthese von Pflanzen, beteiligt sein.

1.2 Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen

Chemische Verbindungen, die bei einem Organismus eine spezifische Reaktion auslösen, werden als Elicitoren bezeichnet.

1.2.1 Elicitoren von Pathogenen

Bisher sind etwa 250 Elicitoren aus Pathogenen isoliert worden,^[49] die bei Pflanzen Abwehrreaktionen verursachen. Allerdings sind nicht viele Elicitoren bekannt, die zur Emission von Duftstoffen bei Pflanzen führen. Ein besonders potenter Elicitor der Duftstoffbiosynthese^[26, 50] und der Freisetzung von Ethylen^[51] ist die niedermolekulare Verbindung Coronatin (**17**) (siehe Abbildung 6),^[52] die aus *Pseudomonas syringae* isoliert wurde. Coronatin weist große strukturelle Ähnlichkeit mit Jasmonsäure (**7**) und 12-Oxophytodiensäure (**6**) auf.^[53] Umfangreiche Struktur-Wirkungsanalysen durch synthetische Modifizierung von Coronatin (**17**) führten zu substituierten Indanoyl-L-isoleucinen (**18**) (siehe Abbildung 6).^[54, 55]

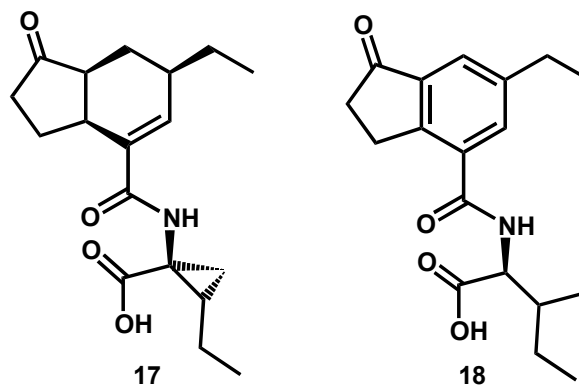


Abbildung 6: Coronatin (**17**) aus *Pseudomonas syringae* und sein synthetisches Analogon Ethylindanoyl-L-isoleucin (**18**)

Ein weiterer Elicitor der Synthese von Duftstoffen ist Alamethicin, ein peptidischer Ionophor,^[56, 57] der aus dem Pilz *Trichoderma viride* stammt. Bei der Limabohne induziert Alamethicin in hohem Maße die Synthese der Homoterpene DMNT (**11**) und TTMT (**12**) sowie die Bildung von Methylsalicylat (**13**).^[58, 59] Andere Komponenten des typischen Bohnenduftes, wie man ihn nach Fraß von Raupen beobachtet, werden nicht gebildet. Untersuchungen weiterer Ionophore zeigten ein ähnliches Verhalten im Duftassay.^[58] Während die Limabohne somit auf Elicitoren unterschiedlicher Signalwege differenziert reagiert (siehe Abbildung 7), beobachtet man bei Maispflanzen diese differenzierte Emission von Duftstoffen nicht.

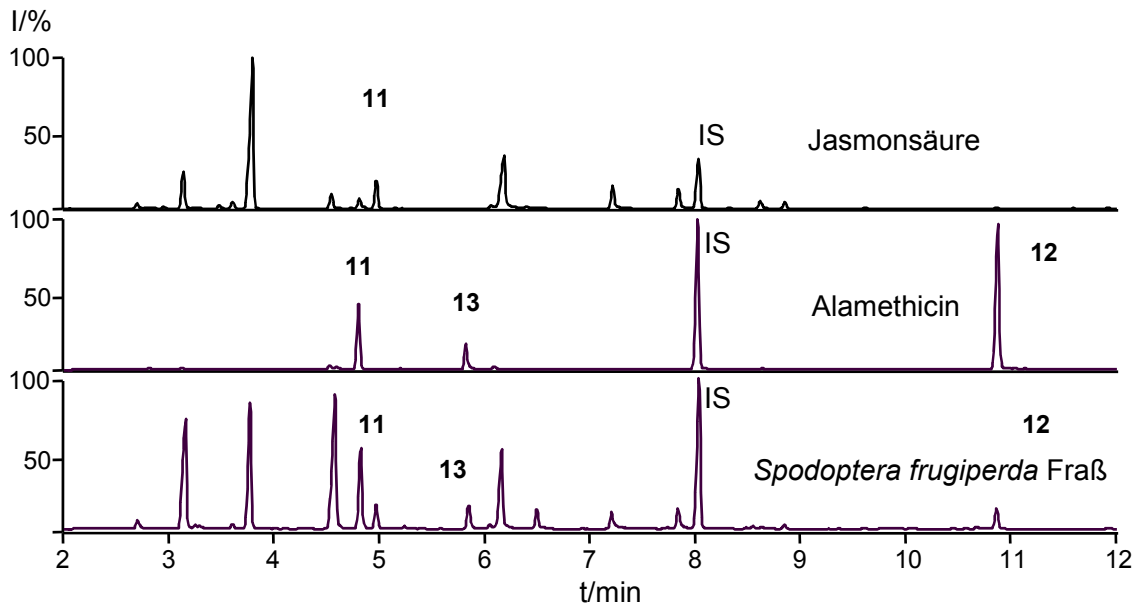


Abbildung 7: Gaschromatogramme^b unterschiedlicher Duftmuster einer Limabohne nach 24 h Behandlung mit Jasmonsäure bzw. Alamethicin und nach Herbivorie durch *S. frugiperda* Larven. IS: interner Standard: Bromdecan 200 µg/ml

^b Sammlung der Duftstoffe durch „closed loop stripping“ an Kohlefilter;^[46] GC-MS Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml/min, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, 10°C/min 200°C, 30 °C/min 280 °C 1 min; Injektortemperatur 220 °C; Split: 1:10

1.2.2 Elicitoren aus Herbivoren

Im Gegensatz zu Pathogenen wurden von herbivoren Insekten bisher nur zwei Vertreter unterschiedlicher Verbindungsklassen als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese bei Pflanzen charakterisiert: eine β -Glucosidase bei *Pieris brassicae* Larven^[60] und *N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin^c (Volicitin) (**19**) aus dem Regurgitat^d von *Spodoptera exigua* Raupen.^[61]

Die Auslösung der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese durch β -Glucosidasen konnte allerdings nur indirekt gezeigt werden: Regurgitat von *Pieris brassicae* Larven weist eine hohe β -Glucosidase Aktivität auf.^[60] Versuche mit einer käuflichen β -Glucosidase aus Mandeln zeigten, dass dieses Enzym bei der Limabohne die Duftstoffbiosynthese induzieren kann.^[25]

1997 gelang es Alborn *et al.* aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven *N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin (**19**) zu isolieren. Diese Verbindung wurde Volicitin (**19**) genannt, da sie bei Bioassays mit Maispflanzen die Bildung von flüchtigen Stoffen verursacht.^[61]

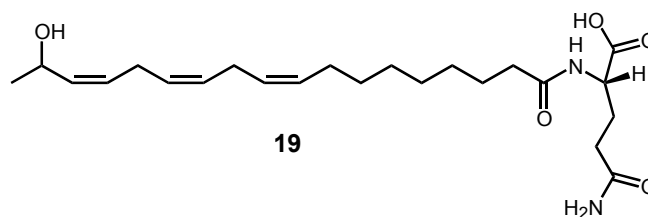


Abbildung 8: Struktur von *N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin (Volicitin) (**19**)

Als erster niedermolekularer Elicitor erregte Volicitin großes Aufsehen. Genetische Untersuchungen zweier unabhängiger Arbeitsgruppen zeigten, dass Volicitin (**19**) sowohl die Indolbiosynthese^[62] als auch die Terpenbiosynthese^[63] bei Maispflanzen auslöst.

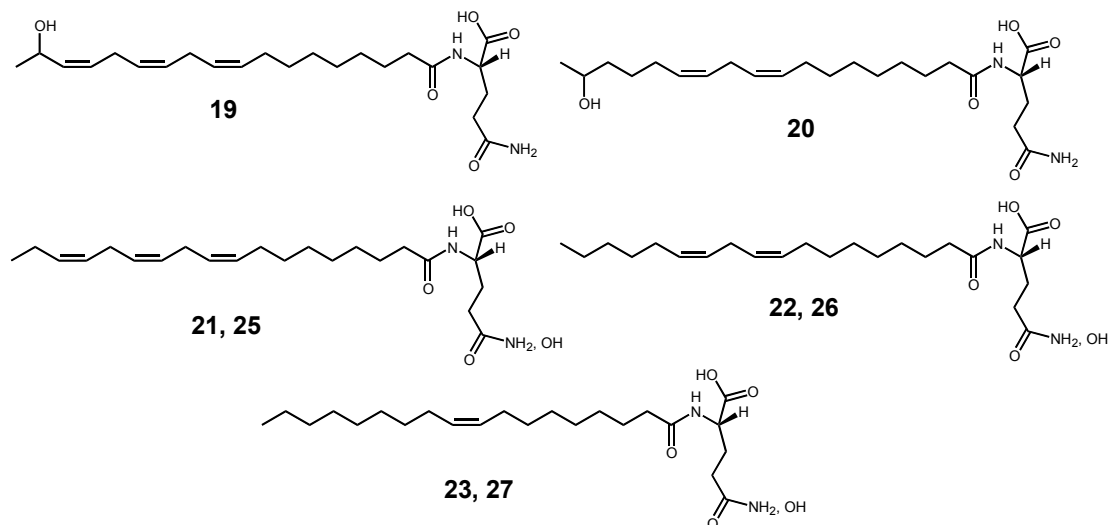
Im Gegensatz dazu wurde bei Versuchen mit Limabohnen nach Applikation von Volicitin (**19**) keine Induktion der Duftstoffbiosynthese beobachtet.^[64]

Kürzlich wurden im Regurgitat von Lepidopteren zu Volicitin (**19**) verwandte Verbindungen wie *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**20**), *N*-Linolenoyl-L-glutamin

^c Sämtliche in dieser Arbeit bezeichneten *N*-Acylaminosäurekonjugate verstehen sich als *N*^α-Acylaminosäuren. Der Acylrest ist über eine Amidbindung mit der α -Aminogruppe von Aminosäuren verknüpft.

^d Regurgitat ist der Vorderdarminhalt von Raupen, den diese bei Reizung oder Gefahr hervorwürgen.

(**21**), *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**) und *N*-Oleoyl-L-glutamin (**23**) nachgewiesen (siehe Schema 4).^[65, 66] Im Regurgitat von *Manduca sexta* Raupen wurden *N*-Acylglutamate und *N*-Acyl-glutamine gefunden, die beim Tabak die Duftstoffbiosynthese auslösen (siehe Schema 4).^[67]



Schema 4: Häufige *N*-Acyl-glutamin- bzw. *N*-Acyl-glutamatkonjugate aus dem Regurgitat von Arthropoden

Volicitin (**19**) und *N*-Acyl-glutamine wie *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) wurden bisher in erster Linie wegen ihrer Bedeutung als Elicitoren untersucht.^[61-64, 67] Detaillierte Vorstellungen über mechanistische Aspekte ihrer Wirkungen liegen aber noch nicht vor.

Erste Untersuchungen zur Biosynthese belegten eindrucksvoll, dass Volicitin (**19**) direkt aus den Fettsäuren der Nahrung gebildet wird, während im Gegensatz dazu das Glutamin (**24**) nicht direkt von der Futterpflanze stammt.^[65] Die Bedeutung des Volicitins und verwandter langkettiger *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate für die Raupe ist noch unerforscht.

2 Aufgabenstellung

Viele Pflanzen reagieren auf Befall durch Schädlinge, Pathogene oder Herbivore, mit höchst vielfältigen Verteidigungsmechanismen. Solche Reaktionen, beispielsweise die Produktion von Jasmonsäure oder die Freisetzung von Duftstoffen und Ethylen, werden seit langem intensiv erforscht.^[10, 20, 22, 27, 28] Daher sind für viele Verteidigungsreaktionen von Pflanzen immer mehr Details, zunächst über die chemischen Strukturen, dann über deren Biogenese und Regulation und schließlich in jüngster Zeit auch über die beteiligten Enzyme und Gene^[37, 68] bekannt geworden. Man beginnt das komplexe und faszinierende Netzwerk pflanzlicher Signalwege immer besser zu verstehen.^[59, 69]

Auf die entscheidende Frage, wie all diese Verteidigungsprozesse bei Befall einer Pflanze durch einen Herbivoren z. B. eine Raupe ausgelöst werden, ist bisher allerdings nur wenig bekannt. Da nach einfacher mechanischer Verwundung, z. B. von einer Limabohne, keine Emission von Duftstoffen beobachtet wird, sollten bei der Erkennung des Schädlings durch die Pflanze chemische Verbindungen involviert sein. Während des Fraßprozesses werden in verletztes Pflanzengewebe chemische Verbindungen des Regurgitates und Enzyme aus den Salivardrüsen der Herbivoren eingetragen. Hoch- und niedermolekulare Verbindungen aus diesem komplexen Gemisch kommen daher als Elicitoren der pflanzlichen Abwehr in Betracht. Neben Verbindungen, die bei Pflanzen Verteidigungsreaktionen induzieren, finden sich im Regurgitat aber auch Komponenten, die - im Interesse des Herbivoren - die pflanzliche Abwehr lahm legen können. So wurde festgestellt, dass Glucoseoxidase von Raupen in der Lage ist, den Gehalt an toxischem Nikotin in Tabakpflanzen signifikant zu reduzieren.^[70] Auch niedermolekulare Verbindungen im Darm von Raupen können als Schutz gegen pflanzliche Toxine fungieren. Mit hohen Konzentrationen an Glycin im Darm schützen sich *Brahmaea wallichii* Raupen gegen Iridoide, indem deren reaktive Dialdehydgruppen mit Glycin anstelle von Proteinen reagieren.^[71]

Um die Reaktionen beim Fraßprozess und damit die Entstehung bzw. Unterbindung von pflanzlichen Signalen besser verstehen zu können, muss die chemische Zusammensetzung des Regurgitates erforscht werden. 1997 wurde Volicitin [*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin] (**19**) von Alborn *et al.* aus dem Regurgitat von *Spodoptera exigua* Larven isoliert und als Elicitor der Duftstoffbiosynthese bei

Maispflanzen (*Zea mais*) erkannt.^[61] Neben Volicitin (**19**) findet man im Regurgitat von vielen Lepidopteren verwandte *N*-Acyl-glutamin-konjugate, die ebenfalls die Duftstoffbiosynthese in Pflanzen induzieren.^[67]

Ziel dieser Doktorarbeit sollte sein, zur chemischen Charakterisierung der Zusammensetzung des Regurgitates von Lepidopterenlarven beizutragen. Nur auf diese Weise wird es möglich sein, die komplexen Vorgänge beim Fraß von Schädlingen an Pflanzen im Detail verstehen zu können.

N-Acyl-glutamine werden als Elicitoren bei Mais-^[61-63] und Tabakpflanzen^[67] große Bedeutung beigemessen. Daher sollte auf diese Verbindungsklasse im Regurgitat verschiedener Lepidopterenlarven besonderes Augenmerk gerichtet werden.

Dabei ergaben sich insbesondere diese Fragestellungen:

- Wie weit sind Volicitin (**19**) und *N*-Acyl-glutamin-konjugate im Regurgitat von Lepidopteren bzw. Arthropoden verbreitet? Um Aufschluss darüber zu bekommen, sollte Regurgitat unterschiedlicher Lepidopterenlarven und anderer Arthropoden untersucht werden.
- Findet man im Regurgitat unterschiedlicher Raupen immer *N*-Acyl-glutamine oder werden auch andere Aminosäuren zu *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten umgesetzt? Für eine genauere Analyse des Regurgitates von Lepidopteren wurden *Spodoptera exigua*, *S. frugiperda*, *S. littoralis* und *Heliothis virescens* Larven ausgewählt. In den Sekreten dieser Larven sollte nach weiteren Verbindungen gesucht werden, die möglicherweise als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese oder pflanzlicher Abwehrreaktionen von Bedeutung sein könnten.
- Welche Konfiguration hat die 17-Hydroxygruppe des Volicitins? Bei biologisch relevanten Verbindungen wird in der Regel nur ein wirksames Stereoisomer gebildet. Bisher war es nicht gelungen, die Stereochemie der 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) aufzuklären. Biosynthetische Untersuchungen bzw. Struktur-Wirkungsanalysen bei der Induktion der pflanzlichen Duftstoffsynthese setzen die Kenntnis der Stereochemie der 17-Hydroxygruppe voraus. Daher sollte eine Methode zur Analyse der absoluten Konfiguration der 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) aus dem Regurgitat von Lepidopterenlarven erarbeitet werden.
- Wie werden die *N*-Acyl-glutamine hergestellt? Im Laufe der Untersuchungen zur Biosynthese der *N*-Acyl-glutamine stellte sich heraus, dass die Verbindungen von

Darmbakterien synthetisiert werden können. Daraus ergab sich die neue Fragestellung, welche Mikroorganismen in der Lage sein werden, *N*-Acyl-glutamine und möglicherweise Volicitin (**19**) herzustellen. Deshalb war es notwendig, die Darmbakterien von Lepidopterenlarven zu isolieren und auf ihre Fähigkeit zur Herstellung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten zu untersuchen. Desweiteren stellte sich die Frage, ob nur die Darmbakterien oder auch die Raupen selbst zur Synthese von *N*-Acyl-glutaminen befähigt sind.

- Die oben dargelegten Probleme erregten das Interesse, nach Funktion und Bedeutung des Volicitins (**19**) und der anderen *N*-Acyl-aminosäurekonjugate zu suchen, die diesen Verbindungen neben ihrer Wirkung als Elicitoren der Duftstoffbioynthese bei manchen Pflanzen zukommt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analyse des Regurgitates von Herbivoren

3.1.1 Untersuchung des Regurgitates von Arthropoden mittels LC-MS

Viele Raupen reagieren auf Reizung und Gefahr mit dem Hervorwürgen ihres Vorderdarminhaltes, des Regurgitates. Diese Abwehrreaktion kann man zum Sammeln von Regurgitat nutzen, indem man eine Raupe hinter dem Kopf mit einer Federstahlpinzette greift und das durch diese Reizung hervortretende Regurgitat mittels einer Kapillare auffängt (siehe Abbildung 9).

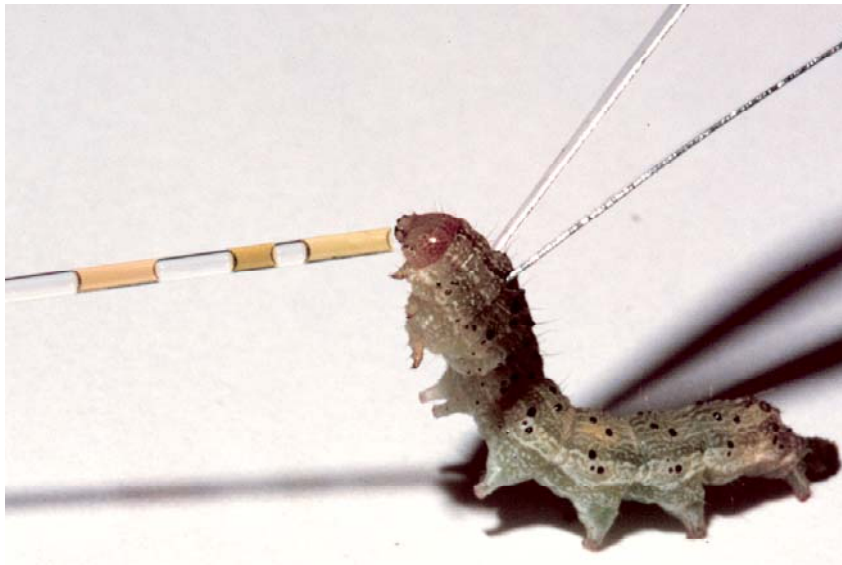


Abbildung 9: Sammlung von Regurgitat einer *H. virescens* Raupe mittels einer Federstahlpinzette und einer Glaskapillare (Foto: Dr. Sabine Thiessen).

Alternativ kann der Darminhalt durch Sezieren des Tieres gewonnen werden. Regurgitat oder Darminhalt werden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Versetzen mit Methanol zum Ausfällen von Proteinen und zur Unterbindung enzymatischer Aktivität wird zentrifugiert. Der Überstand wird per LC-MS mit einer RP18 Microbore Säule analysiert (siehe Abbildung 10). Die Identifizierung der Konjugate erfolgt an Hand ihrer APCI-Massenspektren und durch Retentionszeitvergleich mit Referenzverbindungen.

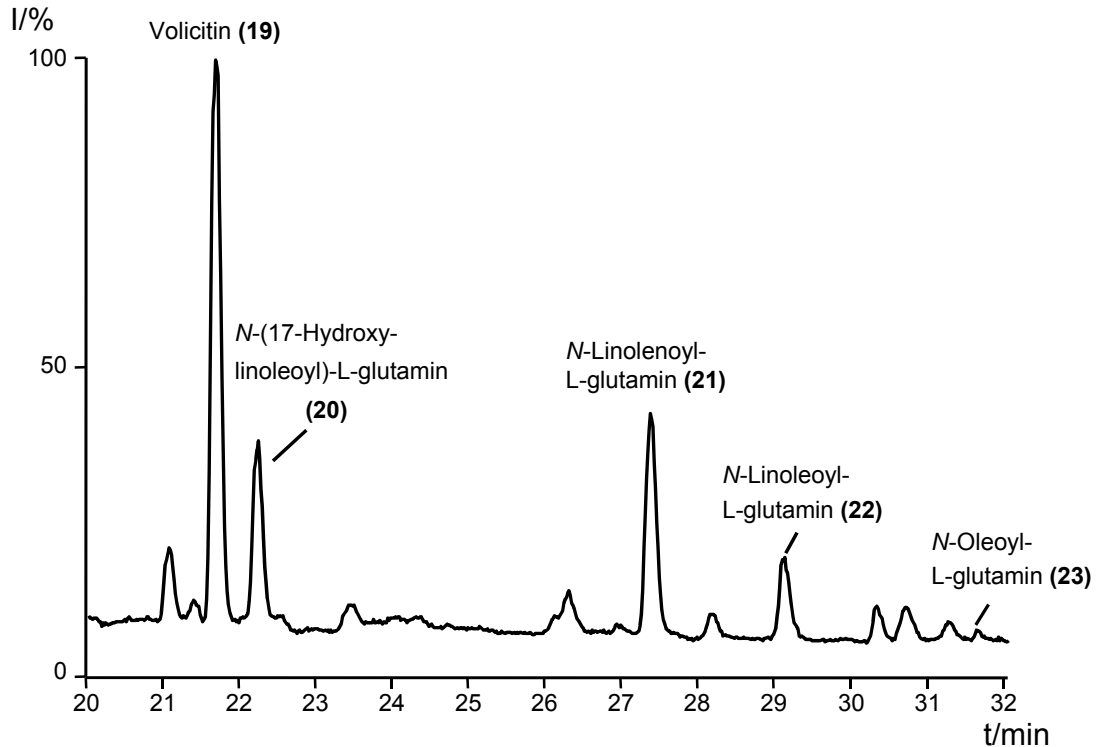


Abbildung 10: RP18 HPL-Chromatogramm^e des Regurgitates von *S. exigua* Larven

Neben Volicitin (**19**) wird eine Reihe weiterer Konjugate, besonders *N*-(17-Hydroxylinoleoyl)-L-glutamin (**20**), *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**), *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**) und *N*-Oleoyl-L-glutamin (**23**) gefunden (siehe Abbildung 10 und Schema 4).^[66]

In den APCI Massenspektren von unsubstituierten *N*-Acyl-L-glutaminen dominiert das $[M+H]^+$ -Ion. So beobachtet man im Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) (siehe Abbildung 11) das Pseudomolekülion $[M+H]^+ = 407$ als Basispeak. Daneben findet man ein Ion für den Linolenoylrest bei $m/z = 261$. Dieses Ion entsteht durch Spaltung der Amidbindung unter Verlust des Aminosäurerestes. Ein weiteres, für die *N*-Acyl-glutaminkonjugate charakteristisches Ion wird durch eine Spaltung gebildet, bei der ein Wasserstoffatom der Fettsäurekette auf den protonierten Aminosäurerest übertragen wird [Glutamin + 2 H ($m/z = 147$)].

^e HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

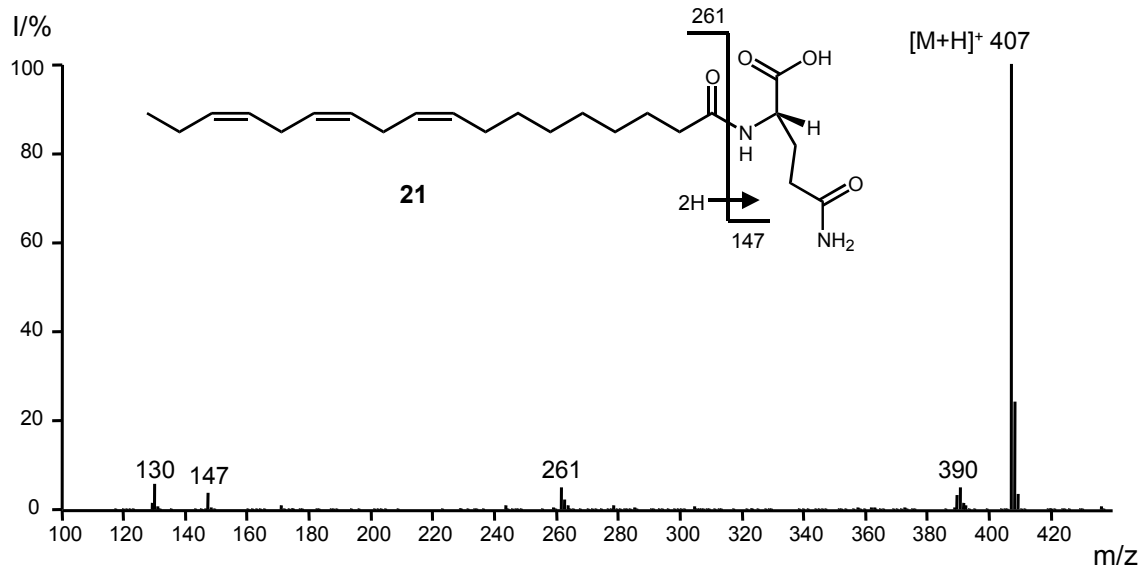


Abbildung 11: APCI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**)

3.1.2 Screening von Arthropoden nach *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

Um einen Eindruck über die Verteilung und Häufigkeit von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten (siehe Schema 4) in Insekten zu gewinnen, wurde Regurgitat bzw. Darminhalt von 16 verschiedenen Arthropodenarten per LC-MS analysiert (siehe Tabelle 1). Durch Untersuchungen von Pohnert *et al.* war bereits bekannt, dass Volicitin (**19**) und verwandte Konjugate nicht nur im Darm von *S. exigua* Larven, sondern auch in zahlreichen Lepidopteren und Geometriden zu finden sind.^[66] Im Darm einiger der untersuchten Arthropoden, z. B. in *Manduca sexta* Larven, kommen statt *N*-Acyl-glutaminen überwiegend *N*-Acyl-glutamate vor.^[67] Im Gegensatz zu den *Spodoptera* Larven findet man bei *Manduca sexta* Larven weder Volicitin (**19**) noch ein analoges *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamat.

Von den 16 untersuchten Spezies ließen sich in acht *N*-Acyl-aminosäurekonjugate nachweisen, was ihre weite Verbreitung bei Insekten widerspiegelt (Tabelle 1). Daneben gibt es aber auch viele Insekten, in deren Darm solche Konjugate nicht auftreten. Interessanterweise waren fast alle untersuchten Raupenarten, bei denen Konjugate im Regurgitat nachweisbar waren, Generalisten, d. h. Larven, die keine spezifische Futterpflanze benötigen. Dagegen fand ich in keinem Spezialisten - wie z. B. *Pieris brassicae* - *N*-Acyl-aminosäuren. Möglicherweise könnten *N*-Acyl-

aminosäurekonjugate für die Fähigkeit von Generalisten verantwortlich sein, sich von vielen verschiedenen Futterpflanzen ernähren zu können (siehe 3.1.10.5).

Bei der Untersuchung eines Schweinedarmes und von menschlichen Speichelproben konnten keine *N*-Acyl-aminosäurekonjugate nachgewiesen werden. Dies scheint ein Indiz zu sein, dass solche Verbindungen für Insekten, nicht aber für Säugetiere wichtig sind.

Tabelle 1: Übersicht über das Vorkommen von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten im Regurgitat (Vorderdarminhalt) von Arthropoden (+: Konjugate, -: keine Konjugate)

Spezies	AcylGln	AcylGlu	OHAcylGln	Fraßverhalten
<i>Spodoptera littoralis</i>	+	-	+	Generalist
<i>Spodoptera exigua</i>	+	-	+	Generalist
<i>Spodoptora frugiperda</i>	+	-	+	Generalist
<i>Heliothis virescens</i>	+	-	+	Generalist
<i>Mamestra brassicae</i>	+	-	+	Generalist
<i>Agrotis segetum</i>	+	-	+	Generalist
<i>Manduca sexta</i>	+	++	-	Generalist
<i>Pieris brassicae</i>	-	-	-	Spezialist
<i>Pieris napae</i>	-	-	-	Spezialist
<i>Pieris rapae</i>	-	-	-	Spezialist
<i>Caligo memnon</i>	-	-	-	Spezialist
<i>Antherea pernyi</i>	-	-	-	Spezialist
<i>Plutella xylostella</i>	-	+	-	Spezialist
<i>Schistocerca gregaria</i>	-	-	-	
<i>Acheta domestica</i>	-	-	-	
<i>Gryllus bimaculatus</i>	-	+	-	

3.1.3 Abhängigkeit der Zusammensetzung des *N*-Acyl-glutaminkonjugatspektrums von der Nahrung

Bei der Analyse der Zusammensetzung der *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat verschiedener Raupen fallen große Unterschiede auf.^[66] Eine starke Variabilität bei den *N*-Acyl-glutaminkonjugaten beobachtet man aber auch beim Fraß der gleichen Raupenart an unterschiedlichen Futterpflanzen bzw. bei der Ernährung mit unterschiedlichen Diäten. Die Fettsäurezusammensetzung des Futters ist eine Ursache für das Vorkommen unterschiedlicher Konjugate im Regurgitat. Bereits Tumlinson *et al.* zeigten, dass die Fettsäure-Komponente des Volicitins direkt aus der Nahrung stammt, indem sie Raupen an ¹³C-markierten Pflanzen fressen ließen.^[65] Um den Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die Bildung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten zu zeigen, wurde *S. exigua* Larven Agar, der mit einer Fettsäure, z. B. Stearinsäure, dotiert war, angeboten. Nach Fraß dieser Kunstnahrung wurde den Raupen Regurgitat abgenommen und per LC-MS analysiert. Die Konjugate mit der Fettsäure aus der Nahrung dominierten in den HPL-Chromatogrammen. Außerdem wurden beim Vergleich von Regurgitat von *S. exigua* Raupen, denen zwei unterschiedliche Diäten angeboten wurden, starke Unterschiede gefunden. Nach Fraß einer auf Bohnenmehl basierenden Diät dominierten im Regurgitat Volicitin (**19**) und *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**). Dagegen beobachtet man nach Verfütterung einer Diät aus Weizenkeimen im Regurgitat hauptsächlich Glutaminkonjugate der Linolsäure (**3**) *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**20**) und *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**) (siehe Abbildung 12).

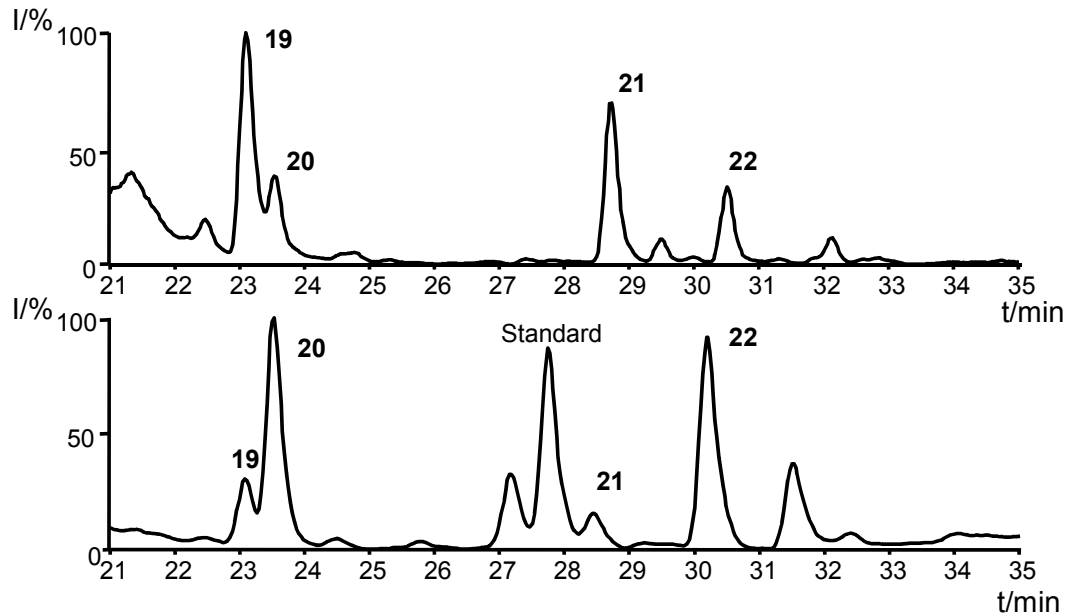


Abbildung 12: Variabilität der *N*-Acyl-glutamine im Regurgitat von *S. exigua* Larven in Abhängigkeit vom Futter. **A** Bohnendiät und **B** Weizenkeimdiät^f

Demnach werden Fettsäuren aus der Nahrung unspezifisch in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot zu *N*-Acyl-glutaminkonjugaten umgesetzt. Interessanterweise wurden Konjugate mit anderen Aminosäuren als L-Glutamin (**24**) nicht nachgewiesen. Die Konjugatbildung scheint daher für viele Lepidopterenlarven bei der Nahrungsaufnahme von Bedeutung zu sein. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass *N*-Acyl-L-glutamine den Raupen wohl nicht als Signalmoleküle mit Hormoncharakter dienen, sondern wahrscheinlich andere Funktionen, z. B. als Emulgatoren^[72] der Nahrung haben (siehe 3.1.10).

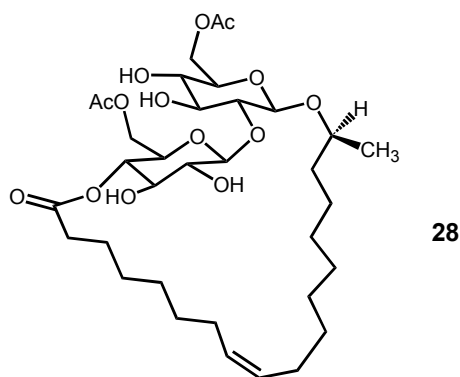
^f HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

3.1.4 N-(17-Hydroxy-acyl)-L-glutamin-konjugate

Volicitin allerdings weist eine bei langkettigen Fettsäureverbindungen äußerst selten zu findende ω -1 Hydroxylierung auf, die diesem Molekül im Gegensatz zu einfachen N-Acyl-L-glutaminen besondere Eigenschaften verleihen könnte.

3.1.4.1 Hydroxylierung von Fettsäuren

Neben Volicitin (**19**)^[61] findet man im Regurgitat von *Spodoptera* Larven auch N-(17-Hydroxylinoleoyl)-L-glutamin (**20**).^[65] Aufgrund von LC-MS Analysen des Regurgitates von Lepidopteren gibt es darüber hinaus Hinweise auf das Vorhandensein eines Hydroxy-oleoyl-L-glutaminkonjugates. Bisher sind, abgesehen von Insektenregurgitat, in keinem anderen Organismus ω -1 hydroxylierte Linolen- bzw. Linolsäurederivate nachgewiesen worden. Die engen Verwandten 17-Hydroxyölsäure und 17-Hydroxystearinsäure sind als Komponenten von Sophoroselipiden schon länger bekannt; z. B. Verbindung **28**, die von der Hefe *Torulopsis bombicola*^[73, 74] produziert wird (siehe Schema 5).



Schema 5: Ein Sophoroselipid (**28**) von 17-Hydroxyölsäure aus *Torulopsis bombicola*^[73, 74]

Ansonsten kennt man ω -1 neben ω -2 und ω -3 Hydroxylierung von Fettsäuren durch den Mikroorganismus *Bacillus megaterium*.^[75] Häufig wird Hydroxylierung durch Cytochrom P450 abhängige Enzyme erreicht.^[76] Bei *B. megaterium* gelang es, den Mechanismus der ω -1 Hydroxylierung durch Röntgenstrukturanalyse des Enzyms P450 BM-3 im Detail zu untersuchen.^[77] Die Fähigkeit von *B. megaterium*, in Position ω -1 eines Aliphaten eine Hydroxylgruppe einzuführen, fand in der organischen Synthese zur stereoselektiven Hydroxylierung von *n*-Alkanen Anwendung.^[78] Für den verwandten *Bacillus pumilus* wurde von Lanser *et al.* gezeigt, dass er langkettige Fettsäuren wie Ölsäure zu einem Gemisch aus ω -1, ω -2 und ω -3 Hydroxyfettsäuren

umsetzen kann.^[79] ω -1 Hydroxylierungen von Fettsäuren sind auch durch P450 Enzyme aus Lebermikrosomen^[80] bekannt. Durch ortsgerichtete Mutagenese ist es möglich, P450 Enzyme zu konstruieren, die Fettsäuren an anderer Position hydroxylieren.^[81] Neben Cytochrom P450 abhängigen Enzymen wurden allerdings auch Cytochrom P450 unabhängige Lipoxygenasen als hydroxylierende Enzyme charakterisiert.^[82, 83]

3.1.4.2 Stereochemie von Volicitin

Zur Untersuchung des Mechanismus der ω -1 Hydroxylierung von Volicitin (**19**) bzw. seiner biologischen Wirkung als Elicitor^[61] ist die Kenntnis der Stereochemie seiner Hydroxygruppe in Position 17 des Linolenylrestes wichtig.

Bei der Strukturaufklärung des Volicitins [*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin] (**19**) blieb die Stereochemie der 17-Hydroxygruppe offen.^[61] Dagegen konnten Alborn *et al.* bereits zeigen, dass der Glutaminrest von natürlichem Volicitin (**19**) L-konfiguriert ist und nur dieses Isomer biologische Aktivität besitzt.^[61] Durch die Entwicklung einer stereoselektiven Synthese durch Pohnert *et al.* waren (17*S*)- und (17*R*)-Volicitin [(**17S**)-**19**, (**17R**)-**19**] als Referenzverbindungen verfügbar.^[84]

Trotzdem erwies sich die Bestimmung der absoluten Stereochemie der 17-Hydroxygruppe als schwierig: Mit vertretbarem Aufwand können nur geringe Mengen an natürlichem Volicitin (**19**) gewonnen werden (ca. 10 μ g). Außerdem neigt die allylische 17-Hydroxygruppe in Gegenwart von Basen und Säuren, die bei vielen Derivatisierungsmethoden notwendig sind, zur Eliminierung. Daher entstehen z. B. Mosherester^[85] des *N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamins (**19**) bzw. des 17-Hydroxylinolensäuremethylesters (**29**) nur in sehr schlechten Ausbeuten. Außerdem wurde mit dem Mosherester des 17-Hydroxylinolensäuremethylesters (**29**), dem Fettsäurerest von Volicitin (**19**), keine Trennung per Gaschromatographie erreicht.

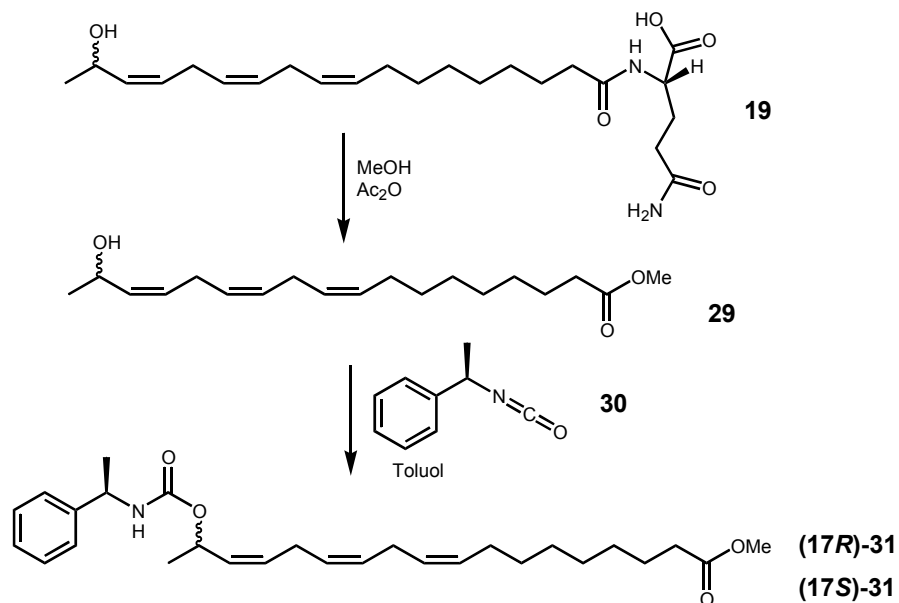
In der Arbeitsgruppe Meinwald wurde ein neues chirales Derivatisierungsreagenz (Chloromethoxydiphenylsilan) entwickelt, das ohne Base- oder Säurezusatz mit Hydroxygruppen reagiert.^[86] Mit synthetischem Volicitin (**19**), das Dr. Georg Pohnert zur Verfügung stellte, konnte diese Gruppe zeigen, dass sich so die Volicitinisomeren im NMR unterscheiden lassen. Diese Variante der Bestimmung der Stereochemie wäre höchst aufwendig gewesen, da man sehr viel Regurgitat hätte

sammeln müssen. Versuche, die beiden Isomeren ohne vorhergehende Derivatisierung an chiralen GC- oder LC-Säulen zu trennen, waren nicht erfolgreich. Daher wurde auf eine bereits 1971 von Hamberg *et al.* eingeführte Methode zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von ω -1-Hydroxystearinsäure zurückgegriffen, bei der nach Derivatisierung mit (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) zum (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-stearinsäuremethylester die resultierenden Diastereomeren mittels Gaschromatographie auftrennbar sind.^[87, 88]

Basierend auf dieser Methode wurde Volicitin (**19**) durch Methanolyse^[89] zum 17-Hydroxylinolensäuremethylester (**29**) gespalten, mit Pt/C hydriert und anschließend mit (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) umgesetzt. Die resultierenden Diastereomeren wurden an einer unpolaren Alltech EC5 GC-Kapillarsäule basisliniengetrennt.

Bei der katalytischen Hydrierung des 17-Hydroxylinolensäuremethylesters (**29**) zum 17-Hydroxystearinsäuremethylester beobachtete man als unerwünschte Nebenreaktion den Verlust der 17-Hydroxygruppe unter Bildung von Stearinsäure.

Aus diesem Grund versuchte ich, den Hydrierungsschritt einzusparen und den 17-Hydroxylinolensäuremethylester (**29**) direkt mit (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) umzusetzen. Da die Reaktion unter neutralen Bedingungen abläuft, erhielt man selbst bei der hohen Reaktionstemperatur von 120 °C (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*S*)-**31**, (17*R*)-**31**] (siehe Schema 6).



Schema 6: Abbau und Derivatisierung von Volicitin [*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin] (**19**) zur Bestimmung der Stereochemie der 17-Hydroxygruppe

Die entstandenen Diastereomeren ließen sich ebenfalls basisliniengetrennt an einer Alltech EC5 Säule auftrennen (siehe Abbildung 13).

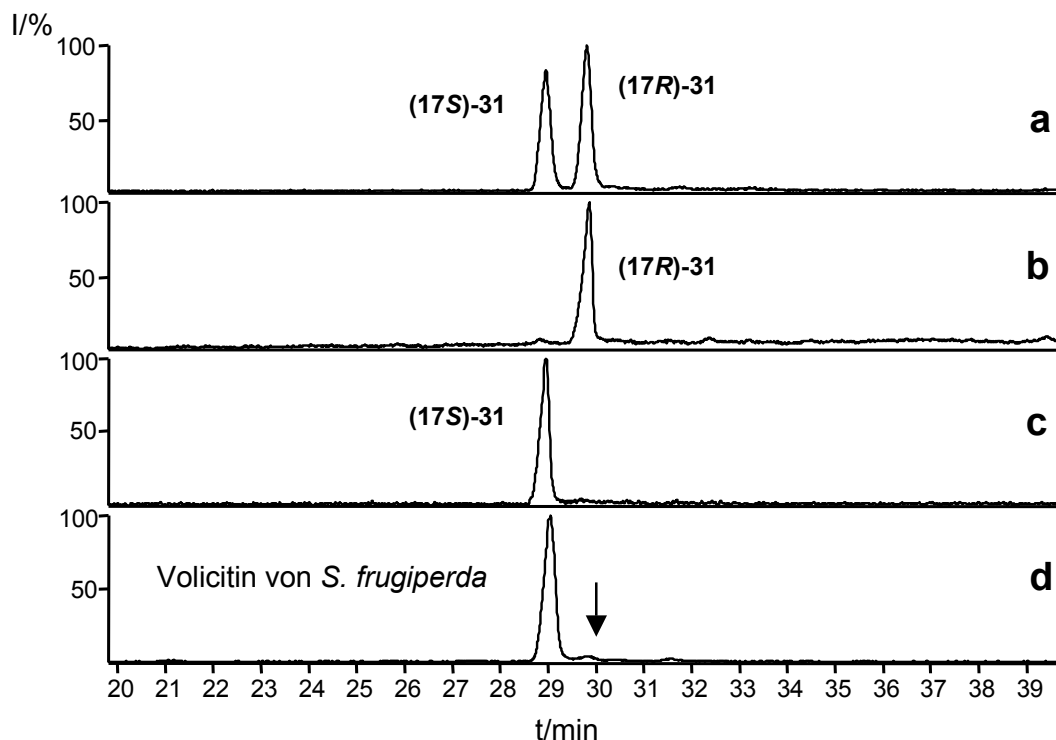


Abbildung 13: Ionenspur $m/z = 290^9$ von **a)** $(17R,1'R)$ -17-(1'-Phenylethylcarbamoxyoxy)-linolensäuremethylester [$(17S)$ -31, $(17R)$ -31], **b)** [$(17R)$ -31], **c)** [$(17S)$ -31], **d)** [$(17S)$ -31] des Volicitins (**19**) von *S. frugiperda* Raupen

Die Verbindungen wurden mit Selected-Ion-Monitoring (SIM) Massenspektrometrie analysiert, so dass die Nachweisgrenze der Derivate im Nanogramm Bereich lag. Mit dieser Methode war es sogar möglich, auf die verlustreiche Isolierung des Volicitins (**19**) aus der biologischen Matrix zu verzichten und mit ca. 50-100 μ l Regurgitat die Stereochemie des Volicitins (**19**) an der Hydroxygruppe in Position 17 zu untersuchen.

Zur Kontrolle der Methode wurden etwa 200 μ l Volicitin (**19**) von *S. littoralis* durch RP18 HPLC-Trennung gereinigt, zum $(1'R)$ -17-(1'-Phenylethylcarbamoxyoxy)-

⁹ Kapillarsäule: Alltech EC5: 15 m x 0,25 mm, 0,25 μ m; Trägergas: Helium, Flussrate: 1 ml/min, Injektortemperatur: 280 °C; Temperaturprogramm: 210 °C (2 min), 1 °C min^{-1} bis 255 °C, dann 10 °C min^{-1} bis 300 °C (5 min).

linolensäuremethylester (**31**) umgesetzt und im Full-Scan Modus per GC-MS analysiert.

Um festzustellen, ob *cis/trans*-Isomere möglicherweise das Isomerenverhältnis verfälschen, wurden die Enantiomerenüberschüsse vor und nach Hydrierung verglichen. Da kein merklicher Unterschied zwischen beiden Proben festgestellt wurde, konnte auf den verlustreichen Hydrierungsschritt (siehe oben) verzichtet werden.

Die Analyse von Volicitin als (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-oxylinolensäuremethylester (**31**) ergab für vier Raupenarten (*S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. virescens*) in allen Fällen S-Konfiguration mit hohem Enantiomerenüberschuss von durchschnittlich 94 % ee (siehe Tabelle 2).^[90]

Tabelle 2: Stereochemie der 17-Hydroxygruppe des Volicitins (**19**) in verschiedenen Raupenarten

Raupenart	Optische Reinheit des (17 <i>S</i>)-17-Hydroxylinolensäuremethylesters [(17 <i>S</i>)- 30] ^h
<i>S. exigua</i>	94 % ee
<i>S. littoralis</i>	94 % ee
<i>S. frugiperda</i>	96 % ee
<i>H. virescens</i>	92 % ee

Dieser Befund spricht dafür, dass die Hydroxylierung in Position 17 in *Spodoptera* Arten und *Heliothis virescens* nach einem identischen enzymatischen Mechanismus erfolgt. Interessanterweise beobachtet man bei Volicitin (**19**) mit S-Konfiguration die gleiche Stereochemie wie sie Tulloch *et al.* bei der Analyse der 17-Hydroxystearinsäure des Sophoroselipids (**28**) von *Torulopsis bombycola* feststellte.^[91]

^hbestimmt als (17*S*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyoxy)-linolensäuremethylester [(17*S*)-**31**]

3.1.5 *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin

3.1.5.1 Strukturaufklärung von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin

P450 abhängige Enzyme bilden neben ω bzw. ω -1 Hydroxyverbindungen bei Fettsäuren häufig auch Epoxide.^[92, 93] Daher erschien es aussichtsreich, nach Epoxy-linoleoyl-glutaminen (**32**) bzw. deren Hydrolyseprodukten Dihydroxy-linoleoyl-glutaminen (**33**), potentiellen Nebenprodukten der Volicitinsynthese, im Regurgitat von Raupen zu suchen. Dazu wurden Regurgitatproben von *Spodoptera* Larven mittels RP18 LC-MS mit Ionenspursuche nach den $[M+H]^+$ -Ionen $m/z = 423$ für ein Epoxy-linoleoyl-glutamin (**32**) und $m/z = 441$ für Dihydroxy-linoleoyl-glutamin (**33**) gescreent. Die Peaks von zwei Verbindungen im mittelpolaren Bereich des HPL-Chromatogramms bei 21.1 min und 24.7 min erregten Aufmerksamkeit, da ihre APCI-Massenspektren auf Glutaminkonjugate von Epoxyoctadecadiensäure bzw. Dihydroxyoctadecadiensäure schließen ließen.

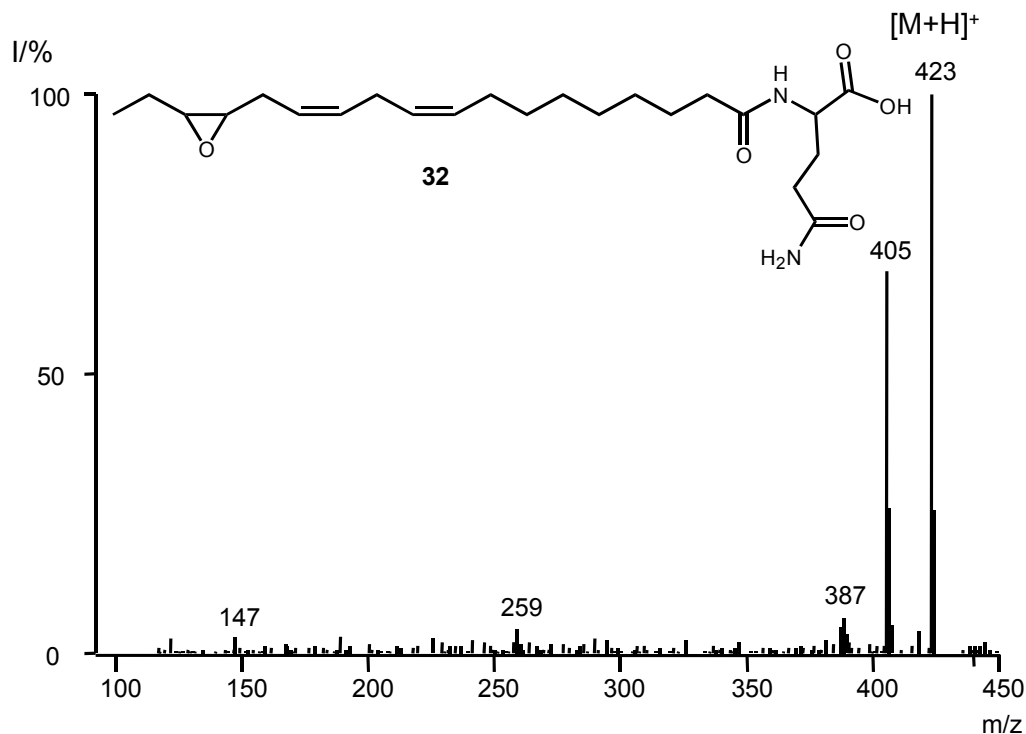


Abbildung 14: APCI Massenspektrum des *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamins (**32**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Für das *N*-(Epoxy-octadecadienoyl)-glutamin (**32**) erhält man ein APCI-Massenspektrum mit einem $[M+H]^+$ Ion bei $m/z = 423$. Das $[M+H]^+$ -Ion erfährt Eliminierung von Wasser zum Ion $m/z = 405$. Außerdem gibt es ein wenig intensives Ion, das den Acylrest durch einen Peak bei $m/z = 259$ anzeigt. Dazu wird das für Glutaminkonjugate typische Ion bei $m/z = 147$ gefunden.

Das APCI-Massenspektrum des bei 21.1 min eluierenden *N*-(Dihydroxy-octadecadienoyl)-glutamins (**33**) zeigt ein intensives $[M+H]^+$ -Ion bei $m/z = 441$. Eliminierung von Wasser liefert ein Ion bei $m/z = 423$. Erneuter Verlust von Wasser führt zum Ion $m/z = 405$. Auch das für den Glutaminrest von Fettsäureglutamin-konjugaten charakteristische Ion bei $m/z = 147$ ist erkennbar.

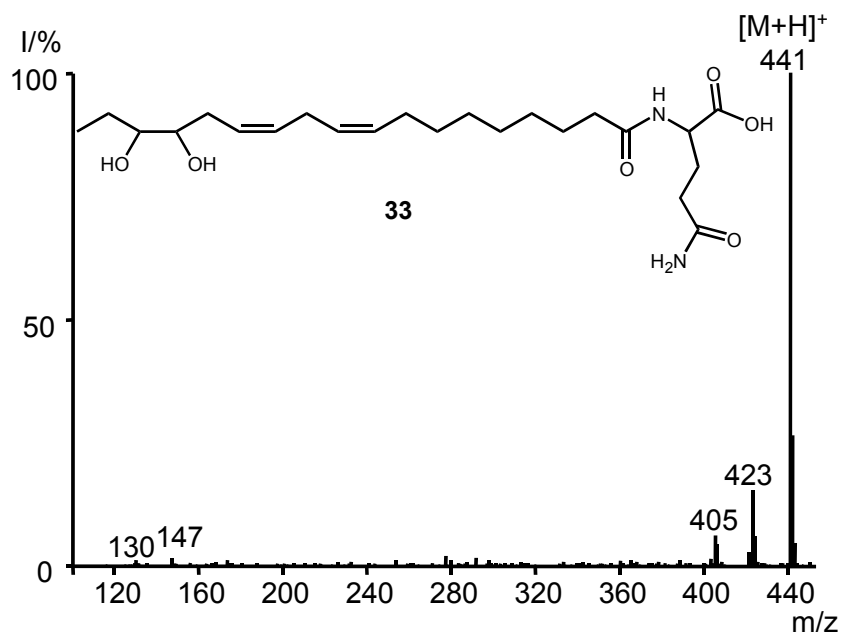


Abbildung 15: APCI-Massenspektrum des *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamins (**33**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Um die Position der Hydroxygruppen festlegen zu können, wurde das *N*-(Dihydroxy-octadecadienoyl)-glutamin (**33**) mittels HPLC gereinigt und mit $Ac_2O/MeOH$ methanolysiert.^[89] Dann wurden die freien Hydroxygruppen mit MSTFA trimethylsilyliert und die erhaltenen Verbindungen per GC-EI-MS analysiert. Das EI-Massenspektrum des so erhaltenen Bis-trimethylsilyloxy-octadecadiensäuremethylesters (**34**) zeichnet sich durch charakteristische Fragmente aus, die durch Spaltung der zu den Trimethylsilyloxygruppen benachbarten C-C-Bindungen gebildet

werden (siehe Abbildung 16). Dadurch lässt sich die Position der Hydroxygruppen zweifelsfrei bestimmen.

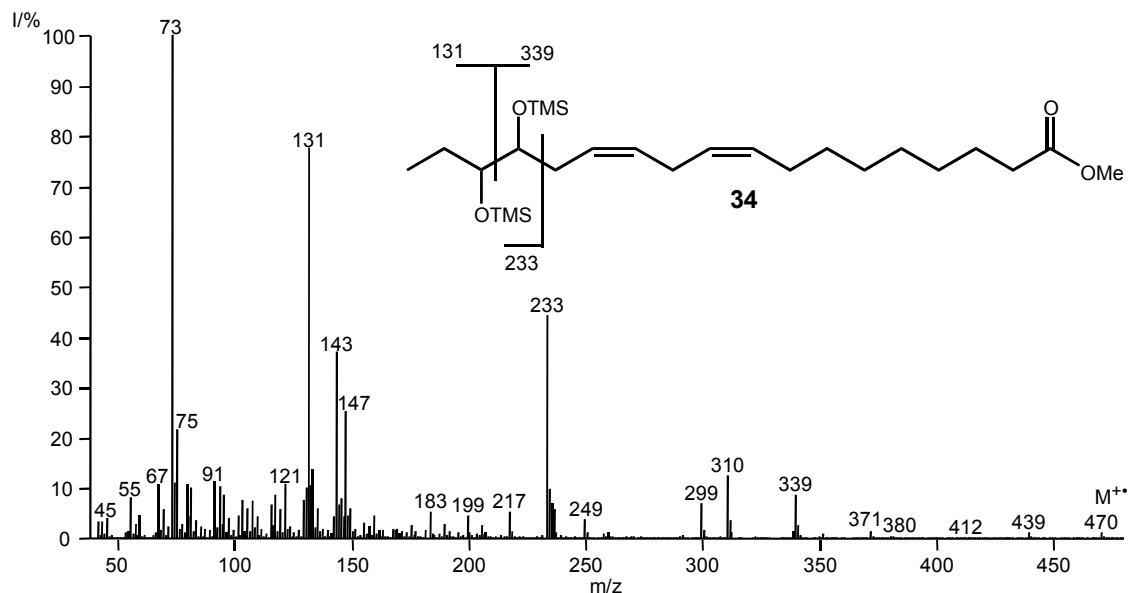
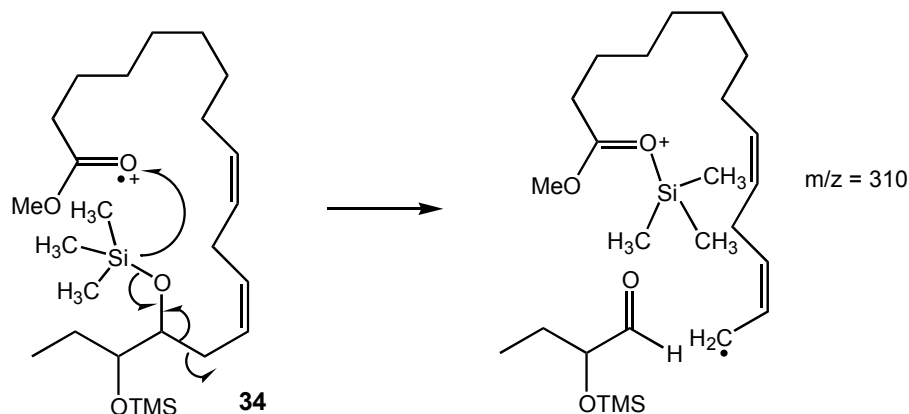


Abbildung 16: EI-Massenspektrum des 15,16-Bis-trimethylsilyloxy-linolsäure-methylesters (34)

Das Massenspektrum zeigt wegen der großen Neigung zur Bruchstückbildung nur ein wenig intensives Molekülion bei $m/z = 470$. Durch Verlust eines Fragmentes mit 31 amu (OMe) wird das Ion $m/z = 439$ gebildet. Abspaltung von TMSOH aus dem Molekülion führt zu einem Ion bei $m/z = 380$. Der Basispeak bei $m/z = 73$ ist für trimethylsilylierte Verbindungen charakteristisch. Das Ion $m/z = 147$ $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{O}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$ deutet in diesem Fall auf das Vorhandensein von zwei Trimethylsilylgruppen im Molekül hin.^[94, 95] Die ursprünglichen Hydroxygruppen befinden sich in Position 15 und 16, denn im Massenspektrum der trimethylsilylierten Verbindung beobachtet man ein intensives Fragment bei $m/z = 131$. Es entspricht einem Trimethylsilyloxypropylrest. Verbleibt die Ladung im Fettsäureteil des Moleküls, so erhält man das komplementäre Ion bei $m/z = 339$. Aus diesem Spaltstück kann nochmals ein Trimethylsilanolmolekül eliminiert werden, wodurch ein Ion bei $m/z = 249$ gebildet wird. Außerdem beobachtet man mit dem Ion $m/z = 233$ ein Bis-trimethylsilyloxy-butyl-Bruchstück. Auch aus diesem Ion ist der Verlust von Trimethylsilanol unter Bildung eines Ions $m/z = 143$ möglich. Das Ion der Masse $m/z = 310$ resultiert aus dem Transfer der Trimethylsilylgruppe in Position 15 zur Carbomethoxygruppe und dem Verlust von Trimethylsilyloxybutanal in Analogie zur

massenspektrometrischen Fragmentierung anderer trimethylsilylierter Hydroxyfett-säuremethylester (siehe Schema 7).^[96]



Schema 7: Bildung des Ions $m/z = 310$ aus 15,16-Bis-trimethylsilyloxy-linolsäure-methylester (**34**) durch Transfer der Trimethylsilylgruppe zur Carbomethoxygruppe

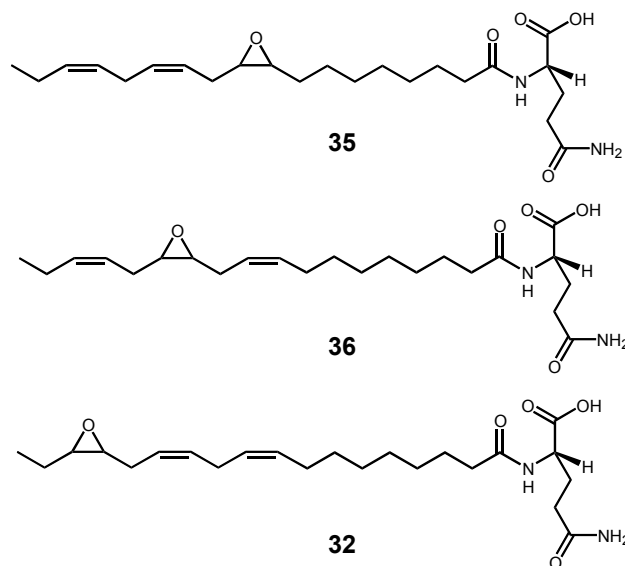
Diese strukturspezifischen Fragmentierungsreaktionen beweisen, dass es sich zweifelsfrei um einen 15,16-Bis-trimethylsilyloxy-linolsäure-methylester (**34**) handelt. Aufgrund ihrer Massenspektren erscheinen die Strukturen eines *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamins (**33**) bzw. eines *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamins (**32**) für die beiden aus Regurgitat von *Spodoptera* Larven isolierten Verbindungen wahrscheinlich.ⁱ Genau diese Verbindungen erwartet man als Nebenprodukte, wenn ein P450 abhängiges Enzym *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**22**) oder Linolensäure (**3**) in Position 17 hydroxyliert.

ⁱ Die Stereochemie der Epoxygruppe von **32** bzw. der beiden Hydroxygruppen von **33** wurde wegen mangelnder Probenmenge nicht bestimmt.

3.1.5.2 Synthese von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin

Die als *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) postulierten Verbindungen treten nur in geringen Mengen¹ im Regurgitat von Lepidopteren auf. Zur Bestätigung der aus ihren Massenspektren abgeleiteten Strukturen und um Material für Bioassays zur Verfügung zu haben, wurden *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**33**) synthetisiert.

Einfache Epoxidierung von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) mit *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) führt zu einem Gemisch aller regioisomeren Monoepoxyoctadecadiensäuren (siehe Schema 8). Die Verbindungen lassen sich durch RP18-HPLC in zwei Peaks auftrennen. Das zum Naturstoff identische, vermutliche *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) eluiert fast basisliniengetrennt vor den beiden weiteren Regioisomeren 9,10-(Epoxy-octadeca-12,15-dienoyl)-L-glutamin (**35**) und *N*-(12,13-Epoxy-octadeca-9,15-dienoyl)-L-glutamin (**36**) Konjugaten, die nicht getrennt werden (Schema 8 und Abbildung 17). Durch Abtrennung des *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamins (**32**) wäre eine Klärung der Position der Epoxygruppe möglich gewesen.



Schema 8: Strukturformeln von *N*-(9,10-Epoxy-12,15-octadecadienoyl)-L-glutamin (**35**), *N*-(12,13-Epoxy-9,15-octadecadienoyl)-L-glutamin (**36**) und *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**)

Noch besser erschien es, *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) durch regio-selektive Epoxidierung von Linolensäure (**3**) darzustellen. Ein Verfahren von Kato *et al.* nutzt die Tenseideigenschaften von ungesättigten Fettsäuren zur regioselektiven Epoxidierung terminaler Doppelbindungen aus.^[97] Dabei werden durch Wahl eines geeigneten Lösungsmittelsystems inverse Micellen gebildet, so dass das Epoxidierungsreagenz in erster Linie nur die terminale Doppelbindung angreift.

Nach einer von Corey *et al.* beschriebenen Methode wird die terminale Doppelbindung ungesättigter Fettsäuren durch intramolekulare Epoxidierung mit ungesättigten Peroxyfettsäuren erreicht.^[98] So wurde aus Peroxyarachidonsäure durch intramolekularen Angriff der Peroxysäuregruppierung auf die terminale Doppelbindung 14,15-Epoxy-5,8,11-eicosatriensäure in nahezu quantitativer Ausbeute und hoher Regioselektivität erhalten. Deshalb wurde diese Methode zur selektiven Epoxidierung von Linolensäure (**3**) gewählt.

Entscheidend für die Regioselektivität der Reaktion ist die Zugänglichkeit der Doppelbindung durch die Peroxysäure. Da der Abstand der Peroxysäuregruppe in peroxidierter Linolensäure (**37**) sehr ähnlich zu Peroxyarachidonsäure ist, sollte sich die Reaktion auch zur regioselektiven Synthese von 15,16-Epoxylinolsäure (**38**) einsetzen lassen. In der Originalvorschrift wird die durch 1,1'-Carbonyldiimidazol aktivierte Arachidonsäure in Gegenwart von Lithiumimidazolid als Katalysator mit wasserfreiem Wasserstoffperoxid zur Peroxyfettsäure umgesetzt. Da wasserfreies Wasserstoffperoxid nicht mehr kommerziell erhältlich und außerdem explosiv ist, wurde für den Epoxidierungsversuch als Ersatz das Harnstoffaddukt von Wasserstoffperoxid eingesetzt.^[99]

Nach 1-wöchiger Reaktionszeit bei 0 °C waren etwa 60 % der Peroxylinolensäure (**37**) zum Epoxid umgesetzt worden. Unter den verwendeten Bedingungen wurde bei der Reaktion 75 % der erwünschten 15,16-Epoxylinolsäure (**38**) neben 25 % 9,10-Epoxy-12,15-octadecadiensäure (**39**) und 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure (**40**) erhalten (siehe Schema 9).^k

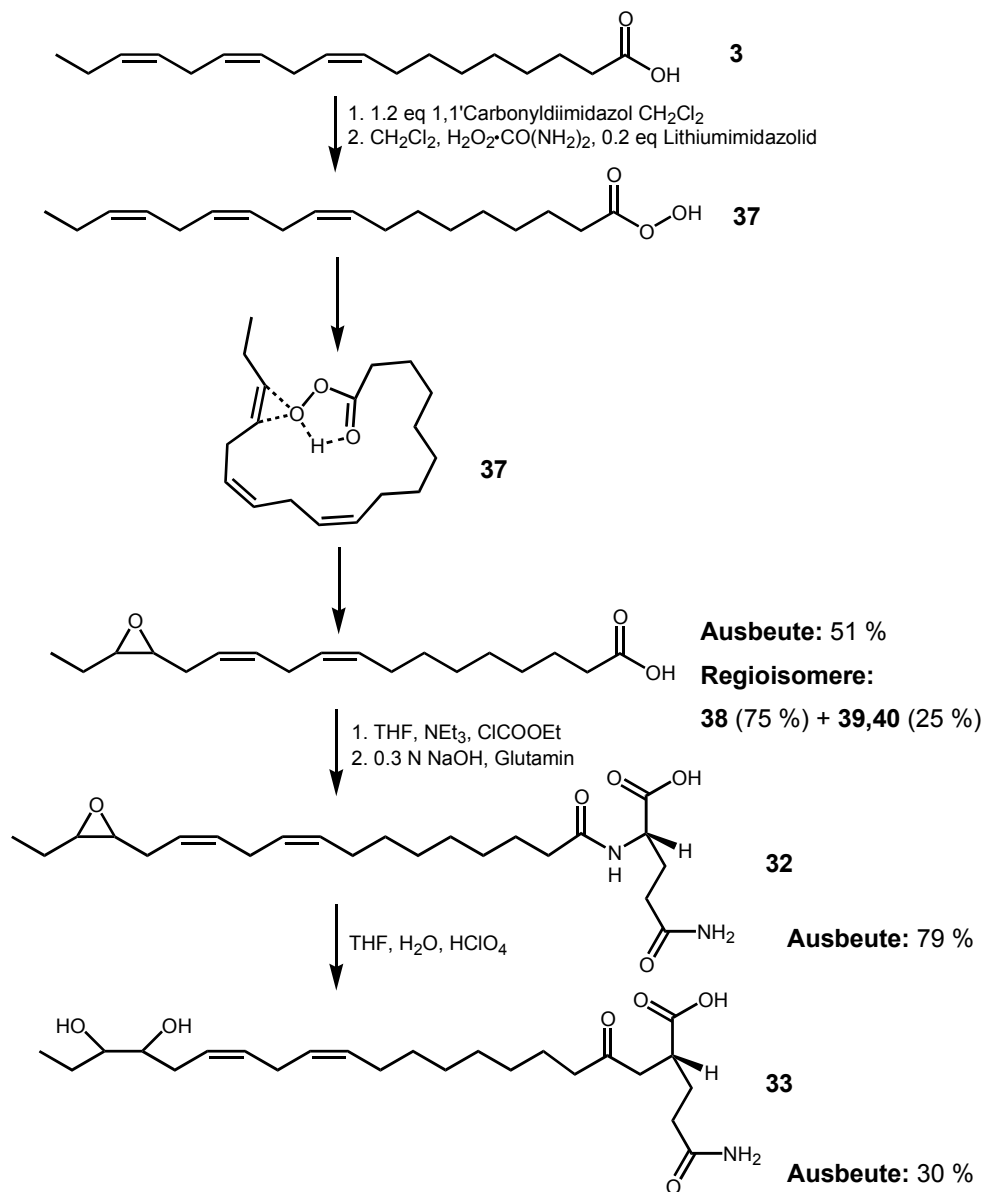
Nach Umsatz der 15,16-Epoxylinolsäure (**38**) zum *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) mit Hilfe der gemischten Anhydridmethode^[100] konnten die

^j *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) ca. 3 % und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) ca. 5 % der Peakfläche des Volicitinpeaks

^k Verhältnis der Regioisomeren bestimmt durch Peakflächenvergleich der HPLC-Peaks.

unerwünschten Regioisomere (**35**) und (**36**) durch präparative RP-18 HPLC abgetrennt werden.

N-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**33**) wurde durch Öffnung des *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamins (**32**) mit wässriger verdünnter Perchlorsäure^[101] erhalten (siehe Schema 9).



Schema 9: Synthese von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**33**)

Die Retentionszeiten des synthetischen *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamins (**32**) und des *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamins (**33**) erwiesen sich mit den Naturstoffen aus Regurgitat von *S. exigua* Larven identisch (siehe Abbildung 17).

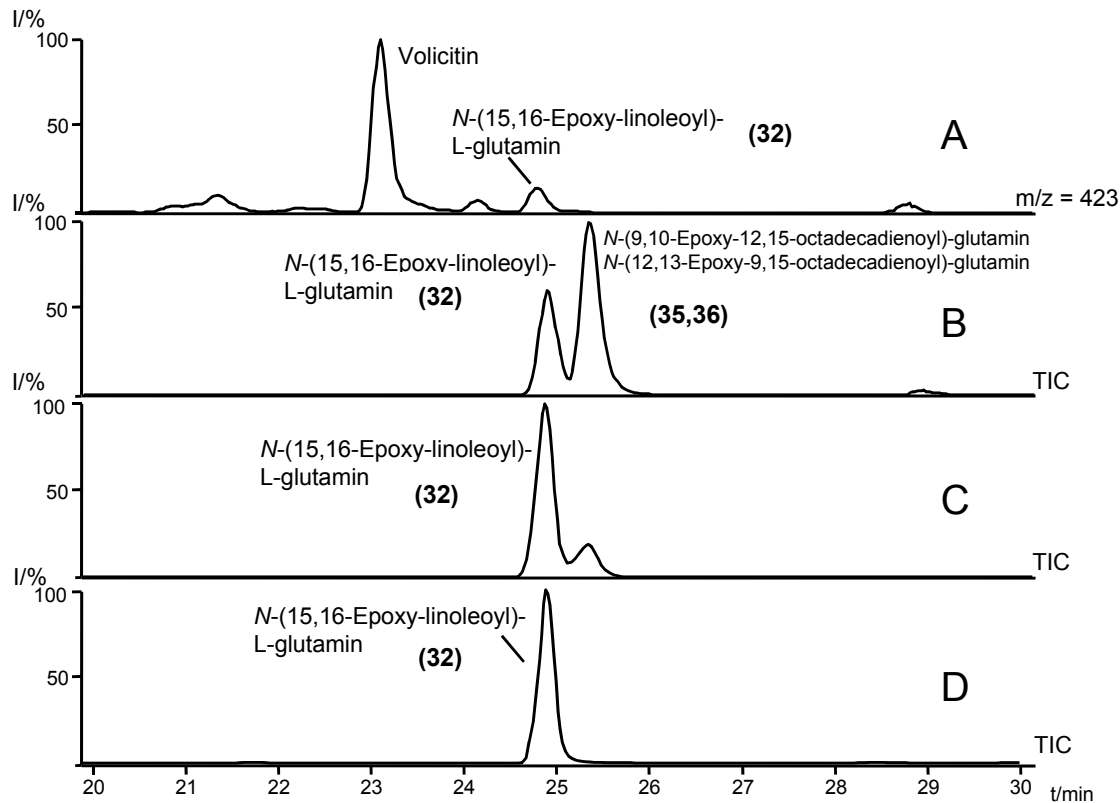
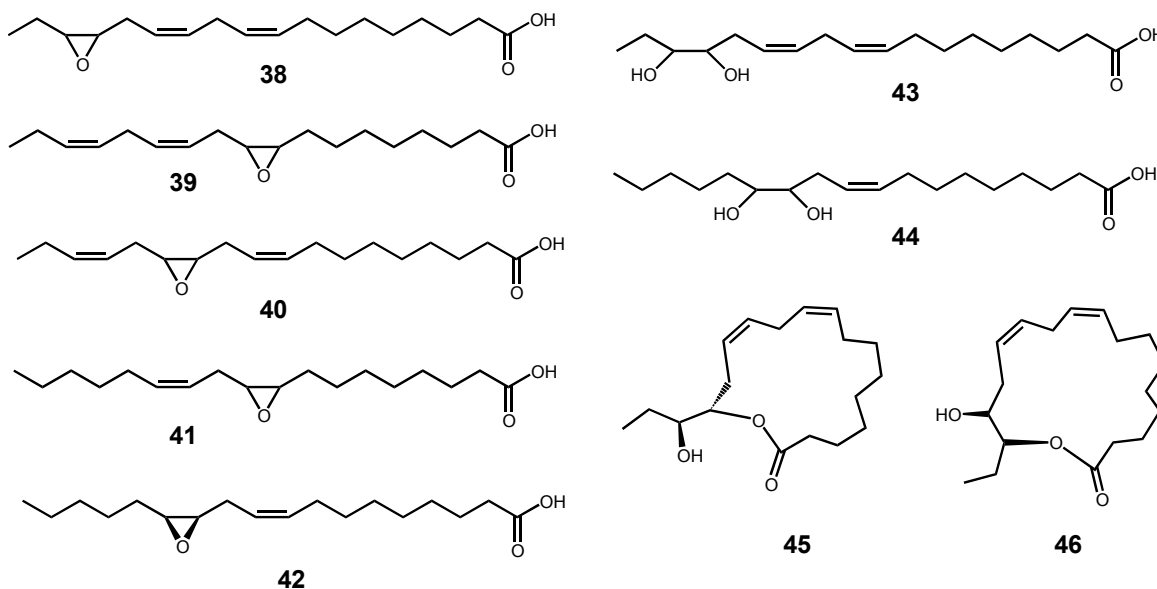


Abbildung 17: HPLC-MS-Chromatogramme¹ von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) aus Regurgitat von *S. exigua* Larven (**A**); synthetische Referenzverbindungen nach Epoxidierung mit MCPBA (**B**); intramolekulare regio-selektive Epoxidierung mit Peroxylinolensäure (**37**) (**C**); *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) nach Abtrennung der Isomeren (**D**)

¹ HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

3.1.5.3 Eigenschaften von Epoxy- bzw. Dihydroxyfettsäuren

Verwandt mit dem aus Regurgitat isolierten *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und dem *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) sind 12,13-Epoxyölsäure (**42**) (Vernolsäure)^[102], 15,16-Dihydroxylinolsäure (**43**) und die Lactone der 15,16-Dihydroxylinolsäure, wie Aplyolide D (**45**) bzw. Aplyolide B (**46**)^[103] (siehe Schema 10).



Schema 10: Epoxy-, Dihydroxyfettsäuren und entsprechende Lactone in der Natur

Epoxide sind für die meisten Organismen toxisch. Ihre hohe Reaktivität gegenüber Nucleophilen, beispielsweise von Proteinen führt zur raschen Umsetzung.^[104, 105] Um sich vor solchen schädlichen Reaktionen zu schützen, dient im biologischen Geschehen oft Glutathion als Abfangreagenz für reaktive Epoxide.^[106] Andererseits werden z. B. bestimmte Leukotriene erst durch Konjugation mit Glutathion zu physiologisch wirksamen Verbindungen umgesetzt. Ein Beispiel dafür ist die „slow reacting substance“ (Leukotrien C), die bei Asthma eine wichtige Rolle spielt.^[107, 108] Epoxyfettsäuren, wie Vernolsäure (**42**), zeigen bakterizide und fungizide Wirkung.^[109] Epoxyfettsäuren sind auch in zelluläre Signalprozesse involviert.^[110] Sie wirken beispielsweise regulierend auf den Hormonhaushalt,^[111] auf G-Proteine^[112] und auch auf Ionenkanäle.^[112-115] Epoxyfettsäuren der Linol- und Linolensäure, unter anderem 15,16-Epoxylinolsäure, werden von Reispflanzen gebildet. Hier dienen die Verbindungen als effektive Abwehr gegen den rice-blast-fungus (*Magnaporthe grisea*) (ED₅₀ 20-30 ppm).^[116] Die beiden Lactone der 15,16-Dihydroxylinolsäure **45** und **46** wurden aus der marinen Schnecke *Aplysia depilans* isoliert. Sie erwiesen

sich in Bioassays mit Moskitofischen (*Gambusia affinis*) in Konzentrationen von 10 ppm als ichthyotoxisch^m.^[103]

Erstaunlicherweise sind Dihydroxyoctadecensäuren wesentlich toxischer als ihre Epoxide.^[117, 118] Sowohl Epoxyoctadecensäure als auch Dihydroxyoctadecensäure wurden beim Menschen in der Lunge bei akuter respiratorischer Insuffizienz nachgewiesen.^[118]

Da alle erwähnten verwandten Dihydroxy- und Epoxyfettsäuren biologische Aktivität haben, ist zu vermuten, dass das aus Regurgitat von Raupen isolierte *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und das *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) ebenfalls physiologisch wirksam sind.

^m toxisch für Fische

3.1.6 *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugate

3.1.6.1 Strukturaufklärung von *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten

Bei der Analyse des Regurgitates von *Spodoptera* Larven mit LC-MS beobachtete ich, dass am Ende des verwendeten HPLC-Programmsⁿ eine Verbindung (**47**) eluiert, deren Massenspektrum auf den ersten Blick mit dem von Volicitin (**19**) identisch erschien (siehe Abbildung 18). Nach Verlängerung des Standardprogramms konnte eine große Gruppe unpolarer Verbindungen mit zu Volicitin (**19**) verwandten APCI-Massenspektren nachgewiesen werden. So zeigt das Massenspektrum von Verbindung **47** die Ionen $m/z = 705$, 683, 405, 259, 147 und 130. Abgesehen von den Ionen $m/z = 705$ und $m/z = 683$ findet man dieselben Ionen wie im APCI-Massenspektrum von Volicitin (**19**), sogar in vergleichbarer Intensität (siehe Abbildung 18).

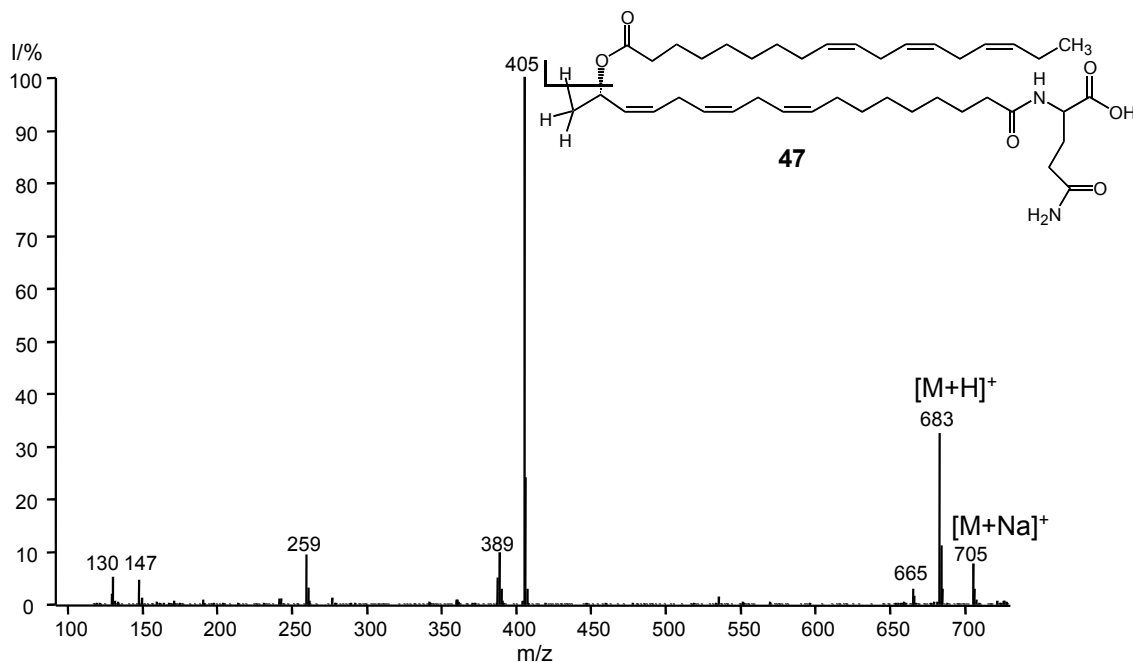


Abbildung 18: APCI-Massenspektrum von *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Wegen der hohen Ähnlichkeit der Massenspektren lag es nahe zu vermuten, dass es sich um mit Volicitin (**19**) verwandte Verbindungen handeln könnte, obwohl sie ein völlig unterschiedliches chromatographisches Verhalten zeigten.

ⁿ RP18 HPLC Säule; 0% B 3 min; 0%-100 % B in 27 min, 100 % B 10 min; Laufmittel A: H₂O 0.5 % AcOH und B: MeCN 0.5 % AcOH)

LC-MS-MS Experimente ergaben, dass $m/z = 405$ ein Tochterion von $m/z = 683$ ist. Eine Massendifferenz von 22 amu findet man bei APCI-Massenspektren, wenn an ein Molekülion ein Natriumkation anstelle eines Protons angelagert wird. Das Ion bei $m/z = 705$ sollte daher das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ der Verbindung **47** sein. Nach Reinigung des unbekanntes Moleküls aus 250 μ l Regurgitat von *S. exigua* Larven konnte durch HR-ESI-MS für das Ion $[M+H]^+ = 683$ die Summenformel $C_{41}H_{67}N_2O_6$ abgeleitet werden. Für das Ion $m/z = 405$ $[M+H-278]^+$ ergibt sich die gleiche molekulare Zusammensetzung wie für den Peak gleicher Masse im Massenspektrum des Volicitins (**19**) $[M+H-H_2O]^+$. Der Verlust eines Neutralteilchens von 278 amu vom Quasimolekularion ($m/z = 683$) entspricht einem Fragment mit der Zusammensetzung $C_{18}H_{30}O_2$. Die Summenformel dieses Fragmentes passt auf die Summenformel einer Octadecatriensäure. Diese Befunde führten zusammen mit der Berücksichtigung der biologischen Herkunft der Verbindung zur Annahme, dass es sich bei dem Molekül **47** um *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin handeln könnte.

Neben dieser Verbindung findet man im Regurgitat auch eine Verbindung, der nach ihrem APCI-Massenspektrum die Struktur eines *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamins (**48**) zukommen könnte. Das Massenspektrum weist ein $[M+H]^+ = 685$ auf. Außerdem beobachtet man ein Fragment bei $m/z = 407$ $[M+H-278]^+$, das aber im Vergleich zum entsprechenden Ion im Spektrum des *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamins (**47**) bei $m/z = 405$ deutlich weniger intensiv ist. Dieser Unterschied im Fragmentierungsmuster lässt sich gut verstehen, da im Falle des *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamins (**47**) durch Verlust des Fettsäurerestes ein konjugiertes Dien-System gebildet wird, wohingegen beim *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**) eine Verbindung mit nicht konjugierter Doppelbindung entsteht.

Im Regurgitat findet man weitere verwandte Verbindungen dieser neuen Naturstoffe, in denen die 17-Acyloxyseitenketten zwischen 1 und 3 Doppelbindungen enthalten (siehe Abbildung 19 und Schema 11).

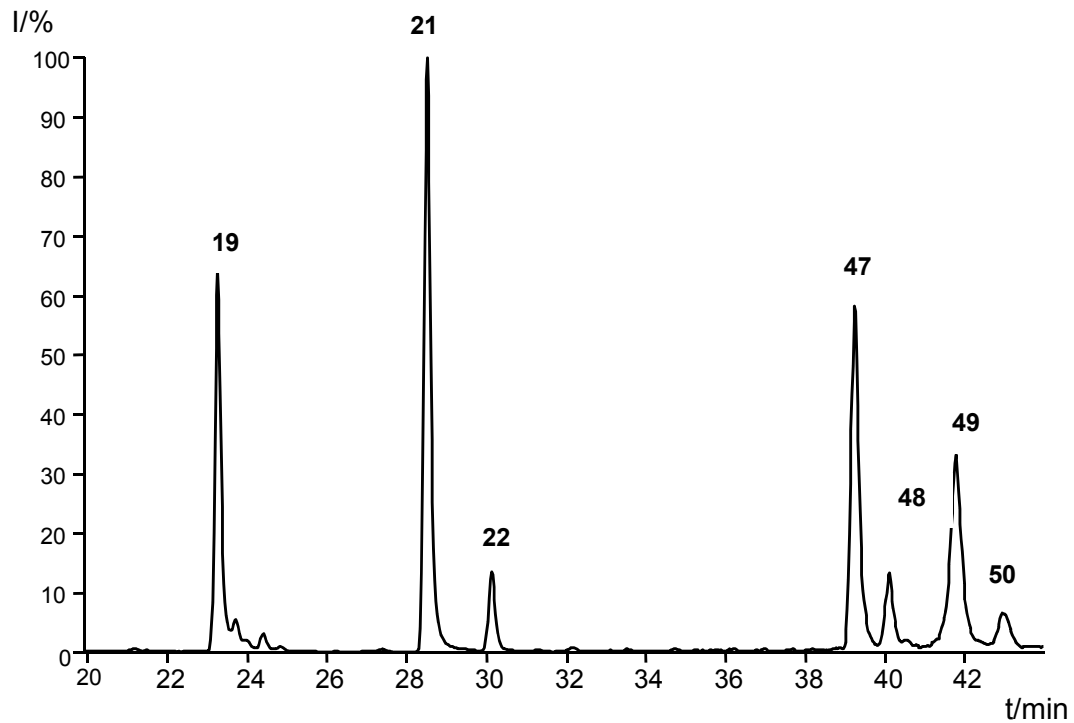
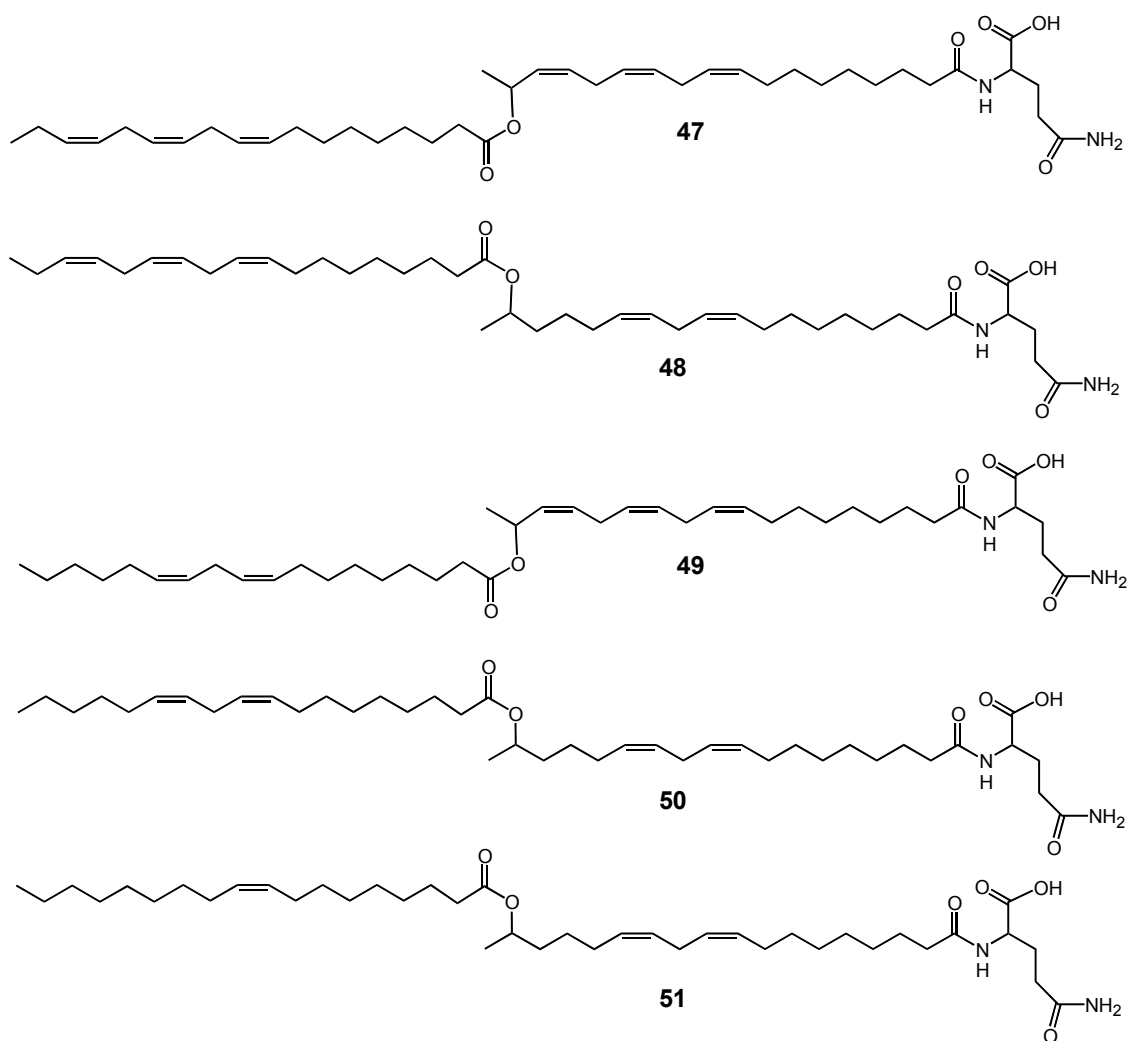


Abbildung 19: RP18 LC-MS Chromatogramm^o von Regurgitat von *S. exigua* Larven: Volicitin (**19**), *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**), *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**), *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**), *N*-(17-Linolenoyloxy--linoleoyl)-glutamin (**48**), *N*-(17-Linoleoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**49**), *N*-(17-Linoleoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**50**)

^o HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.



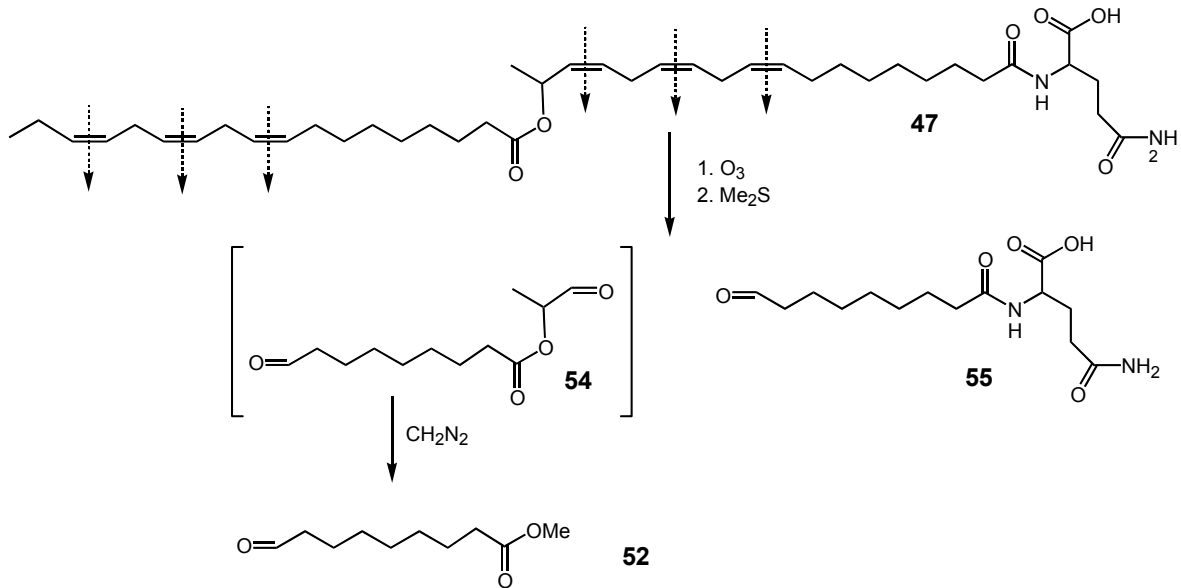
Schema 11: *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamin Konjugate im Regurgitat von *Spodoptera exigua* Larven: *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**), *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**), *N*-(17-Linoleoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**49**), *N*-(17-Linoleoyloxylinoleoyl)-glutamin (**50**), *N*-(17-Oleoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**51**)^p

Um die Lage der Doppelbindungen in Verbindung (**47**) und (**48**) beweisen zu können, wurden diese Verbindungen, die aus 250 μ l Regurgitat von *S. exigua* Larven per HPLC isoliert worden waren, einer Ozonolyse^[119] unterworfen.

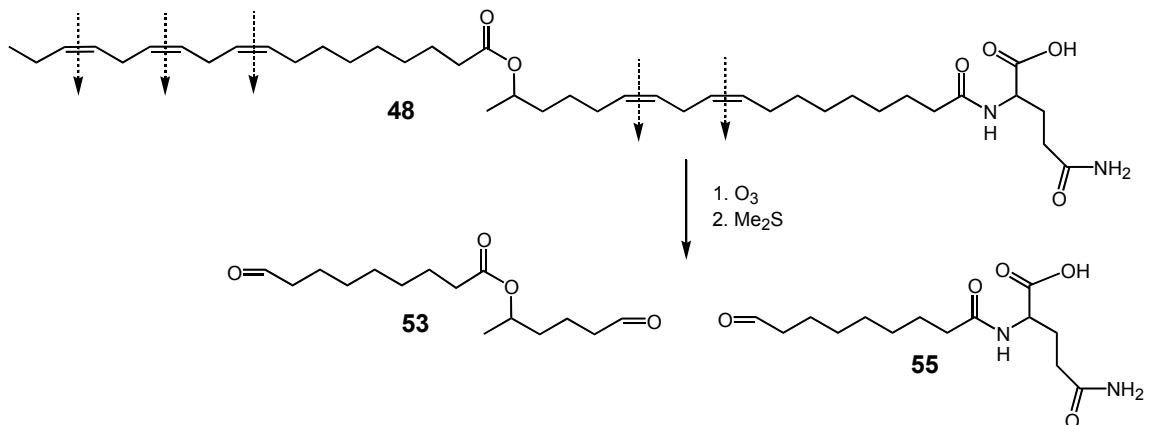
Das Ozonolysat wurde nach Methylierung mit Diazomethan mittels GC-MS untersucht. Man erhielt 9-Oxononansäuremethylester (**52**) bzw. 9-Oxononansäure-1-

^p *N*-(17-Oleoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**51**) eluiert bei 50.6 min und ist daher nicht im abgebildeten Chromatogramm zu sehen.

methyl-5-oxopentylester (**53**) (siehe Schema 12 bzw. Schema 13), so dass die vorgeschlagenen Strukturen für Verbindung (**47**) und (**48**) bestätigt wurden. Als weiteres Ozonolyseprodukt hätte 9-Oxononansäure-1-methyl-2-oxoethylester (**54**) entstehen sollen. Dieser konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da die labilen substituierten α -Hydroxyaldehyde unter Ozonolysebedingungen offenbar nicht stabil sind. *N*-(9-Oxononanoyl)-glutamin (**55**) ließ sich durch LC-MS nachweisen (siehe Schema 12 und Schema 13).



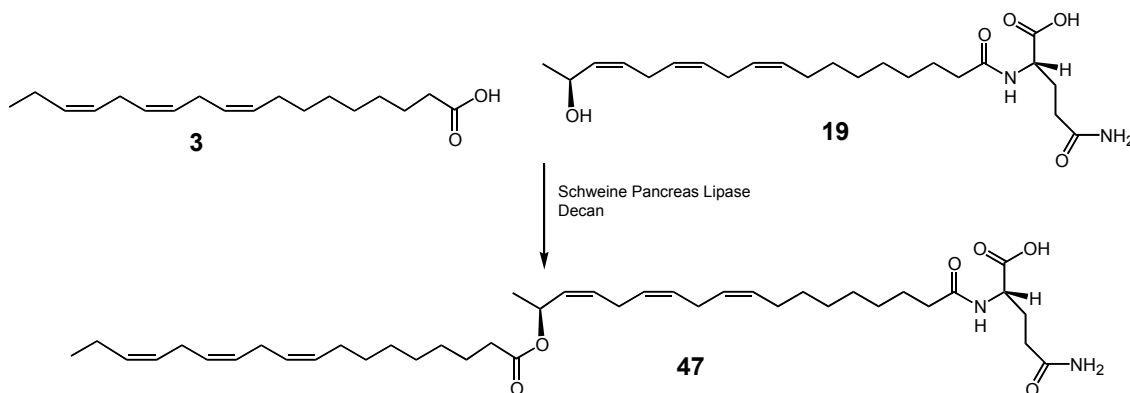
Schema 12: Ozonolyse von *N*-(17-Linolenyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**)



Schema 13: Ozonolyse von *N*-(17-Linolenyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**)

3.1.6.2 Synthese von *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten

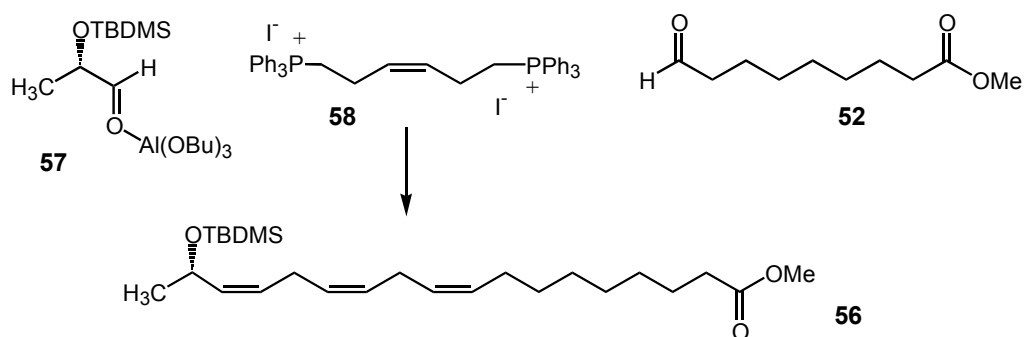
Zur Strukturbestätigung sollten *N*-(17-Acyloxy-linoleoyl)-glutaminkonjugate hergestellt werden. Ein Weg *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**) herzustellen, wäre eine selektive Acylierung von Volicitin (**19**). Da mit organischen Synthesemethoden eine solche Acylierung auch an der Carboxylgruppe oder der Säureamidgruppierung des Volicitins (**19**) erwartet werden konnte, wurde die Acylierung durch Verwendung eines Enzyms versucht. Inkubation von Volicitin (**19**) und Linolensäure (**3**) in Decan mit Schweine Pankreas Lipase^[120] lieferte in der Tat Verbindung **47**, wie durch LC-MS Analyse gezeigt werden konnte (siehe Schema 14).



Schema 14: „Synthese“ von (17*S*)-*N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**)

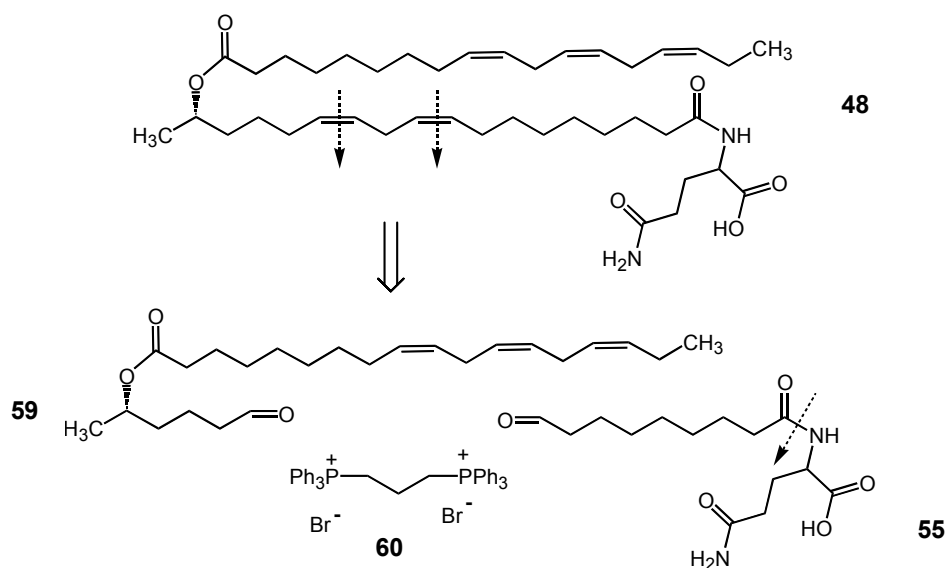
Das so gewonnene Produkt zeigte ein Massenspektrum, das mit der aus Regurgitat von *Spodoptera* Larven isolierten Verbindung **47** identisch war. Allerdings wurde mit der verwendeten Methode selbst nach mehrtägiger Reaktionszeit nur eine geringe Umsetzung von höchstens 5 % erreicht.

Um *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamine in größeren Mengen zur umfassenden spektroskopischen Charakterisierung und für Bioassays zur Verfügung zu haben, wurde eine Totalsynthese von *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**) durchgeführt. Für eine solche Synthese bot sich an, auf die von Pohnert *et al.* ausgearbeitete dissymmetrische Bis-Wittig Olefinierung zurückzugreifen,^[121] mit der in sehr kurzer Reaktionssequenz Volicitin (**19**) stereoselektiv hergestellt werden konnte.^[84] Schlüsselschritt der Synthese ist die Darstellung von 17-*t*-Butyldimethylsilyloxy-linolensäuremethylester (**56**) aus *in situ* generiertem *t*-Butyldimethylsilyloxy-milchsäurealdehyd (**57**), der Bis-Wittig Komponente (*Z*)-3-Hexen-1,6-bis-triphenylphosphoniumiodid (**58**) und 9-Oxononansäuremethylester (**52**) in einer Eintopfsynthese (siehe Schema 15).



Schema 15: Schlüsselschritt der stereoselektiven Synthese von Volicitin (**19**): reduktive Bis-Wittig Olefinierung von TBDMS-Milchsäurealuminat (**57**) und 9-Oxononansäuremethyl ester (**52**) mit (*Z*)-3-Hexen-1,6-bis-triphenylphosphoniumiodid (**58**) zum 17-*t*-Butyldimethylsilyloxy-linolensäuremethyl ester (**56**)^[84]

In Analogie zu der Synthese von Volicitin (**19**) sollte sich auch *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**) herstellen lassen. Die retrosynthetische Spaltung von *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**) an beiden Doppelbindungen liefert drei Vorstufen: Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**), *N*-(9-Oxononanoyl)-L-glutamin (**55**) und Propan-1,3-bistriphenylphosphoniumbromid (**60**) (siehe Schema 16).

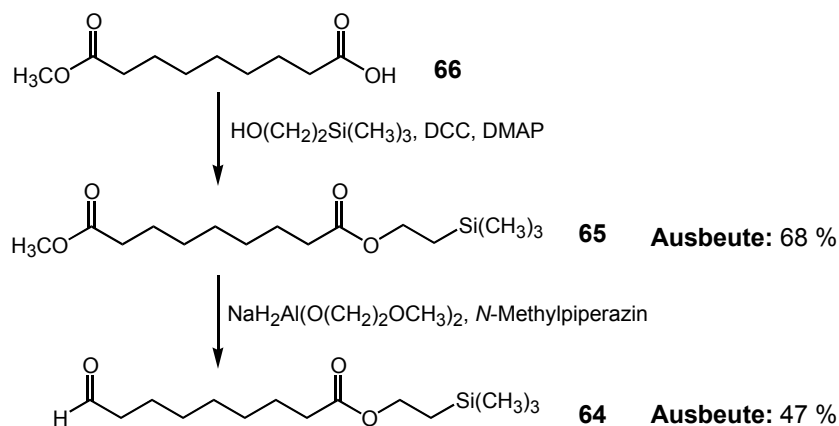


Schema 16: Retrosynthese von *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**)

Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) ist als Kopplungspartner für die Wittig Reaktion geeignet. Der Linolenoyl-Rest von Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) fungiert als Schutzgruppe der Hydroxyfunktion des 5-Hydroxyhexanals (**61**) bei der Wittig Reaktion.

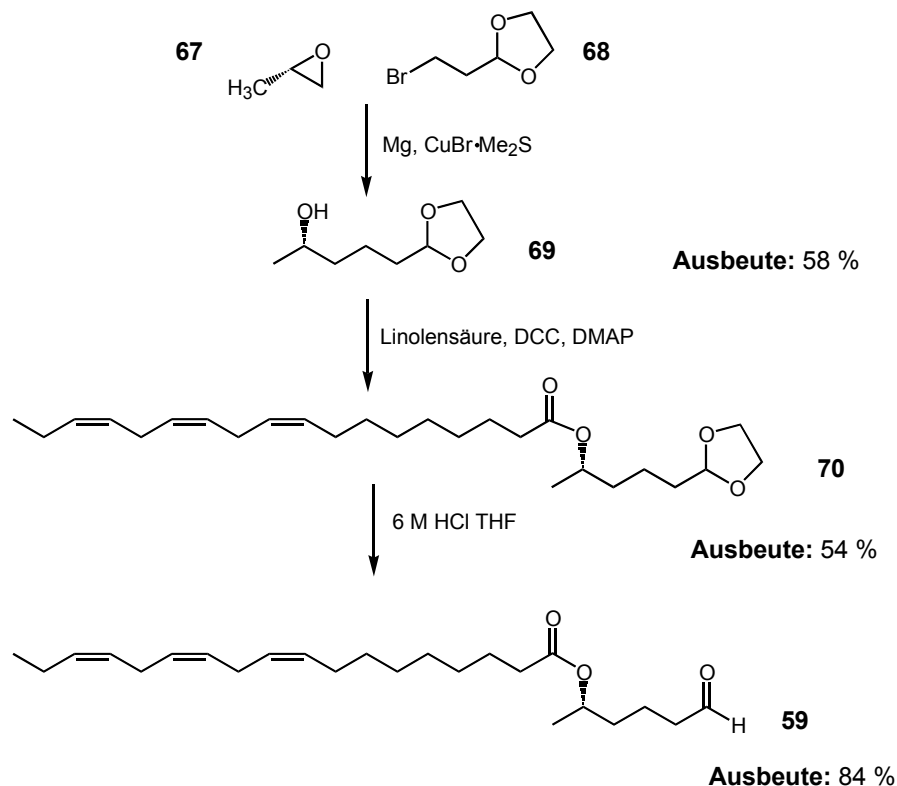
Dagegen ist der Einsatz eines *N*-(9-Oxononanoyl)-L-glutamins (**55**) in einer Bis-Wittig Reaktion nicht günstig, weil die freie Säurefunktion und möglicherweise auch die Amidfunktion der Aminosäure Glutamin (**24**) zur Durchführung einer Wittig Reaktion mit Propan-1,3-bistriphenylphosphoniumbromid (**60**) geschützt werden müssten. Deshalb wurde geplant, für die Wittig Olefinierung einen 9-Oxononansäureester - wie bei der Volicitinsynthese - zu verwenden und das Glutaminkonjugat in einem nachfolgenden Reaktionsschritt herzustellen. Es sollte demnach zunächst mit Hilfe der Wittig Reaktion ein 17-Linolenoyloxy-linolsäureester gebildet werden. Da bei der folgenden Hydrolyse des Methylresters auch der Linolenoylrest abgespalten werden würde, wurde zum Schutz der Carboxylgruppe der 2-Trimethylsilylethylrest gewählt.^[122, 123] Dadurch ist eine selektive Entschützung des 17-Linolenoyloxy-linolsäure-(2-trimethylsilylethyl)-esters (**62**) zur 17-Linolenoyloxylinolsäure (**63**) gewährleistet; diese kann anschließend mit Glutamin konjugiert werden. Als Kopplungspartner für die Olefinierung wurde daher 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) eingesetzt.

9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) erhält man durch selektive Reduktion des Methylresters von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**65**). Die selektive Reduktion konnte durch Verwendung von Bis-(2-methoxyethoxy)-aluminiumhydrid, das mit *N*-Methylpiperazin desaktiviert wurde, erreicht werden.^[124] Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**65**) wurde durch Umsetzung von Nonandisäuremonomethylester (**66**) mit 2-Trimethylsilylethanol in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-(*N,N*-Dimethylamino)-pyridin (DMAP)^[125] gewonnen (siehe Schema 17).



Schema 17: Synthese von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**)

(1*S*)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) wurde in drei Stufen erhalten. Dazu wurde (*S*)-Methyloxiran (**67**) mit 2-Bromethyl-1,3-dioxolan (**68**) zum 5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (**69**) umgesetzt.^[126] Die Veresterung der Hydroxygruppe mit Linolensäure (**3**) unter Verwendung von DCC und DMAP^[125] lieferte (1*S*)-1-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (**70**), der mit 6 N HCl bei 0 °C zum (1*S*)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) entschützt wurde (siehe Schema 18).

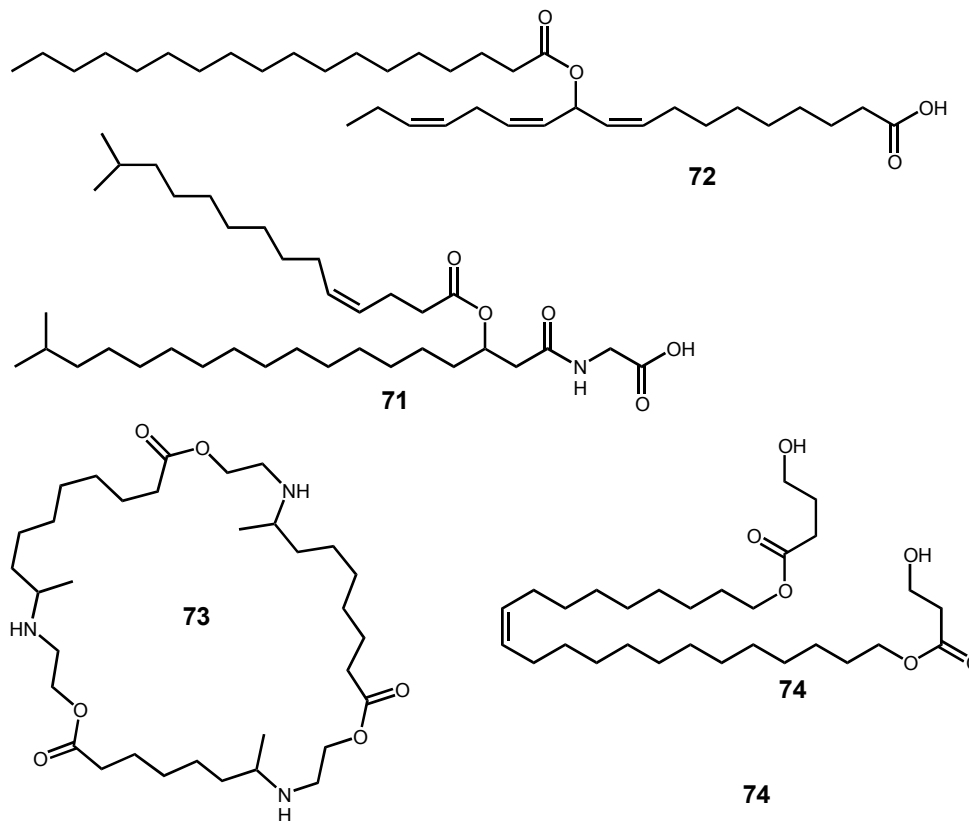


Schema 18: Synthese von (1*S*)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**)

Die dissymmetrische Bis-Wittig Olefinierung^[121] von (1*S*)-Linolensäure-(1-methyl-5-oxopentyl)-ester (**59**) und 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) mit Propan-1,3-bis(triphenylphosphonium)bromid (**60**) lieferte (17*S*)-17-Linolenoyloxy-linolsäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**62**), aus dem mit *t*-Butylammoniumfluorid (17*S*)-(17-Linolenoyloxy)-linolsäure (**63**) freigesetzt wurde. Nach Aktivierung der (17*S*)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (**63**) mit Chlorameisensäureethylester wurde das entstandene gemischte Anhydrid^[100] mit L-Glutamin (**24**) zum *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutaminkonjugat (**48**) umgesetzt (siehe Schema 19).

3.1.6.3 Bedeutung von *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten

Im Regurgitat von *Spodoptera* Larven lässt sich eine Vielfalt an *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten nachweisen. Verbindungen dieses Typs waren bisher unbekannt. Allerdings sind verwandte Moleküle isoliert worden (Schema 20):



Schema 20: Acyloxy-acylverbindungen (**71**, **72**, **74**) und Polyamine **73**

So produziert das marine Bakterium *Cytophaga* sp. SANK 71996 das *N*-(3-Acyloxy-acyl)-glycin **71**, welches interessanterweise als spezifischer *N*-Typ Calcium Kanalblocker wirkt.^[127] 3-Acyloxy-acyl-aminosäurekonjugate sind seit langem als Produkte anderer Mikroorganismen bekannt. Sie werden bei phosphatarmer Nahrung gebildet und dienen als Phospholipidersatz.^[128] Für die (17-Acyloxy-acyl)-glutamine kann eine ähnliche Funktion wohl nicht als wahrscheinlich angesehen werden, da ihre räumliche Struktur zu wenig einem Phospholipid ähnelt.

Aus dem Wehrsekret von Kohlweißlingsraupen (*Pieris rapae*) wurde von Meinwald *et al.* kürzlich eine Reihe von 11-Acyloxy-linolensäurederivaten (z. B. **72**), die Mayolene benannt wurden, isoliert und wegen ihres Tensidcharakters als Verteidigungstoff diskutiert.^[129] Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde aus dem Wehrsekret von

Epilachna borealis eine Vielzahl von Polyazamakroliden vom Typ **73** in unterschiedlichsten Ringgrößen gefunden.^[130] Diese Verbindungen weisen ein ähnliches Bauprinzip wie die *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamine aus dem Regurgitat von Lepidopteren auf, da sie letztendlich aus einer ω -1 substituierten Fettsäure und Aminoethanol, das aus der Aminosäure Serin stammt, aufgebaut sind.

Die entfernt verwandten Bruchine (**74**) von Rüsselkäfern (*Bruchus pisorum*) sind deshalb interessant, weil sie bereits im Femtomolbereich die Gallenbildung bei Erbsen (*Pisum sativum*) induzieren und damit zeigen, welche hohe physiologische Aktivität Lipidmoleküle haben können.^[131]

3.1.7 *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminkonjugate

3.1.7.1 Strukturaufklärung von *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminen

Motiviert durch die erfolgreiche Suche nach den funktionalisierten polaren *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutaminkonjugaten (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutaminkonjugaten (**33**) untersuchte ich den mittelpolaren Bereich des RP-18 HPL-Chromatogramms, in dem auch die hydroxylierten *N*-Acyl-glutamine eluieren, genauer. Bei der Analyse von *S. exigua* Regurgitat wurde im APCI-Massenspektrum gelegentlich ein breiter Peak, der direkt vor Volicitin bei 22 min eluiert, bemerkt (siehe Abbildung 20). Dieser Peak zeigte Ionen bei $m/z = 407$ sowie ein $[M+H]^+$ von $m/z = 505$.

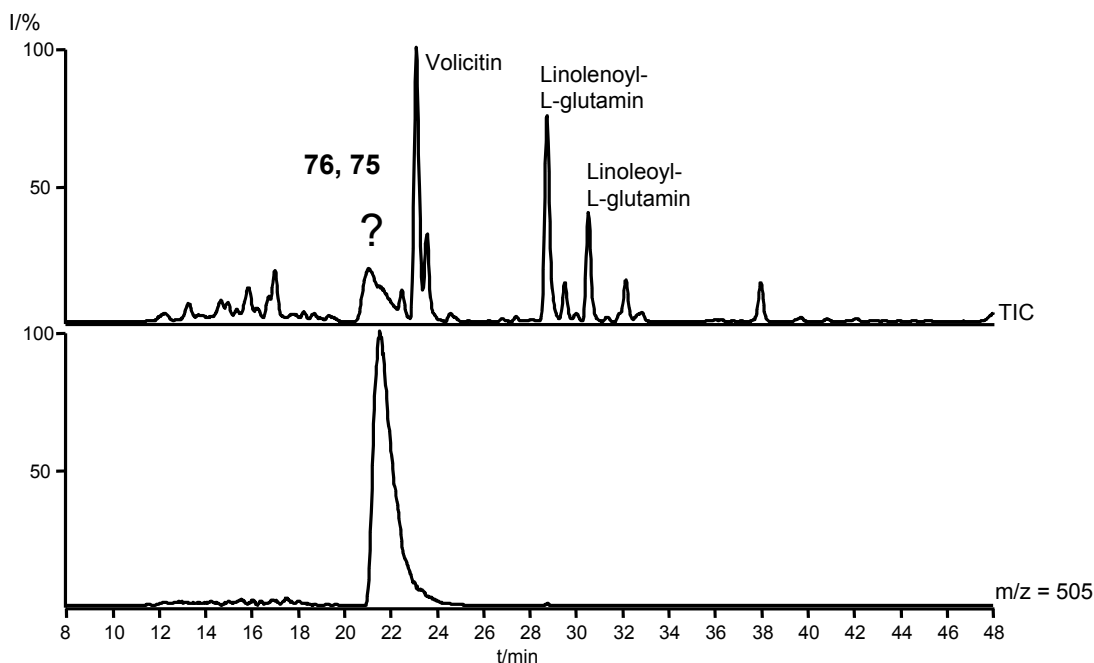


Abbildung 20: HPL-Chromatogramm^q und Ionenspur $m/z = 505$ eines unbekanntes Metaboliten (**75**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Im APCI-MS und im MS-MS-Spektrum der Verbindung **75** mit dem $[M+H]^+ = 505$ beobachtete man Ionen mit $m/z = 407$, 385 und 147 , den typischen Fragmenten eines *N*-Acyl-glutaminkonjugats. Die Differenz von $m/z = 505$ auf $m/z = 407$ beträgt 98 amu. Dies entspricht der Masse eines Schwefelsäure- oder Phosphorsäuremoleküls, so dass ich vermutete, dass die 17-Hydroxygruppe von *N*-(17-Hydroxy-

^q HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

linoleoyl)-L-glutamin (**20**) phosphoryliert bzw. sulfatiert vorliegen könnte (siehe Abbildung 21).

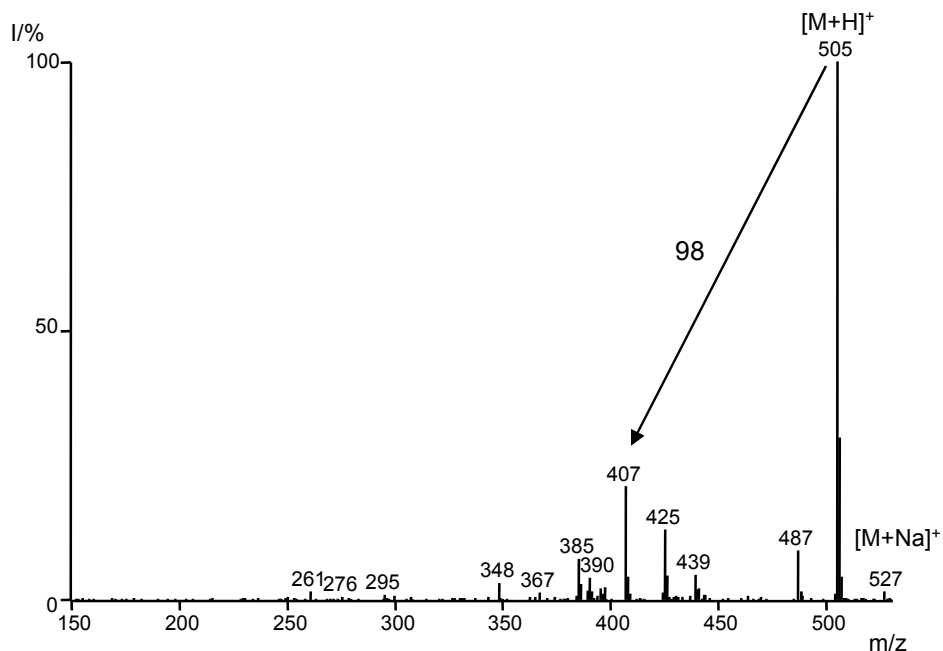
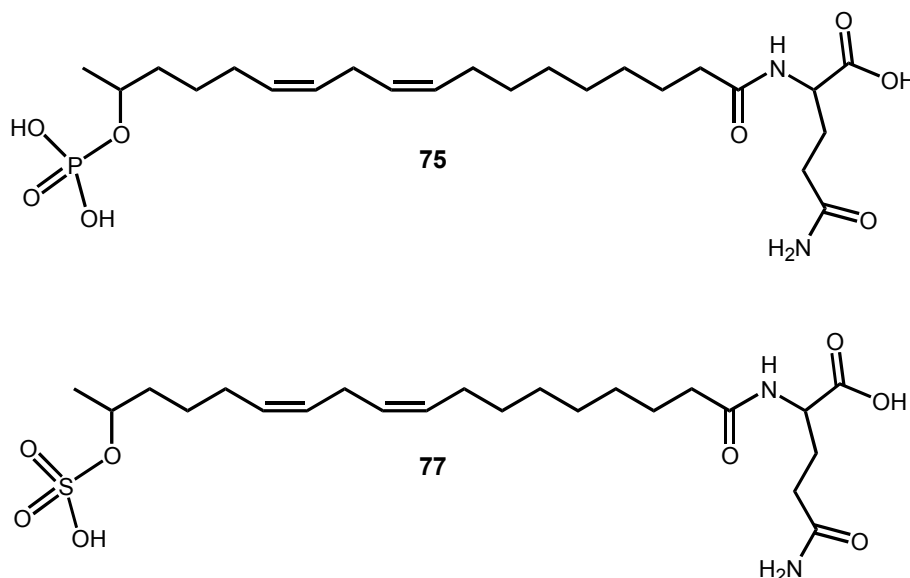


Abbildung 21: APCI-MS der Verbindung **75**. Verlust von 98 amu vom Molekülion führt zum Ion $m/z = 407$

Da die Verbindung **75** unter den verwendeten APCI Bedingungen äußerst labil ist und deshalb nur ein mig intensives $[M+H]^+$ zeigt, wurde zur schonenderen Ionisierung mittels Elektrospray gewechselt. Damit ließ sich neben dem Molekül **75** mit $[M+H]^+$ $m/z = 505$ auch eine weitere, um zwei Masseneinheiten leichtere Verbindung **76** mit dem Ion $m/z = 503$ nachweisen. Dieses Ion $m/z = 503$ könnte von einem in Position 17 phosphorylierten bzw. sulfatierten Volicitin (**19**) stammen. **76** sollte noch leichter Eliminierung eines Säurerestes erleiden als das entsprechende Linolsurederivat **75**, da dabei ein konjugiertes Doppelbindungssystem entsteht. Unter APCI-Bedingungen zeigte das vermutliche substituierte Volicitin (**19**) daher nur ein Ion bei $m/z = 405$. Beide Moleküle **75** und **76** eluieren von der RP18 Säule praktisch gleichzeitig. In Abbildung 20 erkennt man allerdings eine Schulter im Peak bei 21.5 min, die ebenfalls auf die Gegenwart von 2 Verbindungen hindeutet.



Schema 21: *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**) oder *N*-(17-Sulfooxy-linoleoyl)-glutamin (**77**)?

Eine Entscheidung, ob es sich bei der Verbindung mit dem Quasimolekülion $m/z = 505$ um ein *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**) oder ein *N*-(17-Sulfooxy-linoleoyl)-glutamin (**77**) handelt (Schema 21), lässt sich eindeutig treffen, wenn man negative ESI-MS-MS Spektren des Moleküls aufnimmt. Im Negativ-Modus weisen sowohl Ester der Schwefelsäure als auch der Phosphorsäure ein Ion bei $m/z = 97$ auf, das $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ bzw. $[\text{HSO}_4]^-$ entspricht. Bei Sulfaten beobachtet man jedoch ein zweites Ion mit $m/z = 80$ $[\text{SO}_3]^-$. Im Gegensatz dazu tritt im Massenspektrum von Phosphaten ein Ion bei $m/z = 79$ auf, das $[\text{PO}_3]^-$ entspricht.^[132, 133] An Hand dieser unterschiedlichen Ionen lassen sich *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)- und *N*-(17-Sulfooxy-acyl)-glutaminkonjugate eindeutig unterscheiden.

Für die Verbindung **76** erhält man unter negativ ESI Bedingungen (Abbildung 22) ein $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ion bei $m/z = 501$ und nach Eliminierung des Substituenten in Position 17 ein Ion mit $m/z = 403$. Außerdem erscheint ein intensives Ion bei $m/z = 97$ und ein weiteres weniger intensives Ion bei $m/z = 79$. Es handelt sich daher zweifelsfrei um einen Phosphorsäureester. Gleiches gilt für **75** dessen ESI-MS-MS Spektrum ebenfalls ein Ion bei $m/z = 79$ aufweist.

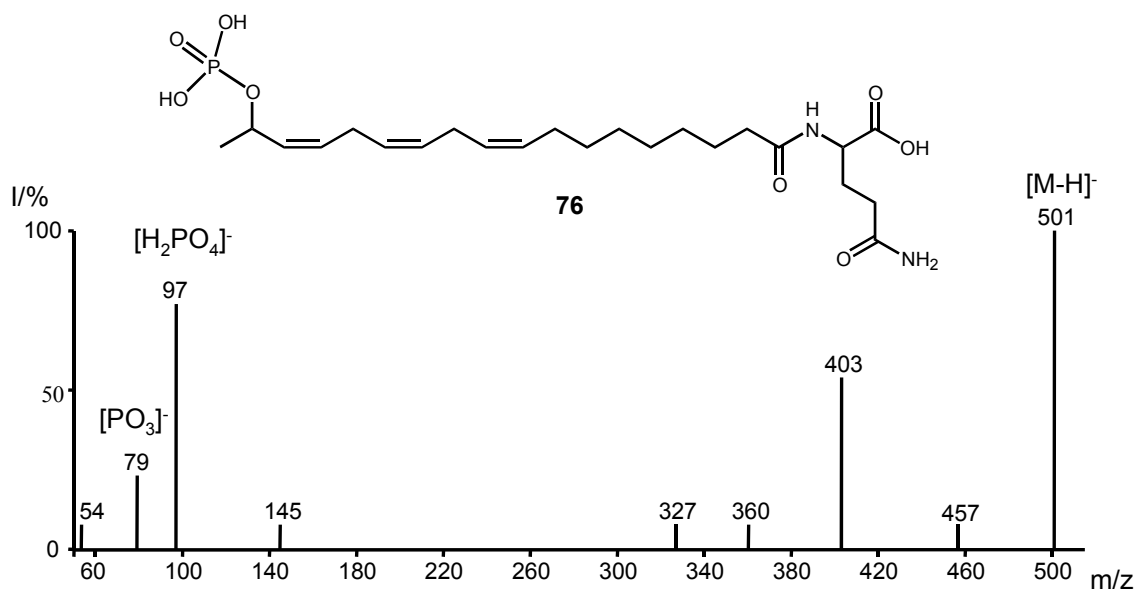


Abbildung 22: ESI-MS-MS Spektrum von *N*-(17-Phosphonoxy-linolenoyl)-glutamin (**76**)

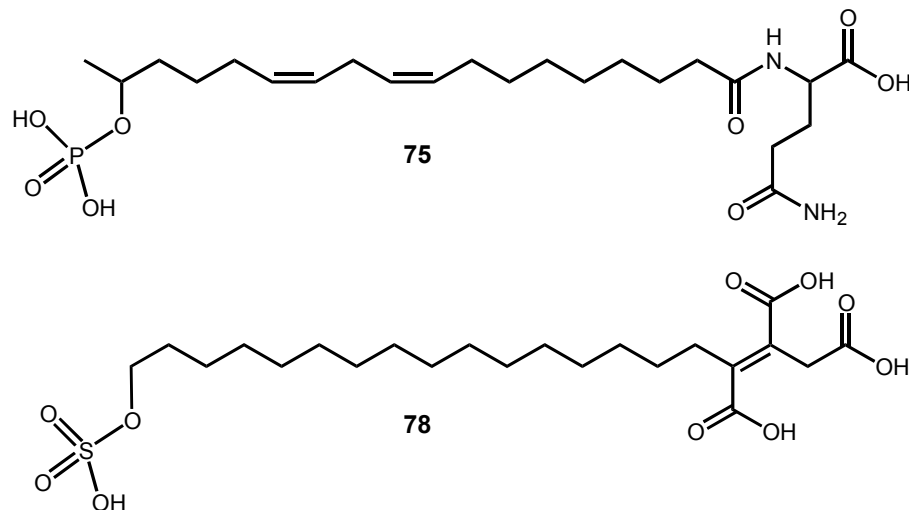
Aufgrund ihrer biologischen Herkunft aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven sollte es sich bei den beiden Verbindungen um Phosphate des Volicitins (**19**) bzw. des *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-glutamins (**20**) handeln. Die Verbindungen konnten bisher nur im Regurgitat von *S. exigua* Larven nachgewiesen werden.

3.1.8 Bedeutung der *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutamin-konjugate

Die *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-L-glutaminkonjugate **75** und **76** sind die ersten Beispiele für phosphorylierte langkettige Hydroxyfettsäurederivate, die in der Natur aufgefunden wurden. Da Phosphorylierung im Stoffwechsel häufig zur Aktivierung aber auch zur Desaktivierung von Signalstoffen Verwendung findet,^[134-136] könnte man über eine ähnliche Wirkung für die *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-L-glutamine **75** und **76** spekulieren.

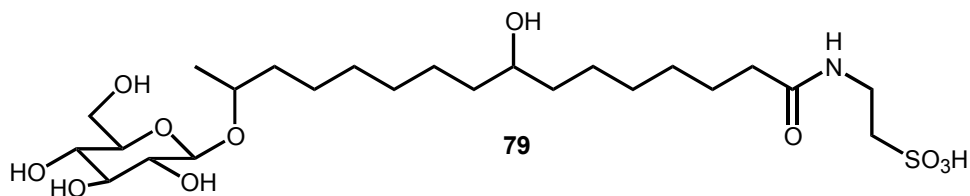
Durch die Phosphorylierung von Volicitin (**19**) bzw. *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**20**) erhält man ein Molekül mit zwei sehr polaren Kopfgruppen, die durch eine lange unpolare Kette verbunden sind. Durch die Phosphorylierung sollten sich daher die physikalischen Eigenschaften von *N*-(Hydroxy-acyl)-glutaminen drastisch verändern. Ein Naturstoff, mit verwandter Struktur zu den im Regurgitat von *S. exigua* Larven gefundenen *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminen **75** und **76** ist 19-Sulfooxy-2-nonadecen-1,2,3-tricarbonsäure (**78**) (siehe Schema 22).

Diese bipolare Verbindung **78** wurde aus einem Extrakt eines endophytischen Pilzes, der auf Blättern von *Berberis oregana* wächst, isoliert.^[137] Die Verbindung **78** stellt einen potenten Inhibitor der Ras Farnesyl-Protein-Transferase dar.



Schema 22: Vergleich von 19-Sulfoxy-2-nonadecen-1,2,3-tricarbonsäure (**78**)^[137] aus *Chaetomella acutiseta* mit *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Des weiteren weist das Pheromon der Kirschfliege (*Rhagoletis cerasi*) **79**, das die Eiablage in eine schon belegte Frucht verhindert, durch seine bipolare Struktur eine entfernte Verwandtschaft zu den *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutaminen (siehe Schema 23) auf.^[138]

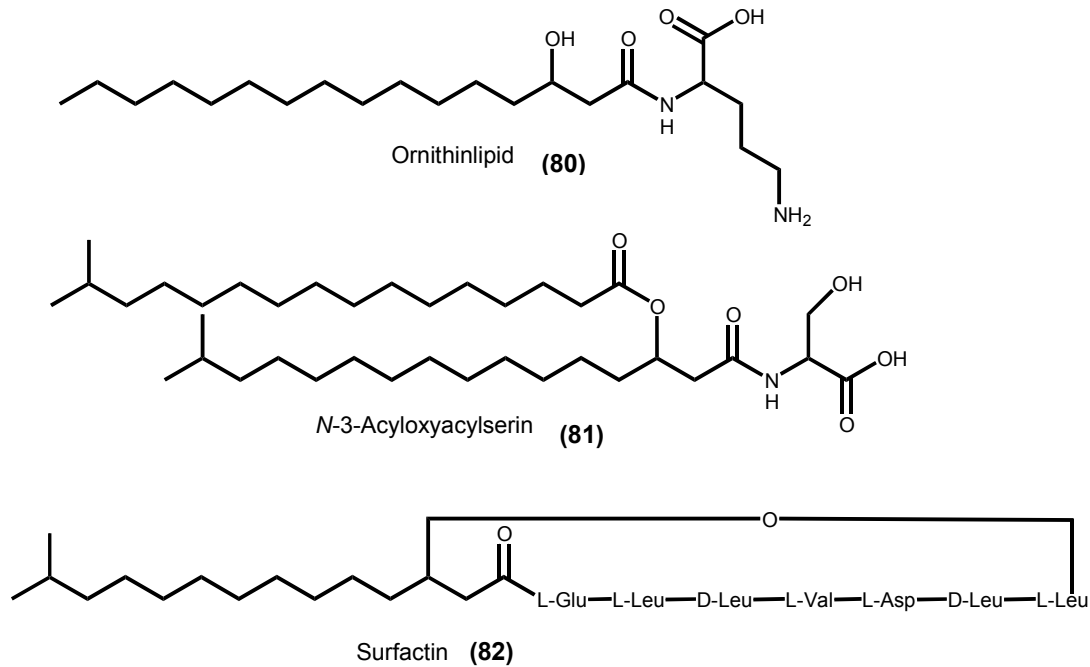


Schema 23: Das Anti-Eiablage-Pheromon (**79**) der Kirschfliege (*Rhagoletis cerasi*)^[138]

Nachdem mit *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)- und *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminen bereits zwei Derivate der *N*-(17-Hydroxy-acyl)-L-glutamine im Regurgitat von Lepidopterenlarven nachgewiesen werden konnten, wäre es sicherlich lohnend, nach *N*-Acyl-glutaminen im Regurgitat von Lepidopteren zu suchen, die in Position 17 glycosyliert sind.

3.1.9 Untersuchungen zur Biosynthese der *N*-Acyl-glutamin-konjugate

Sucht man zu den aus Regurgitat von Raupen isolierten *N*-Acyl-glutaminkonjugaten verwandte Naturstoffe, so stößt man auf Ornithinlipide **(80)**,^[139] Surfactin^[140] oder *N*-Acylserine **(81)**. Alle diese Verbindungen werden von Mikroorganismen gebildet (siehe Schema 24).^[141]



Schema 24: Ornithinlipide **80**, Serinlipide **81** und Surfactin **82**

Daher lag es nahe, zu untersuchen, ob *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate aus dem Regurgitat von Raupen möglicherweise ebenfalls bakteriellen Ursprungs sind.

Wie die rasterelektronen-mikroskopische Aufnahme des Vorderdarms von *S. exigua* Larven eindrucksvoll zeigt, ist der Darmtrakt von *S. exigua* Larven dicht mit Mikroorganismen besiedelt (siehe Abbildung 23).

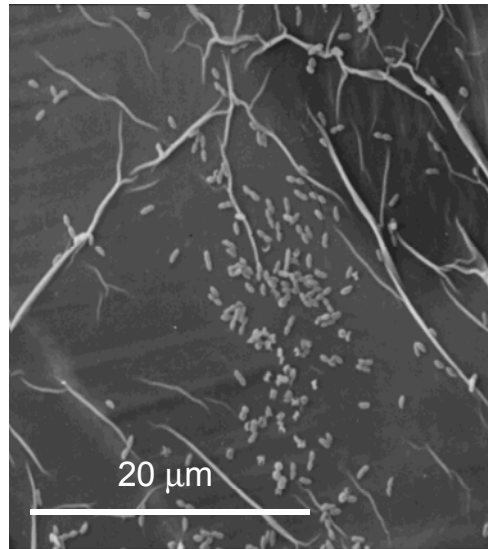
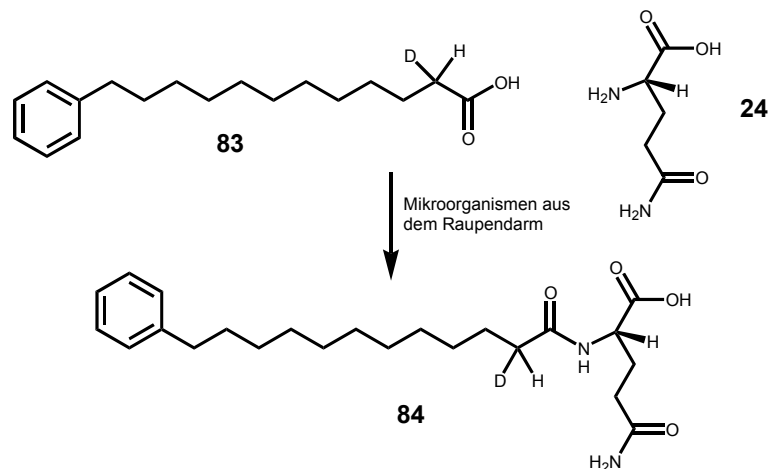


Abbildung 23: Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Vorderdarmes von *S. exigua* Larven zeigt, dass dieser mit einer Vielzahl kokkoider und stäbchenförmiger Mikroorganismen besetzt ist

Um zu untersuchen, ob die Darmbakterien von Lepidopterenlarven *N*-Acyl-glutamine produzieren, wurde Regurgitat mit [2-²H]-Phenyldodecansäure (**83**), einem oxidationsstabilen Analogon der Linolensäure (**3**),^[142] und L-Glutamin (**24**) vier Tage inkubiert. Nach 3 h, 5 h, 22 h und 4 d wurden Proben entnommen und per LC-MS analysiert. Die Verwendung von [2-²H]-Phenyldodecansäure (**83**) bot den Vorteil, dass der Nachweis der Bildung von *N*-([2-²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) neben den im Regurgitat vorhandenen Konjugaten zweifelsfrei gelingt.



Schema 25: Inkubation von Regurgitat von *S. exigua* Larven mit [2-²H]-Phenyldodecansäure (**83**) und Glutamin (**24**)

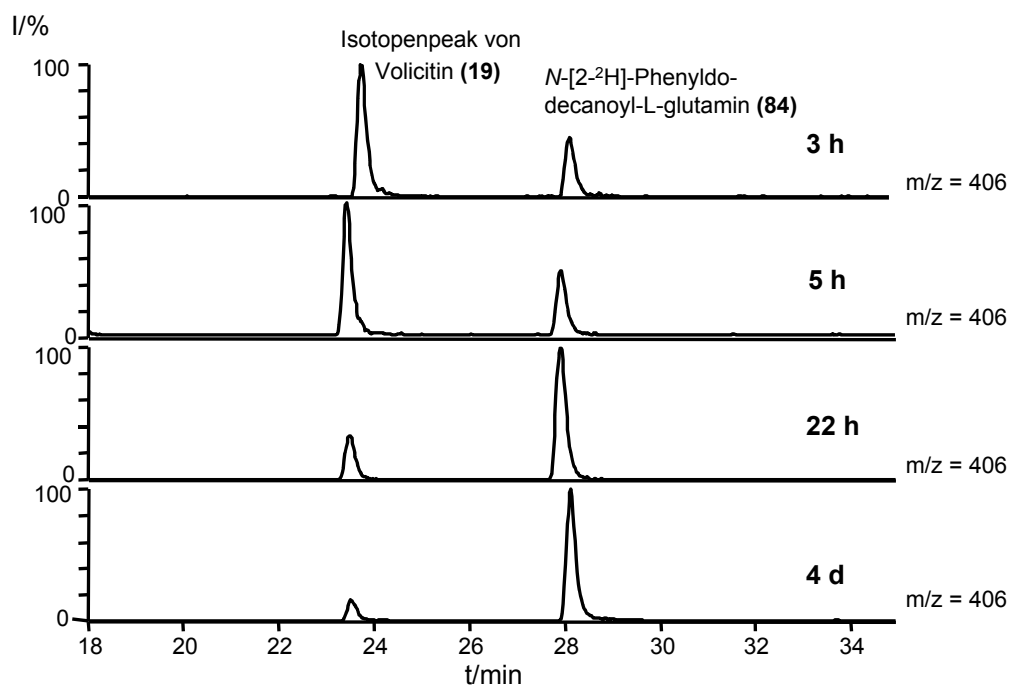


Abbildung 24: LC-MS Ionenspur^{r,s} der Bildung von *N*-([²⁻²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) nach 3 h, 5 h, 22 h und 4 d Inkubation von [²⁻²H]-Phenyldodecansäure (**83**) und L-Glutamin (**24**) mit Regurgitat von *S. exigua* Larven

Bei diesem Inkubationsversuch erhielt man eine Verbindung, deren Massenspektrum und Retentionszeit mit dem von synthetischem *N*-([²⁻²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) ($[M+H]^+ = 406$) übereinstimmte (siehe Schema 25 und Abbildung 24). Das bedeutet, dass sich mit Regurgitat *in vitro* Konjugate synthetisieren lassen.

Bei dem Experiment beobachtete man ein Maximum an neu gebildetem *N*-([²⁻²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) nach mehreren Tagen. Der zeitliche Verlauf der Konjugatbildung ließ vermuten, dass Mikroorganismen an der Reaktion beteiligt sein könnten. Würde ein vom Insekt in den Darm sezerniertes Enzym die Reaktion durchführen, so sollte man aufgrund von Denaturierungsprozessen eine rasche Abnahme der Aktivität erwarten. In einem folgenden Versuch wurde Regurgitat auf LB-Medium ausplattiert und 2 d bei 28 °C inkubiert. Mikroorganismen dieser

^r Da die Ionenspur $m/z = 406$ abgebildet ist, wird von Volicitin mit dem Quasimolekularion $m/z = 405$ der Isotopenpeak beobachtet.

^s HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

Mischkultur wurden in ein Eppendorf-Röhrchen mit 0.5 ml Phosphatpuffer überführt, um zu untersuchen, ob bei Substratzugabe von Fettsäuren und L-Glutamin (**24**) *N*-Acyl-glutaminkonjugate gebildet werden. Im LC-MS wurden je nach verfüttertem Fettsäuresubstrat die Bildung von *N*-([2-²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutaminen (**84**), *N*-Linolenoyl-L-glutaminen (**21**), *N*-Linoleoyl-L-glutaminen (**22**) und *N*-Oleoyl-L-glutaminen (**23**) beobachtet. Bei Kontrollversuchen mit Glutamin (**24**) und Fettsäuren enthaltenden Pufferlösungen war keine Konjugatbildung nachweisbar. Demnach sind Bakterien aus dem Darm von *S. exigua* Larven in der Lage, *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate zu produzieren.^[143]

3.1.9.1 Isolierung und Bestimmung der Mikroorganismen durch 16S-rRNA Analyse und Einschätzung ihrer ökologischen Bedeutung

Nach diesen Versuchen wurden im Labor von Prof. Dr. Dettner (Tierökologie II, Universität Bayreuth) *S. exigua*, *A. segetum* und *M. brassicae* Larven unter sterilen Bedingungen seziiert und ihr Vorderdarminhalt zur Gewinnung der Darmbakterien auf BHI-Platten[†] ausgestrichen. BHI ist ein nährstoffreiches Komplexmedium aus Rinderherz und Hirn, das sich zur Kultivierung von Mikroorganismen als sehr geeignet erwiesen hat.^[144] Von den ausplattierten Mikroorganismen wurden Reinkulturen durch Verdünnungsreihen und Selektion einzelner Klone nach Kriterien wie Form und Farbe hergestellt. Die auf diese Weise isolierten Darmbakterien wurden in BHI-Flüssigkulturen überführt und über Nacht in Eppendorf-Röhrchen mit luftdurchlässigem Deckel angezogen. Um zu ermitteln, ob die aus den Larven isolierten Mikroorganismen in der Lage sind, *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate zu bilden, wurde zu Kulturen in 1 ml BHI-Medium 1 µl Linolensäure (**3**) und 1 mg L-Glutamin (**24**) gegeben und bei 28 °C und unter Schütteln bei 200 U/min für mehrere Stunden inkubiert. Proben (20 µl) wurden entnommen, mit 20 µl Methanol versetzt, zentrifugiert und der Überstand direkt per LC-MS untersucht. Bei ersten Versuchen stellte sich heraus, dass die meisten der isolierten Mikroorganismen Konjugate produzierten, wohingegen mit autoklavierten Mikroorganismen keine Bildung von *N*-Acyl-L-glutaminkonjugaten zu beobachten war. Durch Zugabe von *N*-([2-²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) als Standard gelang es festzustellen, welcher der untersuchten Stämme für die Herstellung von *N*-Acyl-L-glutaminkonjugaten

[†] Brain Heart Infusion Agar

besonders geeignet war. Auf diese Weise wurden 4 Stämme (aus dem Regurgitat von *S. exigua*, *A. segetum* und *M. brassicae* Larven) ausgewählt, die sich als verlässliche *N*-Acyl-aminosäureproduzenten erwiesen hatten (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: 4 *N*-Acylaminosäure produzierende Mikroorganismen, aus dem Vorder- bzw. Mitteldarm von *S. exigua*, *A. segetum* und *M. brassicae* Larven, bestimmt durch 16S-rRNA Analyse^u

Stammnummer	Spezies ^[145] % Homologie	Herkunft	Konjugatproduktion
P5St5	<i>Acinetobacter</i> sp. Genospezies 11 99.6 %	<i>Mamestra brassicae</i>	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin
St1Fl	<i>Providencia rettgeri</i> 99.8 %	<i>Agrotis segetum</i>	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin
P2St6	<i>Myroides odoratus</i> 99.1 %	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamat
P2St7	<i>Ochrobactrum</i> sp. nicht beschriebener Vertreter 97.5 %	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin

Um sich ein genaueres Bild über die Diversivität der Mikroorganismen und deren Fähigkeit, *N*-Acyl-aminosäuren zu produzieren, machen zu können, wurden in einem großangelegtem Versuch erneut Mikroorganismen von *S. exigua* Larven diesmal unter Verwendung unterschiedlicher Nährmedien isoliert. Insgesamt ließen sich bei diesem Experiment 26 unterschiedliche Stämme isolieren und durch Dr. Jörn Piel und Lyiang Ping per 16S-rRNA Analyse, einer zuverlässigen molekularbiologischen Methode,^[146] bestimmen (siehe Tabelle 4). Da sich erfahrungsgemäß aus biologischem Material nur etwa 1 % der vorhandenen Mikroorganismen^[146] kultivieren lassen, sind im Darm von *S. exigua* Larven mehr als 200 verschiedene Mikroorganismen zu erwarten.

Viele der aus dem Darm von *S. exigua* Larven isolierten Mikroorganismen wie z. B. *Streptomyces aureus* oder *Providencia rettgeri* werden als Pathogene eingestuft. Solche Stämme sind äußerst anpassungsfähig und resistent gegen Antibiotika.^[147, 148] Ein Grund für ihr Vorhandensein im Raupendarm könnte darin zu sehen sein, dass die verwendeten *S. exigua* Larven von einer lang etablierten Laborkultur (Fa. BAYER) stammen. Der Raupennahrung werden standardmäßig Antibiotika wie

^u Der Prozentsatz in der Spalte Spezies gibt die Übereinstimmung der 16S-rRNA Analyse des isolierten Stammes mit dem genannten Stamm an.

Gentamycin zugesetzt, so dass sich nur angepasste Bakterien dauerhaft im Darm der Raupen ansiedeln können. Es wäre daher für zukünftige Experimente äußerst interessant, *Spodoptera* Larven aus der Natur zu sammeln und diese mit Laborkolonien bezüglich ihrer Darmbakterien zu vergleichen.

Ein erster Ansatz in diese Richtung war die Untersuchung der Darmflora von *S. exigua* Raupen, die auf verschiedenen Futterpflanzen fraßen bzw. mit künstlicher Diät ernährt wurden.

Die 16S-rRNA Analyse von je 3 isolierten Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven, die auf Mais- bzw. Bohnepflanzen fraßen, zeigte, dass neue Stämme im Vergleich zu den Mikroorganismen, die aus *S. exigua* Larven nach Fraß von künstlicher Diät isoliert wurden, hinzukommen. Allerdings ließen sich in erster Linie Stämme nachweisen, die bereits von *S. exigua* Larven isoliert worden waren, die mit künstlicher Diät ernährt worden waren (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Eine gewisse Flexibilität der Darmflora in Abhängigkeit von der Futterpflanze erscheint demnach möglich. Bei Grillen (*Acheta domestica*)^[149] wurde eine größere Variabilität der Darmflora in Abhängigkeit vom Futter festgestellt. Zur Beurteilung, ob die Ernährung auch bei *Spodoptera* Larven einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmbakterien hat, wären allerdings umfangreiche Experimente notwendig. Um die ökologische Relevanz eines solchen Vergleichs abschätzen zu können, müssten aus der Natur gesammelte Raupen verwendet werden.

Tabelle 4: Mikroorganismen aus dem Vorder- bzw. Mitteldarm von *S. exigua* Larven, bestimmt durch 16S-rRNA Analyse^u

Stamm	Spezies ^[145] % Homologie	Vorkommen/ Bemerkung	Konjugat- produktion
Se8,15	<i>Staphylococcus aureus</i> 100%	Haut	+
Se69	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 99%	Haut	-
Se57	<i>Gordonia terrae</i> 99%	Boden, Insektendarm	(+) ^v
Se67	<i>Bacillus pumilus</i> 100%	Boden	+
Se55,64	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 100%	Boden, Insektendarm	+
Se12,36	<i>Enterococcus mundti</i> 99%	Verdauungstrakt	(+) ^v
Se51,62, 65	<i>Enterococcus rottae</i> 99% <i>E. sp. RfL6</i> aus Termitendarm 98%	Verdauungstrakt	-
Se52,54, 66	Sehr nah verwandt zu: <i>Enterococcus flavescens</i> 99% <i>E. gallinarum</i> 99% <i>E. casseliflavus</i> 99% <i>E. saccharolyticus</i> 99%	Verdauungstrakt	-
Se14,24, 50,53,61	<i>Microbacterium arborescens</i> 99% <i>M. imperiale</i> 99%	<i>M. imperiale</i> : Darm <i>Eacles imperialis</i>	(+) ^v
Se9,31	<i>Ochrobactrum</i> sp. PR17 <i>O. sp. 4FB13</i> (nah verwandt zu <i>O. grignonense</i>)	PR17 stammt von der Rhizosphäre von Kartoffelpflanzen	-
Se26	<i>Corynebacterium propinquum</i> 99% <i>C. pseudodiphtheriticum</i> 98%	Verdauungstrakt	+
Se60	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 98%	Boden	+
Se11	<i>Acinetobacter</i> sp. DSM590 99% (nahe verwandt zu <i>A. calcoaceticus</i>)	ubiquitär	+
Se5,18,2 0,22,23,2 5,30,32,5 8,63	Am nächsten verwandt zu <i>Leucobacter komagatae</i> 94%		-
Se21,35	Am nächsten verwandt zu <i>Arthrobacter nicotianae</i> 98%	Boden	+
Se2	Erwinia Supercluster, nahe verwandt zu <i>Pectobacterium cypripedii</i> (97%)	verursacht Wurzelfäule	+
Se4,28,P 61	Klebsiella, nahe verwandt zu <i>K. oxytoca</i> 98%	Pflanzenoberfläche	+
Se17	<i>Enterobacter cloacae</i> 99%	Verdauungstrakt	-
Se59	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 99%		+
Se39	<i>Micrococcus luteus</i> 99%	Haut	-

^v Die Klammer gibt an, dass bei dieser Versuchsreihe keine oder nur geringe Produktion von *N*-Acyl-L-glutaminen beobachtet wurde. In weiteren Versuchsreihen wurden hingegen *N*-Acylglutamine gefunden.

Tabelle 5: Drei statistisch ausgewählte Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven nach Fraß an Maispflanzen (*Zea mais*)^u

Stamm	Spezies ^[145] % Homologie	Vorkommen/ Bemerkung	Konjugat- produktion
A13	Ochrobactrum sp. PR17 98%	Kartoffelrhizosphäre	+
III7	Pseudomonas sp. ML2 99% P. sp. DCM5B 99% <i>P. putida</i> 99% <i>P. plecoglossicida</i> 99% P. sp. HR13 99%	Biotensidproduzent Flussmündung Akazienrhizosphäre Boden Darmsymbiont	+
V1	<i>Microbacterium arborescens</i> 97% <i>M. imperiale</i> 97%	<i>M. imperiale</i> : Darm <i>Eacles imperialis</i>	+

Tabelle 6: Drei statistisch ausgewählte Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven nach Fraß an Limabohnenpflanzen (*Phaseolus lunatus*)^u

Nummer	Spezies ^[145] % Homologie	Vorkommen/ Bemerkung	Konjugat- produktion
A5	<i>Microbacterium arborescens</i> 97% <i>M. imperiale</i> 97%	<i>M. imperiale</i> : Darm <i>Eacles imperialis</i>	+
II10	<i>Pseudomonas</i>		+
V2	<i>Bacillus anthracis</i> 99% <i>B. cereus</i> 99 %	Abwasser Erde	+

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Darmbakterien von *Manduca sexta* Larven auf BHI-Agar ausgestrichen und die Mischkultur für *in vitro* Versuche verwendet. Interessanterweise produzierte die Mischkultur nach Gabe von Linolensäure (**3**) und L-Glutamin (**24**) neben *N*-Acyl-L-glutaminen etwa doppelt soviel *N*-Acyl-L-glutamate. Bei Verfütterung von L-Glutamat und Linolensäure (**3**) an die Mischkultur der aus *M. sexta* isolierten Darmbakterien wurde sogar ein Verhältnis von 12:1 an *N*-Linolenoyl-L-glutamat (**25**) zu *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) beobachtet. Der bevorzugte Einbau von *N*-Acyl-L-glutamaten durch Mikroorganismen aus dem Darm von *M. sexta* Larven spiegelt die Verhältnisse im Regurgitat von *M. sexta* Larven wieder, in dem - im Gegensatz zu *Spodoptera* Larven - ebenfalls die *N*-Acyl-glutamatkonjugate überwiegen.

Bisher wurde bei sämtlichen untersuchten Mikroorganismen aus Lepidoptera Larven neben der Bildung von *N*-Acyl-L-glutaminen auch die Fähigkeit zur ω -1 Hydroxylierung zu Volicitin (**19**) bzw. *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-glutamin (**20**) beobachtet.

Bei der Suche nach Stämmen, die möglicherweise für die Bildung von Volicitin (**19**) verantwortlich sind, könnte sich die durchgeführte 16-SrDNA-Analyse der Darmbakterien von *S. exigua* Larven als wertvoll erweisen. So wurden *Bacillus* Arten isoliert, die für ihre Fähigkeit zur ω -1 Hydroxylierung bekannt sind.^[75, 79] Ein isolierter Stamm ist zu 100 % identisch mit *Bacillus pumilus*, der Ölsäure in Position 15,16 und 17 hydroxylieren kann.^[79] Möglicherweise wird daher Linolensäure (**3**) oder *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) unter geeigneten Bedingungen durch *Bacillus pumilus* oder durch einen engen Verwandten in Position 17 hydroxyliert.

B. pumilus erscheint besonders interessant, da dieser Mikroorganismus als Rhizobakterium der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) große Mengen an Gibberellinen, pflanzlichen Wachstumshormonen, bildet.^[150] Bei *A. glutinosa* konnte gezeigt werden, dass die bakteriellen Gibberelline Wachstum induzieren.^[151] Eine ähnliche Reaktion von Pflanzen wäre denkbar, wenn Bakterien aus dem Regurgitat während des Fraßvorganges in die frische Wunde einer Pflanze gelangen.

Weiterhin sind im Darm von *S. exigua* Larven eine Reihe weiterer Mikroorganismen - wie z. B. *Enterococcus* Arten^[145] - vorhanden, die als typische Darmbakterien angesehen werden können. Ansonsten findet man Mikroorganismen, die typisch für Pflanzenoberflächen sind. Eine genaue Untersuchung solcher Bakterien wäre besonders interessant, da sie möglicherweise eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Herbivoren und ihren Futterpflanzen spielen. In diesem Zusammenhang ist wohl besonders *Pectobacterium cyripedii* erwähnenswert, weil dieses nahe verwandt zum *Erwinia* Supercluster ist. *Erwinia carotovora* ist ein bekanntes und intensiv studiertes Pflanzenpathogen, das Wurzelfäule auslöst.^[152] Demnach stellt sich auch die Frage, ob Herbivore durch Aufnahme solcher Mikroorganismen Pflanzenkrankheiten verbreiten können.

3.1.9.2 Bildung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten durch Mikroorganismen aus dem Darm von *Spodoptera* Larven

Sämtliche aus dem Darm von *S. exigua* Larven isolierten und durch 16S-rRNA Analyse bestimmten Stämme (siehe Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6) wurden auf ihre Fähigkeit, *N*-Acyl-glutaminkonjugate zu bilden, untersucht. Dazu wurden zu den über Nacht in einem Eppendorf-Röhrchen mit luftdurchlässigem Deckel in BHI-Medium angezogenen Stämmen Linolensäure (**3**) und Glutamin (**24**) als Substrate gegeben. Die Substrate wurden erst 9 Stunden nach Inokulation zugefügt, da sich

die meisten der untersuchten Stämme dann am Ende der Log-Phase befanden (siehe Abbildung 47). Nach 4 h Inkubationszeit wurden die Proben per LC-MS untersucht. Durch Zugabe von [2-²H]-*N*-Phenyldodecanoyl-L-glutamin (**84**) als internem Standard war es möglich, die Menge der von den jeweiligen Mikroorganismen produzierten *N*-Acyl-aminosäurekonjugate zu bestimmen und so untereinander zu vergleichen. Von den 26 bestimmten Stämmen waren 16 in der Lage, Konjugate zu produzieren.

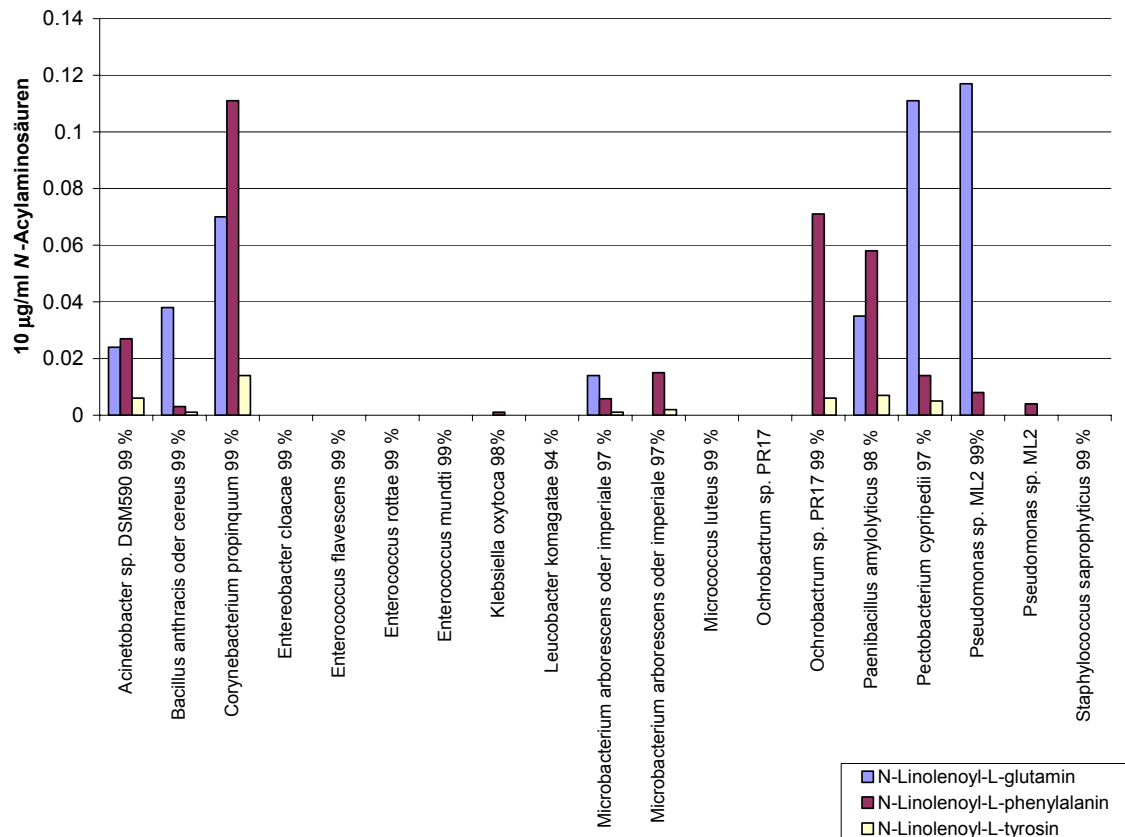


Abbildung 25: Synthese von *N*-Acyl-aminosäuren durch Darmbakterien von *S. exigua*

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammengestellt, in der 19 Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit getestet wurden, *N*-Acyl-aminosäurekonjugate zu produzieren. Mehr als 70 % der isolierten Mikroorganismen sind demnach in der Lage, nach Zugabe von Fettsäuren und L-Glutamin (**24**) *N*-Acylglutamine zu bilden, was auf eine weite Verbreitung von Fettsäure konjugierenden Enzymen schließen lässt.

Man beobachtet sehr große Schwankungen hinsichtlich des Ausmaßes der Konjugatproduktion, wenn man unterschiedliche Mikroorganismen vergleicht. Allerdings stellt man auch eine große Variabilität der Konjugatbildung beim Vergleich individueller Kulturen der gleichen Mikroorganismen fest. Um diese Schwankungen wenigstens teilweise verhindern zu können, wurden bei 12 Stämmen gleichzeitig je Organismus 3 Kulturen unter völlig identischen Bedingungen inokuliert, nach 8 h Wachstum Linolensäure **(3)** und L-Glutamin **(24)** zugegeben und nach 4 h Inkubationszeit Proben für die LC-MS Analyse entnommen. Unter diesen Bedingungen wurden für viele Stämme bei den drei individuellen Kulturansätzen ähnliche Konjugatkonzentrationen gefunden. Dennoch gab es auch unter diesen weitgehend identischen Bedingungen Mikroorganismen, die große Schwankungen bezüglich der Produktion von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten zeigten. Ein quantitativer Vergleich der Fähigkeit zur Bildung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten ist daher problematisch. Die Produktion der Konjugate wird von vielen Parametern beeinflusst: Zellzahl, Medium, Temperatur, Alter der Kulturen, Menge der zugegebenen Substrate und Menge der zur Inokulation verwendeten Organismen. Versuche von Lyiang Ping zur Charakterisierung der *N*-Acyl-glutamin bildenden Enzyme bei *Providencia rettgeri* zeigen, dass es ein Maximum der Konjugatbildung gegen Ende der Log-Phase der Mikroorganismen gibt. Vor diesem Zeitpunkt an werden Konjugate gar nicht oder nur in sehr geringer Menge gebildet. Um die Konjugatbildung für alle Mikroorganismen vergleichen zu können, müsste man demnach unter standardisierten Bedingungen arbeiten und vorab durch kinetische Messung der Konjugatbildung für den jeweiligen Organismus den Zeitpunkt der maximalen Konjugatbildung ermitteln.

Deshalb sollten die in Abbildung 25 dargestellten Konjugatmengen als Momentaufnahme von hochdynamischen Systemen angesehen werden. Eine weitere Ursache für die Schwankungen könnte darin liegen, dass neben *N*-Acyl-glutaminen viele der aus dem Darm von *S. exigua* Larven isolierten Mikroorganismen auch Konjugate mit Aminosäuren bilden, die vermutlich aus dem BHI-Medium stammen. Auch hier lassen sich starke Schwankungen in der Präferenz der Aminosäuren beobachten. Einige der untersuchten Mikroorganismen zeigten *in vitro* eine Präferenz zur Konjugatbildung mit Phenylalanin und Lysin. Brady *et al.* haben kürzlich aus Bodenbakterien ein Gen eines Enzyms isoliert, das langkettige *N*-Acyl-

tyrosinkonjugate produziert.^[153] Nach allen diesen Befunden sind Mikroorganismen in der Lage, eine breite Vielfalt von *N*-Acyl-aminosäuren zu bilden.

3.1.9.3 Substratspezifität der Produktion von *N*-Acyl-aminosäuren durch Mikroorganismen *in vitro*

Zur Untersuchung der Substratspezifität der Bildung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten durch Mikroorganismen aus dem Darm von Lepidopteren wurden exemplarisch drei Kulturen ausgewählt: *Providencia rettgeri*, *Ochrobactrum* sp. und *Acinetobacter* sp.. Fast alle natürlichen Aminosäuren wurden von den untersuchten Stämmen in *N*-Acylaminosäurekonjugate überführt. Bemerkenswerterweise wurden aber gerade die zu Glutamin (**24**) eng verwandten Aminosäuren Glutamat und Aspartat überhaupt nicht und Asparagin nur schlecht umgesetzt. Dagegen wurden einige Dipeptide von den Mikroorganismen zur Konjugatbildung mit Fettsäuren akzeptiert (siehe Tabelle 7).

Ein Beispiel für das Produkt einer Umsetzung von Dipeptiden ist *N*-Linolenoyl-glutamyl-glycin (**85**), dessen APCI-Massenspektrum in Abbildung 26 dargestellt ist. Das acylierte Dipeptid zeichnet sich durch ein intensives $[M+H]^+$ -Ion aus. Außerdem findet man ein intensives Ion bei $m/z = 389$, das durch Abspaltung des Glycinrestes und Wasserstofftransfer gebildet wird (Abbildung 26).

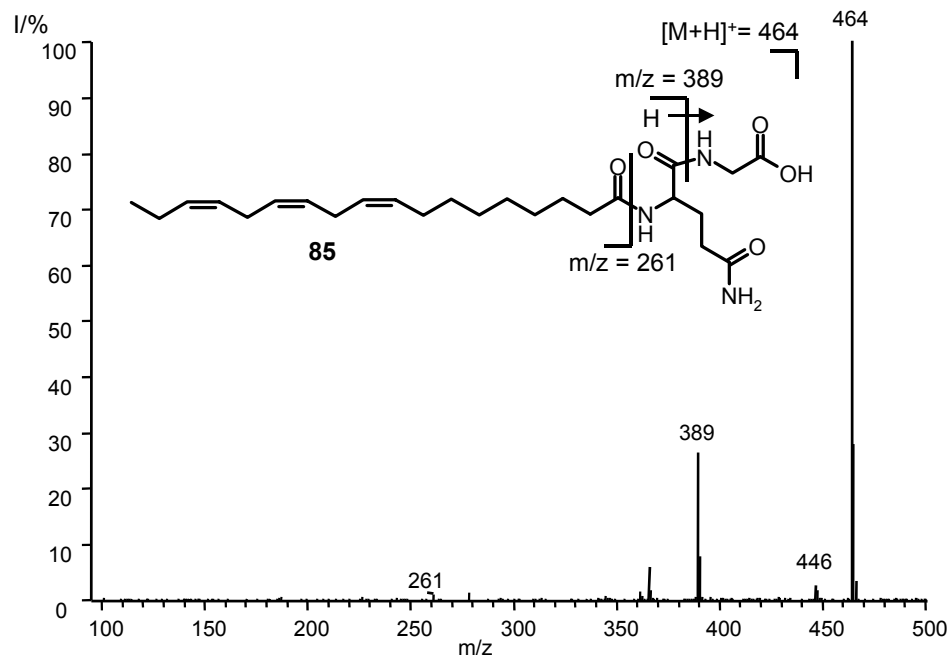


Abbildung 26: APCI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-glutamyl-glycin (**85**)

Tabelle 7 Bildung von *N*-Acyl-dipeptiden durch Darmbakterien von Schmetterlingslarven mit Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. (+: Bildung von *N*-Acyl-dipeptid -: keine Bildung von *N*-Acyl-dipeptid)

Dipeptid	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
Gln-Gly	+	nicht getestet	nicht getestet
Ala-Ala	+	+	+
γ -Glu-Phe	-	+	+
Gly-Leu	+	+	+
β -Ala-His	+	+	+

Im Regurgitat der *Spodoptera Larven* findet man Glutaminkonjugate der Fettsäuren, die die Raupe mit der Nahrung aufnimmt. In Pflanzen stellen Linolensäure (**3**) und Linolsäure den Hauptanteil von Fettsäuren dar. Um festzustellen, ob die Darmbakterien *in vitro* nur Fettsäuren bestimmter Kettenlänge bevorzugen, wurde eine Mischung von C-8 bis C-18 Fettsäuren verfüttert (siehe Abbildung 27).

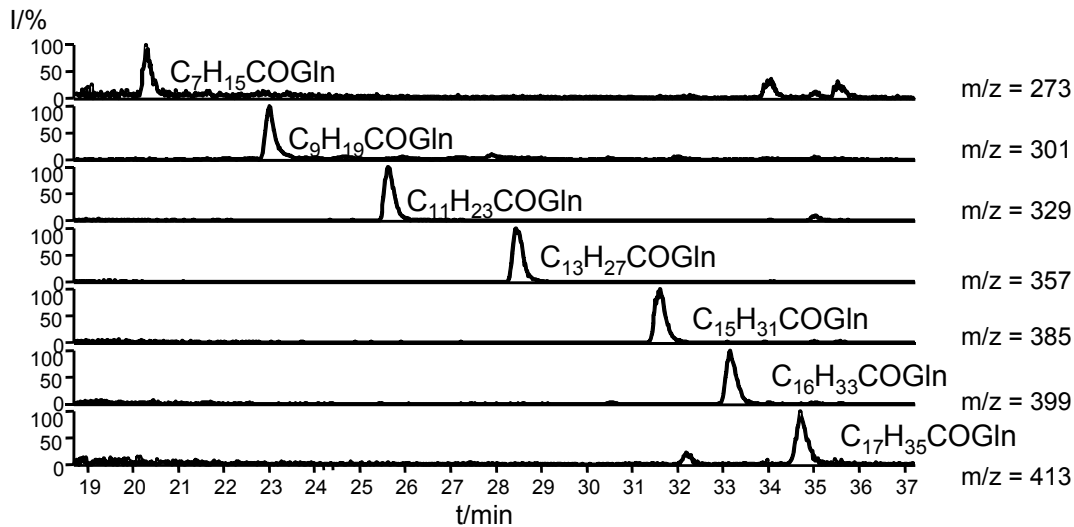


Abbildung 27: HPLC-MS^w Ionenspur von C-8 bis C-18 *N*-Acyl-glutaminen nach Verfütterung eines C-8 bis C-18 Fettsäuregemisches und Glutamin (**24**) an *Ochrobactrum* sp. aus dem Darm von *S. exigua*

^w HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

Nach diesem Versuch zu urteilen, werden gesättigte Fettsäuren der Kettenlänge C-8 bis C-18 mit gerader und ungerader Kohlenstoffanzahl mit Glutamin (**24**) konjugiert. Auch die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure (**3**) werden erwartungsgemäß als Substrate für die Bildung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten von den Bakterien akzeptiert.

Insgesamt beobachtet man bei den *in vitro* Inkubationen eine geringe Selektivität, da sowohl sehr viele Fettsäuren als auch die meisten natürlichen Aminosäuren von den untersuchten Mikroorganismen zu *N*-Acyl-aminosäuren konjugiert werden.

Zu klären bleibt, ob dies eine unspezifische Reaktion eines einzelnen Enzyms widerspiegelt oder ob viele spezifisch arbeitende Enzyme an der Vielfalt der Konjugatbildung beteiligt sind.

3.1.9.4 Steuerung der *N*-Acyl-L-glutamin Synthese durch die Raupe?

Im Regurgitat von *Spodoptera* und *H. virescens* Larven findet man ausschließlich Konjugate des Glutamins (**24**) mit verschiedenen Fettsäuren. Bei der Analyse der Substratselektivität der aus dem Darm von *S. exigua* Larven isolierten Mikroorganismen fiel hingegen auf, dass diese neben Glutamin (**24**) auch andere Aminosäuren aus dem Medium zu *N*-Acyl-aminosäuren umsetzen können (siehe Abbildung 24). Die Mikroorganismen produzieren *N*-Acyl-aminosäurekonjugate nur, wenn ihnen geeignete Substrate (Aminosäuren und Fettsäuren) aus der Umgebung bzw. aus dem Medium zur Verfügung stehen. Das Nährstoffangebot im Darm bestimmt demnach das Spektrum der Konjugate im Regurgitat (siehe 3.1.3).

Der Fettsäureanteil der *N*-Acyl-glutamine stammt direkt aus der Nahrung, wie bereits von Paré *et al.* durch Fraßexperimente an ¹³C-markierten Pflanzen bewiesen werden konnte.^[65] Die Aminosäurekomponente hingegen scheint von der Raupe zu stammen, da sie keine ¹³C-Markierung aufwies. Die Analyse der Aminosäuren im Regurgitat von *S. exigua* per GC-MS nach Derivatisierung mit MSTFA ergab, dass neben Glutamin (**24**) bzw. Glutamat kaum andere Aminosäuren im Regurgitat auffindbar sind.

Um zu untersuchen, ob Glutamin (**24**) von der Raupe in den Darm transportiert wird, wurde eine [²H₅]-L-Glutamin-Lösung ([²H₅]-**24**) in die Hämolymphe von *S. exigua* Larven injiziert. Nach 3 h bzw. 6 h wurde den Raupen Regurgitat abgenommen und mittels LC-MS untersucht, ob die *N*-Acyl-glutaminkonjugate markiertes L-Glutamin ([²H₅]-**24**) enthielten. [²H₅]-Glutamin ([²H₅]-**24**) wurde nach 6 Stunden bis zu 20 % in

Volicitin (**19**) und bis zu 39 % in *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) eingebaut. So findet man im APCI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) neben dem $[M+H]^+$ Ion $m/z = 407$ für natürliches *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) ein intensives $[M+H]^+$ Ion mit $m/z = 412$ für das um 5 Masseneinheiten schwerere *N*-Linolenoyl-L- $^{2}H_5$ -glutaminkonjugat ($^{2}H_5$ -**21**) (Abbildung 28).

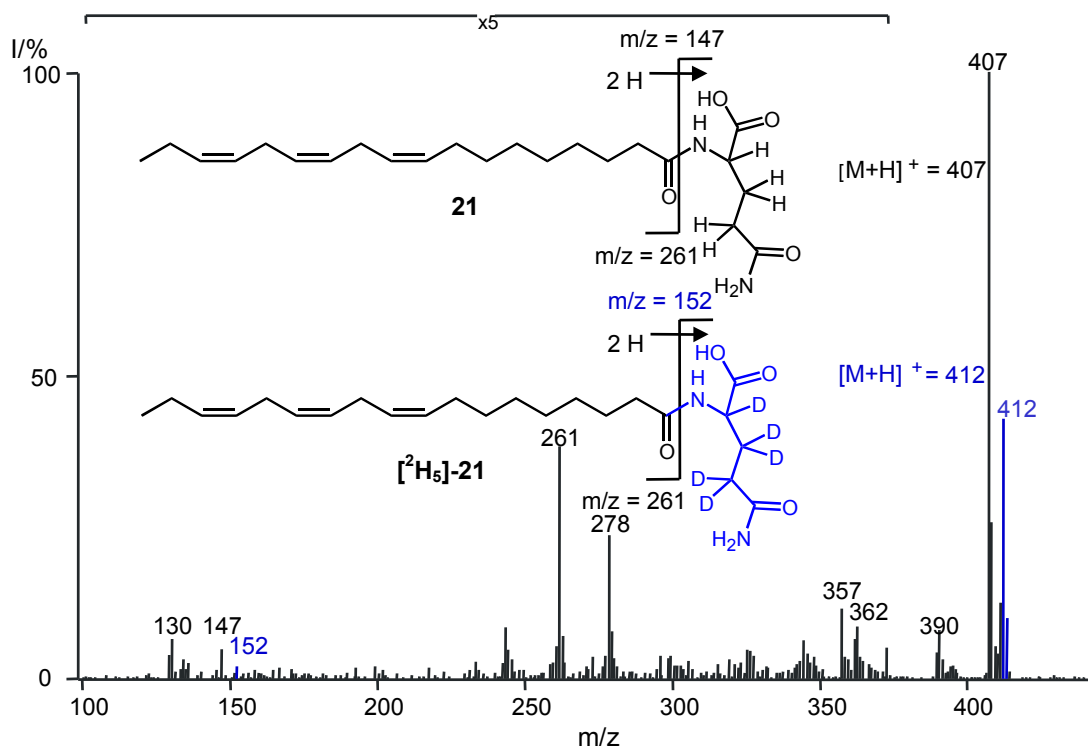


Abbildung 28: APCI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) und *N*-Linolenoyl-L- $^{2}H_5$ -glutamin ($^{2}H_5$ -**21**) nach Injektion von $^{2}H_5$ -L-Glutamin ($^{2}H_5$ -**24**) in die Hämolymphe von *S. exigua* Larven

Um festzustellen, ob diese Transportreaktion selektiv für L-Glutamin (**24**) /L-Glutamat ist, wurde *S. exigua* Larven auch eine ^{13}C -markierte Aminosäuremischung in die Hämolymphe injiziert und nach 3 bzw. 6 h das Regurgitat gesammelt. Wiederum wurde guter Einbau von markiertem L-Glutamin (**24**) in die *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate gefunden [11 % in Volicitin (**19**), 20 % in *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**). Andere ^{13}C -markierte Aminosäuren wurden nicht zu *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten umgesetzt. Zur Suche nach freien Aminosäuren wurde Regurgitat im Vakuum getrocknet, der Rückstand mit MSTFA derivatisiert und anschließend per GC-MS untersucht.^[154] Der Gehalt an freien Fettsäuren im Regurgitat erscheint im Vergleich zu Fettsäuren relativ gering zu sein. Glutamin bzw. Glutamat ließen sich

als häufigste im Regurgitat auftretende Aminosäuren nachweisen. Nach Injektion ^{13}C -markierter Aminosäuren in die Hämolymphe steigt der Gehalt an Aminosäuren an, neben Glutamin/Glutamat wurde insbesondere auch Serin als freie Aminosäure gefunden.

Nach diesen Experimenten zu urteilen, wird Glutamin (**24**)/Glutamat von den Raupen, möglicherweise durch einen aktiven Transport von der Hämolymphe in den Darm sezerniert und sehr schnell mit Fettsäuren zu *N*-Acyl-glutaminkonjugaten umgesetzt.

Ob die Raupe die Mikroorganismen direkt mit Glutamin (**24**) versorgt oder ob es sich um eine Ausscheidungsreaktion handelt, von der die Darmbakterien profitieren, wird sich wohl erst in Zukunft klären lassen, wenn solche Transportphänomene mit Hilfe von NMR-Imaging Techniken unter Einsatz fluormarkierter Verbindungen als molekulare Sonden im Detail studiert werden.

3.1.9.5 Versuche zur Anzucht mikroorganismenfreier *Spodoptera*

Larven

Darmbakterien von *Spodoptera* Larven sind in der Lage, *N*-Acyl-amino-säurekonjugate zu synthetisieren. Es stellt sich jedoch die Frage, ob *N*-Acyl-amino-säurekonjugate ausschließlich von den Mikroorganismen oder auch von Enzymen der Raupe hergestellt werden können.

Dies ließe sich mit Raupen untersuchen, die keine Mikroorganismen enthalten. Eine Möglichkeit, zur Gewinnung solcher axenischer Insekten ist die Behandlung mit Antibiotika, die die Mikroorganismen abtöten. Auf diese Weise konnte beispielsweise bei Fransenflüglern (*Frankliniella occidentalis*) mit Hilfe axenischer Individuen studiert werden, ob sie ihre Darmbakterien mit der Nahrung oder durch Transfer von der Mutter auf ihre Nachkommen erhalten.^[155]

3.1.9.5.1 Fraß von Lepidoptera Larven an mit Fosmidomycin behandelten

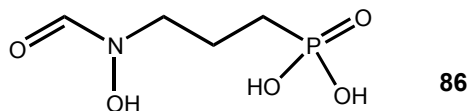
Bohnenblättern

Bei Versuchen, durch Gabe von konventionellen Antibiotika wie Chloramphenicol, Gentamycin und sogar Vancomycin die Produktion von Konjugaten einzudämmen, wurde in keinem Fall eine signifikante Reduktion der *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat gefunden. Grund dafür könnte sein, dass die üblicherweise verwendeten Schmetterlingslarven aus Eiern aufgezogen wurden, die freundlicherweise die Firma

BAYER regelmäßig zur Verfügung stellte. Als Labortiere werden die Raupen dort seit langer Zeit mit Antibiotikazusätzen (Gentamycin) in ihrer Kunstnahrung aufgezogen, so dass in erster Linie resistente Stämme im Darm der untersuchten Larven zu erwarten sind.

Ferner sind allein von den 26 aus dem Darm von Lepidoptera Larven isolierten Bakterienarten die meisten zur *N*-Acyl-aminosäurekonjugatbildung befähigt. Verschiedene Antibiotika mögen vielleicht einige Arten vernichten, sind gegen andere aber unwirksam. Durch die 16S-rRNA Analyse der isolierten Stämme wurde überdies deutlich, dass sich im Raupendarm viele Stämme befinden, wie *Providencia rettgeri* oder *Staphylococcus aureus*, die als multiresistente Pathogene bekannt sind.^[147] Daher erschien, wenn überhaupt, nur eine Behandlung von Raupen mit neuartigen Antibiotika aussichtsreich.

In unserer Arbeitsgruppe hat Andreas Jux Fosmidomycin (**86**) (Schema 26) synthetisiert,^[156] das erstmals vom Pharmakonzern Fujisawa aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde.^[157]



Schema 26: Struktur von Fosmidomycin (**86**)

Es ist ein potenter Inhibitor der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktisomerase,^[158-160] eines Schlüsselenzyms des Methyl-eritholphosphat- (MEP) Biosyntheseweges für Terpene. Viele Mikroorganismen verwenden genau diesen MEP-Weg, um Terpene herzustellen.^[159] Da manche Terpene für die Mikroorganismen essentiell sind, wirkt Fosmidomycin (**86**) somit stark antibiotisch. Im Gegensatz zu herkömmlichen Antibiotika, die oft die Zellwandbiosynthese^[161] unterbinden, hat Fosmidomycin (**86**) einen völlig anderen Wirkort. Demnach sollte Fosmidomycin (**86**) selbst gegen multiresistente Arten wirksam sein.

Für die Versuche wurden Limabohnen abgeschnitten und in eine wässrige Lösung von 0.05 mg/ml Fosmidomycin gestellt. Nach 1 tägiger Vorinkubation der Pflanzen ließ man *S. frugiperda* und *S. exigua* Larven an den Limabohnenblättern fressen. Täglich wurden Regurgitatproben gesammelt, mit einem Standard versetzt und per LC-MS analysiert. Nur bei *S. frugiperda* Larven konnten die *N*-Acylglutaminkonjugate im Regurgitat drastisch reduziert werden (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30). Für Volicitin (**19**) wurde im Durchschnitt eine Abnahme auf ca. 4 % im

Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) wurde im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich um den Faktor 6 reduziert. Volicitin (**19**) und *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) waren selbst nach mehrtägiger Fosmidomycinbehandlung immer noch per LC-MS nachweisbar.

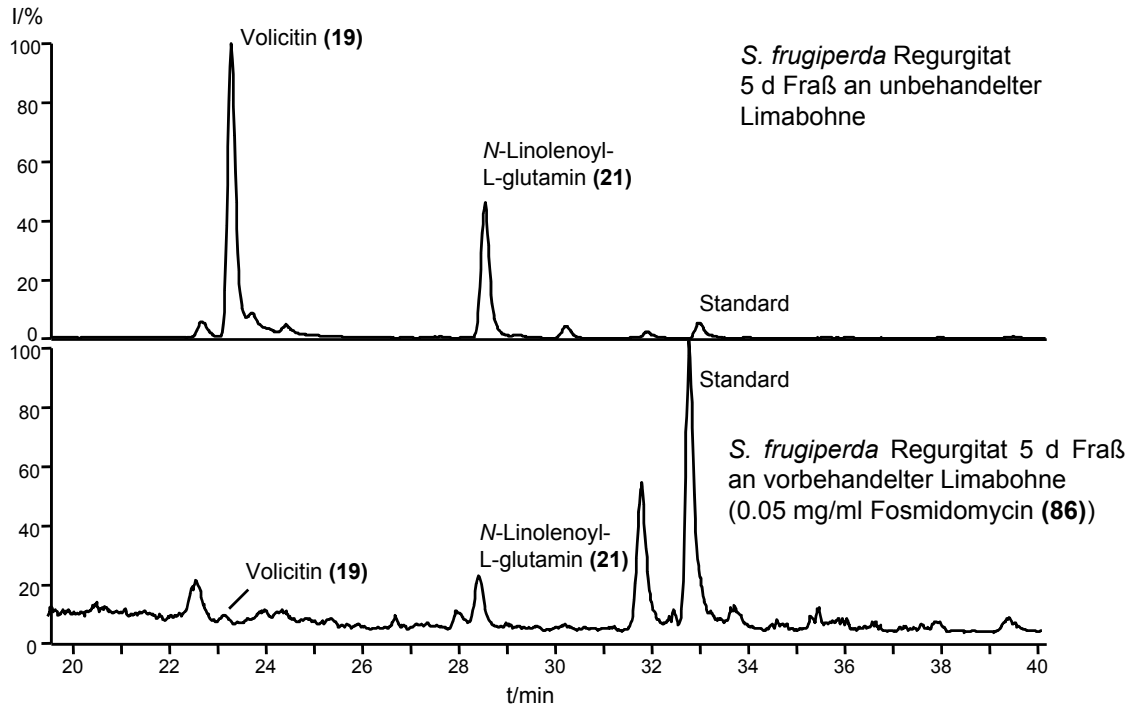


Abbildung 29: HPL-Chromatogramme^x von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten aus Regurgitat von *S. frugiperda*. 5 d Fraß an Bohnen, unbehandelt bzw. vorinkubiert mit 0.05 mg/ml Fosmidomycinlösung (**86**)

^x HPLC-Bedingungen: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

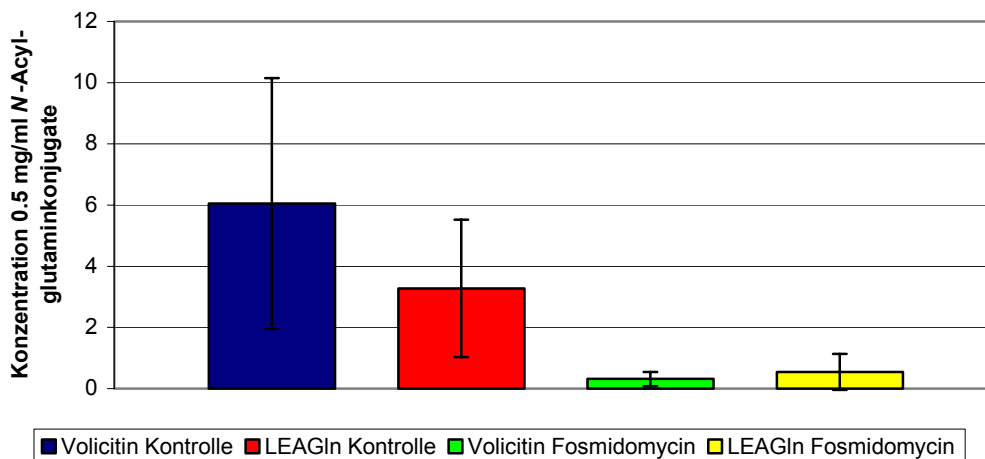


Abbildung 30: Reduktion von Volicitin (**19**) und *N*-Linolenoyl-L-glutamin (LEAGln) (**21**) im Regurgitat von *S. frugiperda* nach Fraß an unbehandelten bzw. mit Fosmidomycin (**86**) vorbehandelten Limabohnenblättern (Anzahl der Versuche n = 6)

Die deutliche Verringerung des Gehaltes an *N*-Acyl-glutaminen durch das Antibiotikum Fosmidomycin (**86**) lässt vermuten, dass die endosymbiontischen Darmbakterien zumindest als Hauptproduzenten dieser Verbindungen angesehen werden können. Allerdings konnte durch Fosmidomycin (**86**) keine Reduktion von *N*-Acyl-glutaminen bei *Spodoptera exigua* Larven festgestellt werden. Ein weiteres Problem liegt darin, dass besonders *S. littoralis* Larven manchmal beobachtet wird, dass sie keine *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat enthalten.^[162] Bisher konnte die Ursache für dieses „Verschwinden“ der Konjugate im Raupendarm nicht gefunden werden. Denkbar wäre, dass Mikroorganismen die Konjugate spalten, denn Mori *et al.* konnten im mittleren bzw. hinterem Darmbereich von *Heliothis virescens* Larven Amidaseaktivität nachweisen.^[163] Außerdem sind Acylamidasen von Mikroorganismen bekannt.^[164, 165]

Immerhin deutet eine starke Abnahme an Volicitin (**19**) bei der Behandlung mit Fosmidomycin (**86**) (Abbildung 29) darauf hin, dass dessen Hydroxylierung wahrscheinlich durch Mikroorganismen und nicht durch Enzyme der Raupe erfolgt.

3.1.9.5.2 Versuche zur Gewinnung von axenischen Larven

Trotz der deutlichen Reduktion der Konjugatbildung bei *S. frugiperda* Larven konnte durch die Antibiotikabehandlung nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob nicht doch auch

die Raupe neben ihren Darmbakterien in der Lage ist, *N*-Acyl-glutaminkonjugate zu produzieren.

Nach den Ergebnissen der Versuche, bei denen Raupen mit Fosmidomycin behandelt wurden, zeichnet sich ab, dass die Konjugatbildung drastisch reduziert, aber nicht unterbunden werden kann. Deshalb sollte durch Aufzucht steriler Raupen versucht werden, eindeutig zu klären, ob ausschließlich die Mikroorganismen über die biosynthetische Kompetenz zur Konjugatbildung im Raupendarm verfügen.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dillon von der Universität Bath in England sterile Insekten aufgezogen. Dr. Dillon gelang es bereits früher, axenische Heuschrecken (*Schistocerca gregaria*) aufzuziehen. Durch Vergleich steriler und normal aufgezogener Insekten konnte er zeigen, dass phenolische Stoffwechselprodukte von Darmbakterien dem Insekt als Aggregationspheromon dienen.^[166, 167]

Mikroorganismen werden von Insekten auf unterschiedliche Weise erworben. Im einfachsten Fall werden Mikroorganismen mit der Nahrung aufgenommen.^[168] Oft werden Mikroorganismen von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben, besonders dann, wenn die Bakterien eine enge Symbiose mit dem Insekt eingegangen sind. Häufig beobachtet man die Weitergabe von Mikroorganismen, indem die Adulten Eier mit ihren Fäzes und Haaren beschmieren.^[169] Beim Schlüpfen fressen die Larven die Eischale und Fäzes der Eltern, wobei sie die Mikroorganismen aufnehmen. Mikroorganismen können aber auch im Ei an die Nachkommen weitergegeben werden.^[170]

Beim Versuch, axenische *S. exigua* Larven zu erhalten, wurden ihre Eier mit Peressigsäure sterilisiert und in sterile Probenröhrchen überführt, in denen man die Raupen schlüpfen ließ. Die Larven wurden unter sterilen Bedingungen mit künstlicher Diät aufgezogen. Als Nahrung diente autoklavierte Kunstnahrung.

Im 3.- 4. Larvenstadium wurde von so aufgezogenen *S. exigua* Larven Regurgitat gesammelt, mit Methanol versetzt und zentrifugiert. Die Proben wurden sofort per LC-MS analysiert und mit einer Regurgitatprobe einer unter normalen Bedingungen aufgezogenen Kontrollgruppe verglichen. Der Zusatz von *N*-([²H]-Phenyl-dodecanoyl)L-glutamin (**84**) als Standard ermöglichte den quantitativen Vergleich der Proben. In zwei Versuchsreihen konnte bisher keine drastische Reduktion von *N*-Acyl-L-glutaminkonjugaten gefunden werden. Die Menge an Konjugaten nach Oberflächensterilisation der Eier war bei *S. exigua* Larven - abgesehen von einer

Ausnahme - im Vergleich zur Kontrollgruppe auf etwa 1/3 reduziert (siehe Abbildung 31).

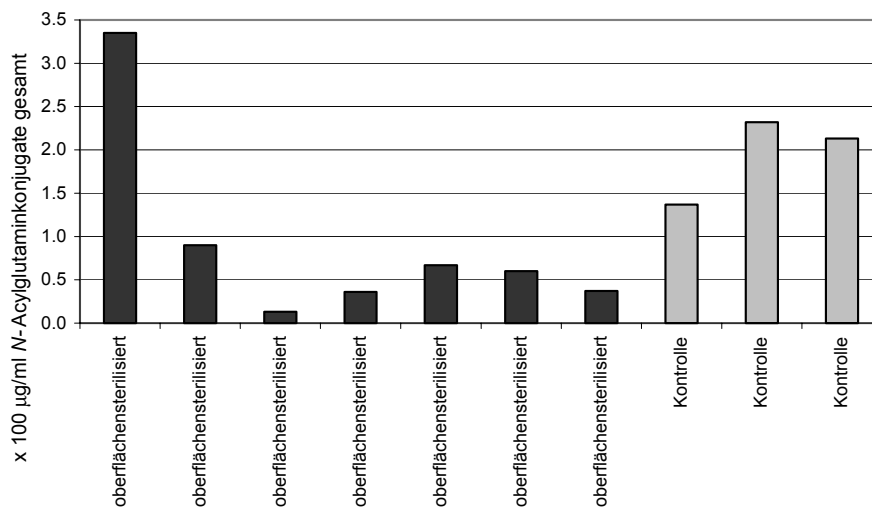


Abbildung 31: Vergleich der Menge von *N*-Acyl-L-glutaminkonjugaten^y im Regurgitat von *S. exigua* Larven nach Oberflächensterilisierung der Eier

Dieses vorläufige Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben:

Einerseits könnten die Raupen selbst in der Lage sein, *N*-Acyl-glutaminkonjugate zu synthetisieren. Andererseits wäre es möglich, dass die Oberflächensterilisation nicht erfolgreich ist oder sich Mikroorganismen im Ei befinden und dadurch vor der Oberflächensterilisation geschützt sind.

Da nur etwa 1 % aller Mikroorganismen kultivierbar sind,^[146] ist ein Nachweis der Sterilität der behandelten Raupen durch Ausplattierung des Darminhaltes nach Behandlung nicht aussagekräftig. Eine Klärung der biosynthetischen Kompetenz der Konjugatproduktion *in vivo* ist daher noch nicht abschließend möglich. Ähnliche Schwierigkeiten, die Synthese von Naturstoffen durch mikrobielle Produzenten zu beweisen, treten häufig auf. Besonders im Bereich der marinen Naturstoffe legen die Strukturen mancher Produkte oft einen mikrobiellen Ursprung nahe.^[171] Da die produzierenden Mikroorganismen aber nicht isolierbar bzw. unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind, gelingt der Nachweis der Produktion durch Mikroorganismen nur selten.

^y Dargestellt ist die Summe von Volicitin (**19**), *N*-(17-Hydroxylinoleoyl)-L-glutamin (**20**), *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**), *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**), *N*-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**) und *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**).

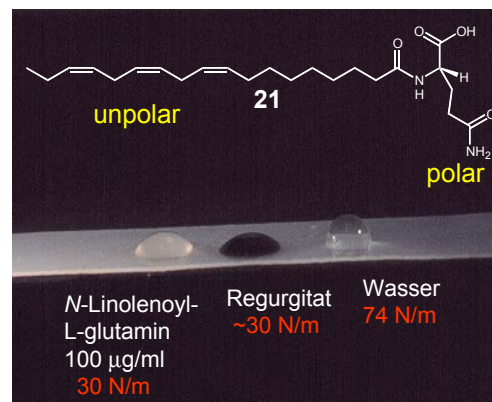
3.1.10 Bedeutung und Wirkmechanismus der *N*-Acyl-glutamin-konjugate

3.1.10.1 *N*-Acyl-L-glutamine als Tenside

N-Acyl-glutaminkonjugate sind amphiphile Verbindungen mit dem Glutaminrest als polarer Kopfgruppe und einer lipophilen Alkylkette, die vom Fettsäurerest stammt. Auf Grund ihrer Struktur sind *N*-Acyl-glutamine hervorragende Tenside (Tabelle 8). So weist eine Lösung mit 100 µg/ml *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) beispielsweise eine Oberflächenspannung von 30 N/m auf. In dieser Konzentration, die etwa der natürlichen Konzentration im Regurgitat entspricht, ist die kritische Micellbildungskonzentration (cmc) bei weitem überschritten, so dass die Konjugate im Regurgitat als Micellen auftreten (siehe Vergleich der Tropfenformen von Regurgitat, *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) (100 µg/ml) und Wasser, Tabelle 8). Die cmc des eng verwandten *N*-Stearoyl-L-alanins wird bei einer Konzentration von 30 µg/ml erreicht.^[172-174]

Tabelle 8: Oberflächenspannung einiger *N*-Acyl-L-aminosäuren

Konjugat	Oberflächenspannung	Konzentration
	mN/m	µg/ml
<i>N</i> -Oleoyl-L-glutamin	31	100
<i>N</i> -Oleoyl-L-glutamat	29	100
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin	30	200
	30	100
	31	10
	57	1
	61	0.1
Surfactin	30 (cmc)	9,7
Sodiumdodecylsulfat	34.9 (cmc)	1700
Wasser	74	



Damit zeichnen sich *N*-Acyl-glutaminkonjugate durch vergleichbar gute Tensideigenschaften wie Surfactin^[175] oder Glycolipide, z. B. von *Rhodococcus erythropolis* s631,^[176] aus. Eine eindrucksvolle Eigenschaft von Biotensiden, z. B. *N*-Acyl-serinen, ist ihre Fähigkeit, Hämolyse von Erythrozyten auszulösen.^[177] Eine solche Reaktion setzt eine intensive Wechselwirkung (Destabilisierung) mit der umhüllenden Membran voraus. Wahrscheinlich lösen daher *N*-Acyl-L-glutamine bzw. tensidische Verbindungen bei Kontakt mit Pflanzenmembranen Abwehrreaktionen aus (siehe

Kapitel 3.1.10.4), indem sie das Membranpotential verändern. Außerdem bewirken Tenside eine Veränderung der Blattoberflächen. So konnten Bunster *et al.* zeigen, dass oberflächenaktive Verbindungen von Mikroorganismen die Benetzbarkeit von Blättern herabsetzen.^[178] Biotenside helfen demnach Mikroorganismen, eine Pflanze oder generell Oberflächen zu besiedeln.^[179]

Bezeichnenderweise finden *N*-Acyl-aminosäurekonjugate wegen ihrer hervorragenden Tensideigenschaften bei der Herstellung von Kosmetikprodukten Verwendung.^[180]

3.1.10.2 Bedeutung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten für Lepidoptera

Larven

Im Darm von Insekten wirken *N*-Acyl-glutamine als Emulgatoren von Fett, das die Raupe beim Fressen aufnimmt. Dadurch erleichtern die *N*-Acyl-glutaminkonjugate die Aufnahme von Lipiden aus dem Darm der Raupe in die Hämolymphe. Davon profitiert die Raupe, da so die Nahrung besser verwertet werden kann. Insekten sind nämlich nicht in der Lage, Gallensäuren zu produzieren,^[181] die bei Säugetieren als Emulgatoren der Nahrungsfette dienen.

Bei der Untersuchung des Darminhaltes von Arthropoden wie Spinnen, Grillen und Krebsen fanden bereits 1974 Collatz und Mommsen^[72] Verbindungen, die den Arthropoden als Emulgatoren dienen könnten. Aus Abbaureaktionen dieser Verbindungen schlossen sie auf einen Fettsäure- und Aminosäureanteil. Durch eine Analyse des Vorderdarminhaltes von *Gryllus bimaculatus* per LC-MS konnte ich *N*-Acyl-glutamate nachweisen, die zu den *N*-Acyl-glutaminkonjugaten aus dem Regurgitat von *Spodoptera* Larven eng verwandt sind.

N-Acyl-glutaminkonjugate bieten Raupen einen gewissen Schutz vor Feinden: Die Larven reagieren bei Gefahr mit dem Hervorwürgen von Regurgitat. Durch den hohen Anteil der *N*-Acyl-glutaminkonjugate (100 µg/ml) im Regurgitat werden die Raupen sehr schlüpfzig und könnten auf diese Weise Fraßfeinden entgleiten. Interessanterweise findet man in Verteidigungshärchen von *Pieris rapae* Larven, die keine *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate im Regurgitat haben, Mayolene (**72**) (siehe Schema 20), die ebenfalls Tensideigenschaften aufweisen.^[129]

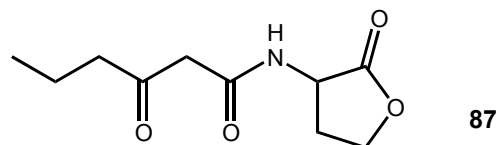
3.1.10.3 Bedeutung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten für Mikroorganismen

Biotenside spielen für ihre mikrobiellen Produzenten bei verschiedenen Prozessen eine wichtige Rolle: bei der Aufnahme lipophiler Verbindungen, der Bindung von Schwermetallen, der Pathogenese und der Aggregation zu Biofilmen.^[179] Daher könnten *N*-Acyl-glutamine für die mikrobiellen Produzenten vielleicht gerade in der besonderen Umgebung eines Raupendarmes (pH 10) von Bedeutung sein.

Desweiteren weisen Biotenside antibakterielle Eigenschaften auf. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jon Clardy wurde kürzlich aus Bodenproben DNA isoliert und in *E. coli* exprimiert. Bei diesem Screening wurde ein Enzym gefunden, das langkettige *N*-Acyl-tyrosinkonjugate produziert, die antibiotische Aktivität zeigten.^[153]

Außerdem weisen *N*-Acyl-aminosäurekonjugate entfernte Verwandtschaft zu Acyl-homoserinlactonen auf.^[182-184] Diese spielen eine entscheidende Rolle als Kommunikationsmoleküle von Mikroorganismen (Quorum sensing). *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton (**87**) (siehe Schema 27) induziert Aggregation von Mikroorganismen zu Biofilmen und auch die Produktion von Biotensiden wie sie *N*-Acyl-L-glutamine darstellen.^[179]

Erst durch die damit verbundenen Prozesse erlangen Mikroorganismen pathogene Eigenschaften. Indirekt ist damit *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton (**87**) für die Pathogenität von *Erwinia carotovora* verantwortlich.^[185]



Schema 27: *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton (**87**)

Transgene Pflanzen, die Homoserinlactone produzieren und auf diese Weise die Kommunikation von *Erwinia carotovora* stören, zeigten erhöhte Resistenz gegen das Pflanzenpathogen.^[186]

3.1.10.4 Bedeutung der *N*-Acyl-glutaminkonjugate als Elicitoren

Alborn *et al.* fanden, dass Volicitin (**19**) bei Maispflanzen die Produktion von Duftstoffen auslöst.^[61] Genetische Untersuchungen zur Wirkung von Volicitin (**19**) beweisen, dass es sowohl die Indolbiosynthese^[62] als auch Terpensynthesen^[63] aktiviert. Halitschke *et al.* konnten für *M. sexta* Larven zeigen, dass *N*-Acyl-glutamate

essentiell für die Induktion der Duftstoffproduktion bei Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) sind:^[67] Sie entfernten aus dem Regurgitat von *M. sexta* Larven die Konjugate durch Ionenaustauschchromatographie und fanden, dass so behandeltes Regurgitat keine Duftstoffproduktion auslöst. Setzt man hingegen einen synthetischen Konjugatmix zu, so beobachtet man die Bildung von Duftstoffen. Landolt *et al.* konnten zeigen, dass mit Volicitin (**19**) induzierte Kartoffelpflanzen (*Ipomea batata*) auf Kartoffelkäferweibchen attraktiv wirken.^[187]

Bei Untersuchungen, ob Volicitin (**19**) die Duftstoffproduktion bei der Limabohne auslöst, wurde in unserer Arbeitsgruppe keine Bildung von Duftstoffen beobachtet.^[64, 90] Bei der Limabohne wurde allerdings nach Applikation von Volicitin (**19**) ein Anstieg des endogenen Salicylatspiegels gefunden.^[64] Da Salicylsäure (**8**) die Jasmonsäurebiosynthese hemmt,^[69] mag das eine Ursache für das Ausbleiben der Bildung von Duftstoffen bei der Limabohne sein. Bei Behandlung der Limabohne mit *N*-Linolenoyl-L-isoleucinkonjugaten wurde ein Anstieg der Ethylenproduktion (einer pflanzlichen Abwehrreaktion) festgestellt.^[100] Bei analogen Versuchen mit dem *N*-Linolenoyl-L-glutaminkonjugat (**21**) in einer Konzentration von 100 µg/ml wurde ein derartiger Anstieg der Ethylenproduktion jedoch nicht beobachtet.

Außerdem gibt es Raupen wie beispielsweise *Pieris brassicae*, die in ihrem Darm keine *N*-Acyl-aminosäurekonjugate enthalten. Da diese Raupen bei Fraß die Freisetzung von Duftstoffen auslösen,^[188] können Volicitin (**19**) und verwandte *N*-Acyl-glutaminkonjugate nicht als generelle Elicitoren für die Duftinduktion bei Pflanzen angesehen werden. Weiterhin belegen Versuche an verschiedenen Maisvarietäten, dass bei Raupenfraß in sehr schwankendem Ausmaß die *de novo* Duftstoffbiosynthese induziert wird.^[189] In diesem Zusammenhang spielen wohl auch die Lichtverhältnisse bei den Versuchen eine wichtige Rolle. Untersuchungen von Dr. Jörg Degenhart ergaben, dass nur bei intensivem Licht Mais bei Herbivorenbefall mit starker Produktion von Duftstoffen beginnt. Christiane Schnee (Abteilung Prof. Dr. Gershenzon, MPI für chemische Ökologie) konnte an Maispflanzen mit unseren synthetischen *N*-Acyl-glutaminkonjugaten Volicitin (**19**), *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) und *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**) keine signifikanten Unterschiede der Duftproduktion im Vergleich zu mechanischer Verwundung finden.

Auch wenn ihre Wirkung als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese umstritten ist, könnten *N*-Acyl-L-glutamine dennoch an der Auslösung von Signalkaskaden und Abwehrreaktionen bei Pflanzen beteiligt sein. Eine japanische Studie aus dem Jahr

1973 belegt, dass *N*-Acyl-aminosäurekonjugate einen positiven Effekt auf Reispflanzen haben und gegen die rice blast disease wirken.[Shida, 1973 #1035]

Als Tenside sind *N*-Acyl-aminosäurekonjugate in der Lage, die Eigenschaften von Membranen zu verändern, was zu Potentialänderungen der Membran führt, wodurch wiederum Signalprozesse ausgelöst werden.

Dieser Gedanke lässt sich durch elektrophysiologische Untersuchungen untermauern. Ein einfacher Test auf membranaktive Verbindungen ist der sog. Black-Lipid-Membrane Assay.^[190] Dazu misst man Stromflüsse in einer mit einem kleinen Loch verbundenen Doppelkammerküvette. In die beiden Kammern taucht je eine Elektrode ein. Die Elektroden sind an einen hochempfindlichen Verstärker angeschlossen. Das Loch wird mit einer Lipidmonoschicht verschlossen. In eine der Kammern der Küvette appliziert man die zu testende Substanz. Wenn eine aktive Substanz in die Lipidschicht einbaut, beobachtet man eine Veränderung der Leitfähigkeit der Membran. Bei Ionenkanalbildnern stellt man am Oszilloskop sogenannte Kanalöffnungsereignisse fest (Abbildung 32). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ionenkanalbildner als Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen wirken.^[58, 191]

Frisch abgenommenes Regurgitat von Lepidopteren ist im Black-Lipid-Membrane Assay ebenfalls aktiv.^[162] Man beobachtet für Kanalöffnungsereignisse typische Reaktionen (siehe Abbildung 32). Im Regurgitat sind demnach Komponenten enthalten, die durch Wechselwirkung mit Membranen Ionenflüsse beeinflussen und dadurch wohl als Elicitoren wirken.

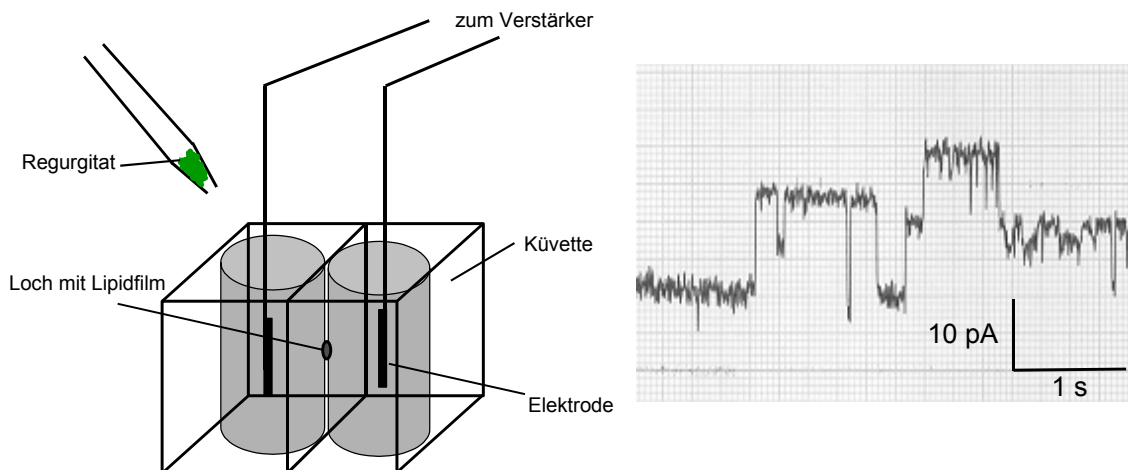


Abbildung 32: Black Lipid Membrane Assay: 2 μ l Regurgitat von *S. littoralis*, Bilayer PC, Spannung: - 80 mV, Küvettengröße ca. 1.5 ml

Weitere elektrophysiologische Untersuchungen an Limabohnenblättern in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Massimo Maffei und Simone Bossi (Universität Turin) ergaben, dass die Applikation von Volicitin (**19**) in niedrigen Konzentrationen Hyperpolarisation (10-20 ppm) und in höheren Konzentrationen Depolarisation (50 ppm) der Blattmembranen zur Folge hat. Mit *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten, aber auch mit Linolensäure (**3**) und Glutamin (**24**), wurde ebenfalls Hyperpolarisation bzw. Depolarisation in Abhängigkeit von ihrer Konzentration festgestellt. Membrandepolarisation wiederum führt zu rascher Signalweiterleitung und löst so möglicherweise die Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen aus.

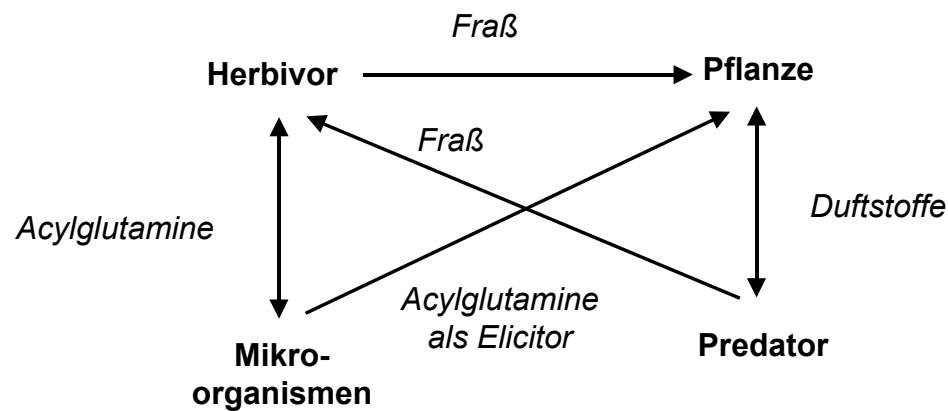
Insgesamt betrachtet, kann es sich jedoch bei den *N*-Acyl-glutaminkonjugaten nicht um allgemein wirksame Elicitoren pflanzlicher Duftstoffproduktion handeln, da sie nur bei bestimmten Maisarten und Tabakpflanzen als Elicitoren zu wirken scheinen. Andere Komponenten aus dem Regurgitat, z. B. Zellwand angreifende Enzyme spielen bei der Auslösung der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese nach Raupenfraß mit Sicherheit eine ähnlich wichtige Rolle. So wirken beispielsweise Cellulasen aus dem Extrakt Cellulysin des Pilzes *Trichoderma viride* als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese bei der Limabohne.^[192] Andererseits sorgen Enzyme in den Salivarsekreten von Herbivoren dafür, dass die Wirkung pflanzlicher Signalmoleküle vermindert wird. Musser *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass durch Enzyme im Salivarsekret von *Helicoverpa zea* der Nicotingehalt von induzierten Tabakblättern reduziert wird.^[70]

3.1.10.5 Symbiose – multitrophisches System

Nach den bisherigen Versuchsergebnissen werden *N*-Acyl-L-glutamine von Darmbakterien je nach Substratangebot durch die Raupe synthetisiert. Eine solche unkonventionelle Arbeitsteilung zwischen Raupe und Mikroorganismus bei der Synthese einer chemischen Verbindung spricht für eine enge Symbiose zwischen Darmbakterien und Raupe. Einerseits könnte die Raupe von den endosymbiontischen Darmbakterien profitieren, indem ihr *N*-Acyl-glutaminkonjugate als Emulgatoren zur Verfügung stehen, andererseits versorgt die Raupe ihre Darmbakterien mit Lebensraum und Nährstoffen. Da im Raupendarm extrem basische pH-Werte herrschen, stellt dieser möglicherweise eine Nische für anpassungsfähige oder spezialisierte Mikroorganismen dar. *N*-Acyl-L-glutaminkonjugate sind zumindest bei einigen Pflanzen als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese

wirksam.^[61-63, 67] Die Darmbakterien „verraten“ daher auf indirekte Weise die Raupe an Fraßfeinde, wie z. B. Schlupfwespen, die von induzierten Duftstoffen angelockt werden.

Bisher hat man zumeist ein sog. tritrophisches System verwendet,^[193] um Wechselbeziehungen zwischen einem Herbivor, Predator und einer Futterpflanze zu beschreiben: Ein Herbivor, z. B. eine Raupe, frisst an einer Pflanze. Die Pflanze reagiert darauf mit Abwehrreaktionen, unter anderem mit der Produktion von Duftstoffen. Die Duftwolke, der „Hilferuf der Pflanze“, lockt dann Predatoren an, die die Raupe vernichten oder schädigen (siehe Schema 28).



Schema 28: Multitrophische Wechselwirkungen: Herbivor (Raupe), Pflanze, Predator (Fraßfeind), Mikroorganismen

Darmbakterien der Raupe werden sicherlich noch weit vielfältigere Bedeutung für die Raupe haben. So ist von Mikroorganismen gut bekannt, dass sie über höchst effiziente Detoxifizierungsmechanismen verfügen.^[194] Eine polyphage Raupe könnte sich dieses Potential ihrer Darmbakterien zu Nutze machen, um der Wirkung pflanzlicher Toxine zu begegnen. Andererseits konkurrieren Mikroorganismen im Darm um Lebensraum und Nährstoffe durch Produktion von Giftstoffen, die auch die Raupe schädigen könnten.

Bei genauerem Hinsehen stellt sich die Natur viel komplexer und vielfältiger dar, als dass diese Zusammenhänge durch ein tritrophisches System beschrieben werden könnten. Die Wechselbeziehungen zwischen Futterpflanze, Herbivor und Predator sind daher auf im Darm der Herbivoren lebende Mikroorganismen auszudehnen, wie dies in Schema 28 dargestellt ist.

Ein vergleichbar komplexes System ist die bei weitem besser verstandene mutualistische Symbiose zwischen Ameisen (*Acromyrmex* und *Atta*) und einem Pilz aus der Familie der Lepiotaceae: Die Ameisen kultivieren Pilzgärten, von denen sie sich ernähren. Erst kürzlich konnten Currie *et al.* zeigen, dass auch hier Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen. So droht dem Pilz Gefahr durch einen parasitischen pathogenen Pilzbefall der Art *Escovopsis*.^[195] Um ihren Pilz zu schützen, tragen die Ameisen an ihrem Unterkörper Streptomyceten. Diese Bakterien produzieren ein Antibiotikum, das spezifisch gegen *Escovopsis*, das auf die Pilzgärten der Ameisen spezialisierte Pathogen, wirkt.^[196]

3.1.11 Weitere Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen

3.1.11.1 Einfluss des pH Wertes von Regurgitat

Im Vorder- und Mitteldarm von *Spodoptera* und *Heliothis virescens* Raupen herrscht ein basischer pH von etwa 10.^[197] Bei der Nahrungsaufnahme kommt Regurgitat der Raupen mit der Fraßstelle an der Pflanzenoberfläche in Kontakt. Die Verwundungsstelle ist daher auch den extrem basischen Bedingungen ausgesetzt. Starke Schwankungen im pH könnten dazu führen, dass Ionenhaushalte gestört oder Membranlipide durch Hydrolyse zerstört werden, was Signalprozesse auslöst. Somit könnte der basische pH des Raupendarms möglicherweise an der Auslösung pflanzlicher Verteidigungsreaktionen wie der Produktion von Duftstoffen beteiligt sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden abgeschnittene Limabohnen mit 1-5 %-igen NaOH- bzw. KOH-Lösungen inkubiert und auf die Bildung von Duftstoffen untersucht. Es zeigte sich, dass die Bohnenpflanzen auf die Applikation von Basen mit der Bildung von Duftstoffen reagieren (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34).

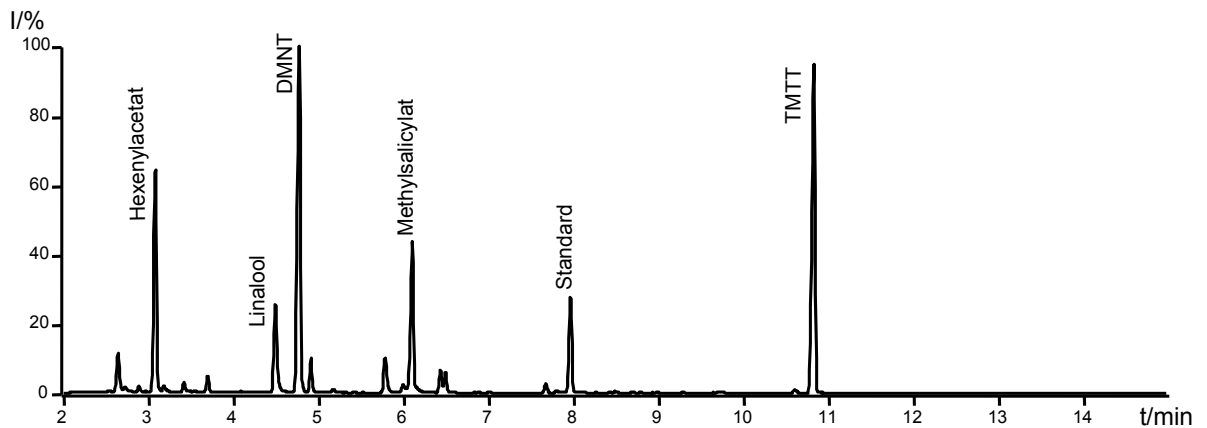


Abbildung 33: Gaschromatogramm^z der flüchtigen Verbindungen, die von einer Limabohne nach 24-stündiger Inkubationzeit mit 3 %-iger NaOH-Lösung abgegeben werden

^z Sammlung der Duftstoffe durch „closed loop stripping“ an Kohlefilter;^[46] GC-MS Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml/min, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, 10°C/min 200°C, 30 °C/min 280 °C 1 min; Injektortemperatur 220 °C; Split: 1:10

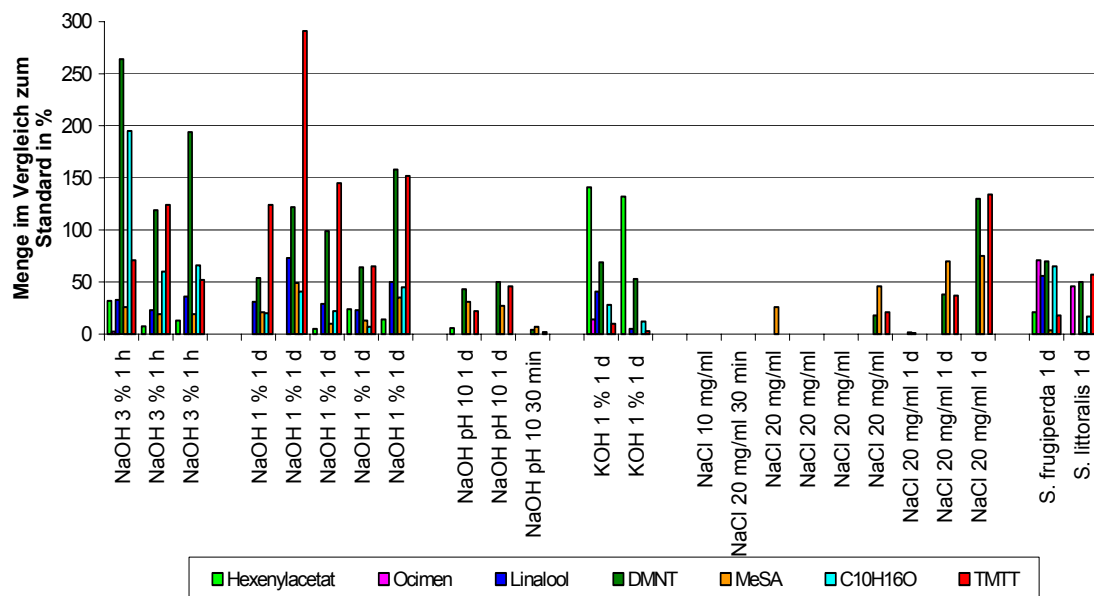


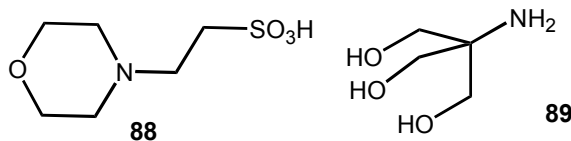
Abbildung 34: Produktion von Hexenylacetat (**16**), Linalool (**10**), Ocimen (**9**), DMNT (**11**), MeSA (**13**) und TMTT (**12**) abgeschnittener Limabohnenpflanzen nach Inkubation mit NaOH, KOH und NaCl-Lösungen und Vergleich zu Duftstoffproduktion der Limabohne nach Fraß von *S. frugiperda* und *S. littoralis* Larven^{aa}

Das Gaschromatogramm der Duftstoffe wird von den Homoterpenen DMNT (**11**) und TMTT (**12**) sowie von Methylsalicylat (**13**) dominiert. Man findet jedoch auch weitere für das Duftspektrum der Limabohne nach Raupenfraß typische Verbindungen wie Hexenylacetat (**16**) und Linalool (**10**).

Bei Inkubation der Limabohne mit einer NaCl-Lösung (20 mg/ml) wurde seltener und in geringerem Ausmaß die Bildung flüchtiger Stoffe induziert. Dies kann als ein Hinweis gedeutet werden, dass der basische pH mehr, als der durch Natrium- oder Kaliumionen ausgelöste Salzstress^{[198] [199]} die Duftstoffbiosynthese induziert.

^{aa} Da teilweise starke Schwankungen bei den Versuchen auftreten und für eine statistische Auswertung die Datenmenge zu klein ist, sind die individuellen Versuche aufgetragen.

Elektrophysiologische Versuche mit Mes (**88**) - und Tris (**89**) -Pufferlösungen (50 mM) (siehe Schema 29) bei pH 6, 7, 8, 9, 10 und 11 durch Simone Bossi ergaben, dass eine Änderung des pH-Wertes bei pH 8 bis 9 Membrandepolarisation auslöst und anschließend bei pH 10 Hyperpolarisation eintritt.



Schema 29: Strukturen von *N*-(2-Morpholino)-ethansulfonsäure (**88**) (Mes) und *tris*-Hydroxymethyl-aminomethan (**89**) (Tris)

Erste parallele Versuche zur Duftemission, die durch Pufferlösungen bei der Limabohne ausgelöst wird, zeigen, dass sowohl Mes- als auch Tris-Puffer bei der Limabohne die Freisetzung der beiden Homoterpene DMNT (**11**), TMTT (**12**) und von Methylsalicylat (**13**) induzieren. Neben einem Einfluss des pH Wertes auf die Bildung von Duftstoffen wurde auch untersucht, ob sich eine Abhängigkeit von der Pufferkonzentration beobachten lässt.

Im Falle des Mes-Puffers (**88**) wurde keine deutliche pH-Abhängigkeit der Induktion der Duftstoffbiosynthese festgestellt. Außerdem wurden nach Applikation verschiedener Konzentrationen (5 mM und 50 mM) von den untersuchten Lima-bohnen vergleichbare Mengen an DMNT (**11**), TMTT (**12**) und Methylsalicylat (**13**) gebildet (siehe Abbildung 35).

Bei den Versuchen mit Tris-Puffer hingegen findet man bei niedriger Pufferkonzentration (5 mM) nur geringe Mengen an Duftstoffen. Beim 5 mM Tris-Puffer beobachtete man bei pH 11 ein Maximum der Duftstoffproduktion. Dagegen findet man bei 50 mM Tris-Puffer Konzentration bei allen untersuchten pH-Werten (pH = 6, 7, 9, 11) sehr hohe Mengen an DMNT (**11**), TMTT (**12**) und Methylsalicylat (**13**) (siehe Abbildung 36). Im Vergleich zu der Menge an Duftstoffen, die nach Raupenfraß von Limabohnen freigesetzt werden, beobachtet man bei den Pufferlösungen mit DMNT(**11**), TMTT(**12**) und Methylsalicylat (**13**) allerdings nur ein reduziertes Duftspektrum. Es werden jedoch bei hohen Pufferkonzentrationen wesentlich größere Mengen dieser Duftstoffe im Vergleich zur Duftproduktion nach Raupenfraß gebildet.

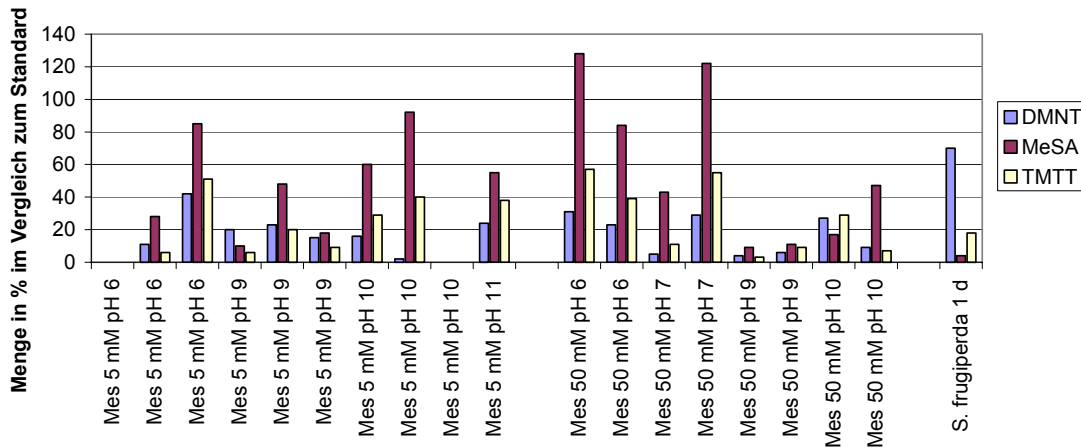


Abbildung 35: Duftstoffe nach Inkubation abgeschnittener Limabohnen mit Mesopufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten^{bb}

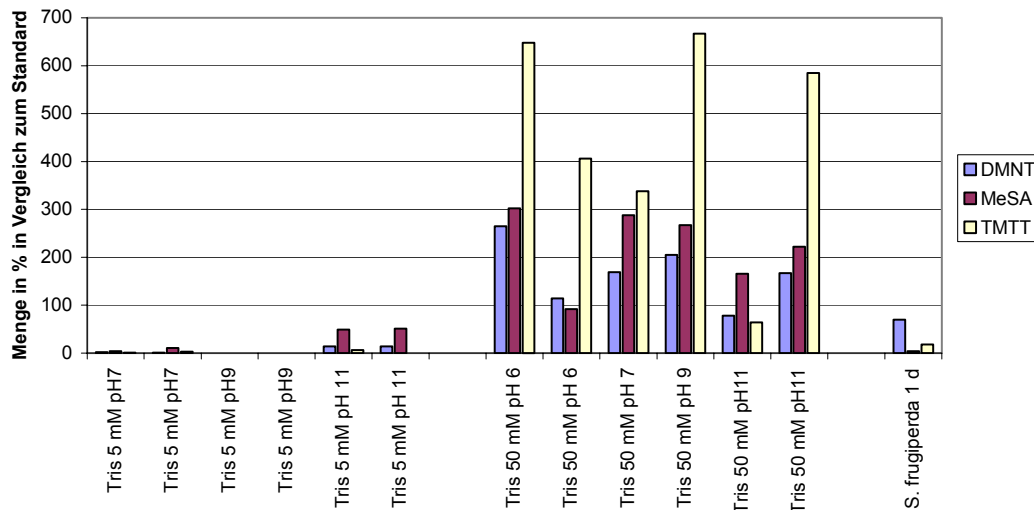


Abbildung 36: Bildung von Duftstoffen nach Inkubation abgeschnittener Limabohnen mit Tris-Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten^{bb}

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die pflanzliche Duftstoffbiosynthese nicht notwendigerweise über die Erkennung eines Elicitors durch einen Rezeptor ausgelöst wird. Vielmehr scheinen Moleküle mit passenden physikalischen Eigenschaften - möglicherweise durch Wechselwirkung mit pflanzlichen Zellmembranen -

^{bb} Da für eine statistische Auswertung die Datenmenge zu klein ist, sind die Einzelversuche aufgetragen.

an der Auslösung der Biosynthese von flüchtigen Stoffen als Verteidigungsreaktion eine wichtige Rolle zu spielen.

Allerdings lagen die bisher verwendeten NaOH und KOH Konzentrationen wohl deutlich über dem pH Bereich im Regurgitat von Raupen. Deswegen wurde auch eine wesentlich größere Menge an Duftstoffen als bei Raupenfraß gefunden. Erste Versuche mit weniger konzentrierten Basen zeigen, dass dann in weit geringerem Umfang und weit weniger gut reproduzierbar die Duftstoffbiosynthese bei der Limabohne induziert wird. In diesem Zusammenhang könnte die Applikationsweise in den gezeigten Versuchen über den Transpirationsstrom oder direkt in verletzte Zellen des Blattes von großer Bedeutung sein.

3.1.11.2 Einfluss des BHI-Mediums auf die Duftstoffproduktion

26 Mikroorganismen konnten aus dem Vorderdarm von *S. exigua* Larven isoliert und bestimmt werden (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4). Regurgitat enthält membranaktive Verbindungen (siehe 3.1.10.4). Unter anderem werden von Mikroorganismen Ionophore produziert, die ähnlich wie Alamethicin^[58] aus *Trichoderma viride*, die Duftstoffbiosynthese bei Pflanzen induzieren könnten. Daher stellt sich die Frage, ob Mikroorganismen aus dem Raupendarm in der Lage sind, bei der Limabohne die Biosynthese von Duftstoffen auszulösen.

Erste Versuche zur Klärung dieser Frage ergaben, dass das zur Aufzucht der Organismen verwendete BHI-Medium bei der Limabohne Duftstoffproduktion induziert. BHI-Medium ist ein Komplexmedium, das aus Rinderherz und Rinderhirn gewonnen wird. Die Duft auslösende Komponente ist stabil beim Autoklavieren. Nach Inkubation einer Limabohne für 1 d mit BHI-Medium erhält man ein Duftspektrum, das dem nach Applikation des Ionophoren Alamethicin^[58] ähnlich ist.

Um den Einfluss von Mikroorganismen auf die Induktion der Biosynthese von Duftstoffen bei Pflanzen untersuchen zu können, müsste daher ein Minimalmedium eingesetzt werden, das nicht selbst die Duftstoffsynthese induziert.

3.2 8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäure, ein Alkaloid im Regurgitat von *Spodoptera* Larven

Bei der Analyse von LC-MS Chromatogrammen von Regurgitat von Lepidopteren beobachtete ich kurz vor Elution des Volicitins bei 19.3 min einen weiteren Peak, der sich durch eine intensive UV Absorption bei 258 nm auszeichnete. Als $[M+H]^+$ -Ion konnte für diese Verbindung (**90**) ein Ion $m/z = 190$ erkannt werden. Ein intensives Ion bei $m/z = 162$, das den Verlust von 28 amu anzeigt, spricht für die Gegenwart einer Carbonylgruppe. Nach Sammeln der Verbindung und Derivatisierung mit CH_2N_2 erhielt man im GC-MS ein Spektrum mit $m/z = 203$ als Molekülion, wie nach Methylierung einer Carboxylgruppe zu erwarten war. Das ungeradzahlige Molekülion $m/z = 203$ zeigt die Gegenwart eines Stickstoffatoms im Molekül an. Der Verlust eines 32 amu schweren Fragmentes (MeOH) führt zum Ion $m/z = 171$. Das Basision $m/z = 143$ wird durch den folgenden Verlust von CO gebildet. Das Auftreten dieser Ionen bestätigt das Vorliegen eines Methylesters. Das Basision $m/z = 143$ zerfällt weiter unter Verlust eines CO-Moleküls (28 amu) und offensichtlich eines CN-Radikals.

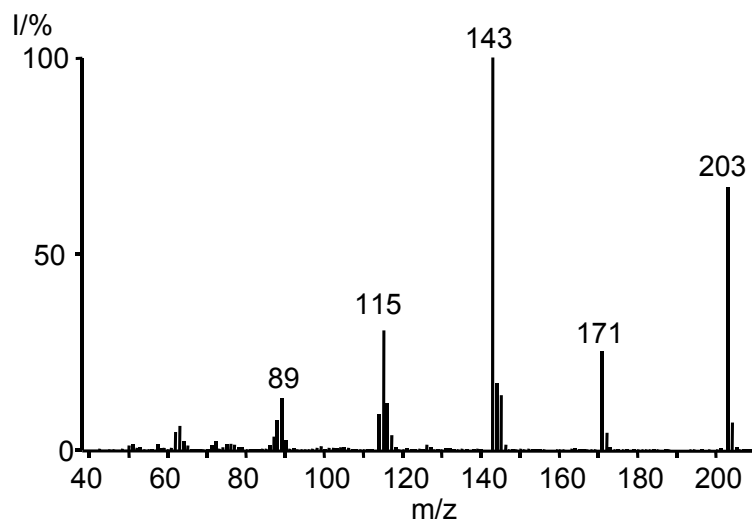
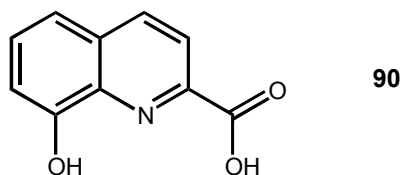


Abbildung 37: EI-Massenspektrum des Methylesters von 8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäure (**90**)

Als mögliche Summenformel für den Methylester der Verbindung **90** wurde $C_{11}H_9NO_3$ ermittelt. Demnach sollte die Verbindung acht Doppelbindungsäquivalente besitzen. Aus dem Massenspektrum und dem UV Spektrum lässt sich schließen,

dass die ursprüngliche Säure ein Heterocyclus mit einer Carboxylgruppe und einem Sauerstoffsubstituenten ist. Aufgrund dieser Daten wurde nach Vergleichsspektren von Indol-, Chinolin- und Isochinolinderivaten gesucht.^[200-203]

Der Vergleich der Peakintensitäten mit Referenzspektren ergab, dass das Massenspektrum am besten mit 8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäuremethylester übereinstimmte. Die Aufnahme eines Massenspektrums sowie Retentionszeitvergleich einer methylierten käuflichen 8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäure (**90**) bestätigte diese Hypothese.



Schema 30: Struktur von 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**90**) aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven

8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäure (**90**) (siehe Schema 30) wurde bereits 1969 von Schildknecht *et al.* aus dem Wehrsekret von Schwimmkäfern (*Ilybius fenestratus*) isoliert.^[203] Das verwandte 8-Hydroxychinolin ist ein ausgezeichneter Chelator für bivalente Ionen.^[204] Deshalb wird die Verbindung zur quantitativen Analyse beispielsweise von Mg^{2+} -Ionen eingesetzt. Möglicherweise spielen diese Komplexbildungseigenschaften von 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**90**) eine Rolle bei der Interaktion von Raupen mit ihren Futterpflanzen. So könnten beim Raupenfraß Ionen, die als Signale wirken,^[36] komplexiert werden, wodurch Signalprozesse gestört würden. Außerdem wirkt 8-Hydroxychinolin moderat Lipidperoxidationsprozessen entgegen, indem es freie Metallionen komplexiert, was an Reispflanzen gezeigt werden konnte.^[205] Daneben weist 8-Hydroxychinolin antibakterielle Wirkung auf.^[206] Es wurde früher zur Bekämpfung von Halsschmerzen verwendet. Ähnliche Eigenschaften sind wohl auch von 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**90**) zu erwarten.

3.3 Bildung von Aminosäurekonjugaten beim Riechprozess des Seidenspinners (*Bombyx mori*)



Abbildung 38: Männlicher Seidenspinner (*Bombyx mori*) mit den auffälligen großen Antennen, die der Pheromon- und Geruchswahrnehmung dienen. (Foto: Dr. Steinbrecht)

3.3.1 Signalprozesse bei der Geruchswahrnehmung

Die Wahrnehmung und Prozessierung von Signalen aus der Umgebung ist für alle Lebewesen essentiell. Insekten kommunizieren in erster Linie durch chemische Signalstoffe, beispielsweise mit Hilfe von Pheromonen (Sexuallockstoffen). Bereits in den letzten Jahrhunderten faszinierte Forscher, dass männliche Falter ein lockendes Weibchen über große Entfernungen wahrnehmen und finden können.^[207-209] Man glaubte damals, dass die Weibchen Infrarotstrahlung aussenden, die die Männchen mit ihren großen Antennen empfangen (siehe Abbildung 38). In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts zeichnete sich immer mehr ab, dass diese Theorie unhaltbar ist, da Extrakte von weiblichen Faltern ebenfalls anziehend auf männliche Falter wirken (siehe Abbildung 39).

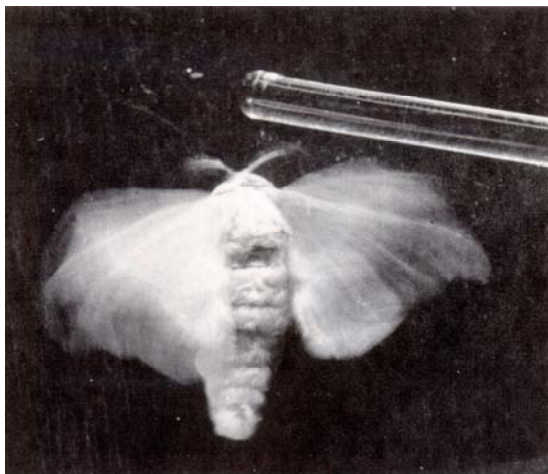
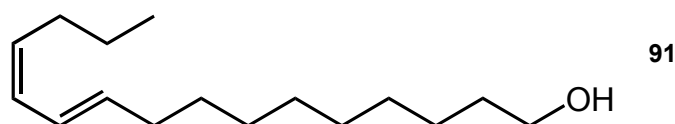


Abbildung 39: Als Bioassay zur Isolierung von Bombykol wurde die Reaktion männlicher Falter auf Fraktionen des weiblichen Drüsenextraktes untersucht

1959 gelang Butenandt nach etwa 20jähriger Forschung erstmals die Isolierung und Identifizierung eines Insektenpheromons, des Bombykols (**91**) [(10*E*,12*Z*)-10,12-Hexadecadien-1-ol] aus Seidenspinnern (*Bombyx mori*) (Abbildung 38 und Schema 31).^[210]



Schema 31: Bombykol [(10*E*,12*Z*)-10,12-Hexadecadien-1-ol] (**91**), Pheromon des Seidenspinners (*Bombyx mori*).

Bis heute wurden mehr als 1600 weitere Pheromone isoliert^[211] und synthetisiert. Solche Verbindungen werden teilweise kommerziell hergestellt und in Fallen zur Bestandskontrolle von Schädlingen^[212] eingesetzt.

Bereits vor der endgültigen Strukturaufklärung des Bombykols (**91**) beschäftigte man sich intensiv mit der Funktion und Morphologie der großen Antennen der *Bombyx mori* Männchen, die "Empfänger" des Bombykols (**91**) sind.^[213, 214] Eine Antenne besteht aus vielen Verästelungen, die wiederum dicht mit Mikrohärchen (Sensilla) besetzt sind.^[214] Durch Rasterelektronenmikroskopie wurde die Morphologie der Antennen im Detail untersucht (Abbildung 40).^[215-217]

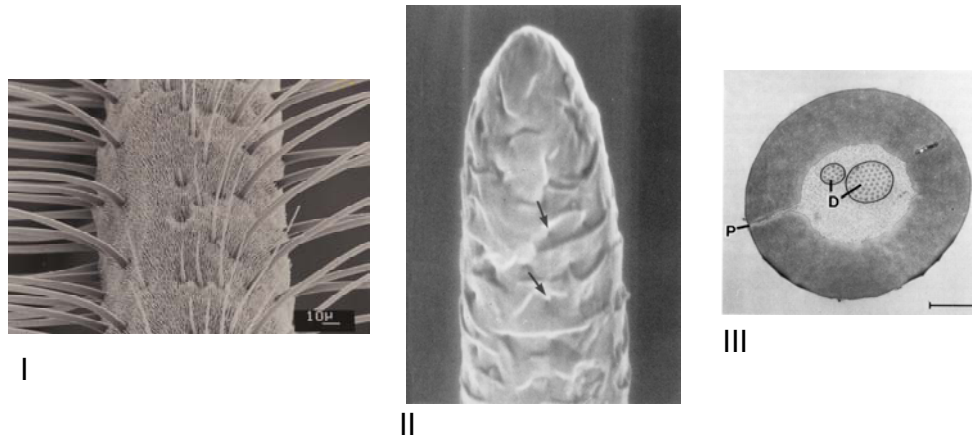


Abbildung 40: Ausschnitt eines Antennenhärchens von *B. mori* I, das mit Sensillumhärchen II dicht besetzt ist. Sensillumhärchen II weisen Poren (P) auf (siehe Pfeile), durch die Duftmoleküle aufgenommen werden. Im Querschnitt III erkennt man zwei Dendriten (D), an denen Duftstoffe durch Rezeptoren wahrgenommen werden. (Fotos: Dr. Steinbrecht)

Ein Sensillumhärchen weist viele Poren auf. Im Inneren findet man umgeben von Sensillumlymphflüssigkeit Dendriten (Nervenenden), die Reize an das Gehirn weiterleiten. Die elektrische Reizleitung von Antennen wird studiert, indem man die Antennen abschneidet und mit einem elektrischen Verstärker verbindet (Elektroantennographie).^[213, 218] Setzt man solche Antennen einem Reiz aus, z. B. durch das Pheromon Bombykol (**91**), so reagieren sie mit Stromimpulsen. Die Wahrnehmung der Antennen ist hochempfindlich. Schon einzelne Moleküle Bombykol (**91**) werden registriert.^[219]

Der molekulare Mechanismus der Wahrnehmung von Bombykol (**91**) durch die Antennen wird intensiv untersucht.^[217, 220-223] Bombykol (**91**) tritt durch die Poren der Sensillumhärchen in deren Inneres ein und wird von einem Pheromone Binding Protein (PBP) aufgenommen.^[224-226] Auf diese Weise - verpackt in ein wasserlösliches Protein - wird es möglich, dass Bombykol (**91**) in der wässrigen Sensillumlymphflüssigkeit in hohen Konzentrationen (üblicherweise 10 mM) vorkommen kann. Das PBP dient als Shuttle für den Transfer von Bombykol durch die Sensillumlymphflüssigkeit zum Rezeptor von Bombykol auf den Dendriten. Dort wird Bombykol (**91**) durch pH induzierte Öffnung des PBP entlassen und interagiert mit dem Rezeptor.^[227-229]

Neben hoher Sensivität und Selektivität ist für die Reizverarbeitung entscheidend, dass bereits registrierte Pheromonmoleküle rasch abgebaut werden, damit der Rezeptor für neue Moleküle "empfangsbereit" bleibt. So wird Bombykol (**91**) durch Enzyme zur Säure oxidiert.^[230, 231] Auch andere Desaktivierungsprozesse sind möglich: Das Pheromon von *Antheraea polyphemus* (6E,11Z)-6,11-Hexadecadienylacetat wird z. B. durch Hydrolyse inaktiviert.^[232]

3.3.2 Wahrnehmung von Benzoesäure durch *B. mori*

Neben der Wahrnehmung des Pheromons Bombykol (**91**) reagiert das olfaktorische System von *B. mori* auch auf weitere Reize. Eines der beiden sensorischen Neuronen des *Sensillum trichodeum* ist äußerst empfindlich für Benzoesäure (**92**), wie sich beim Screening nach wirksamen Duftstoffen herausstellte.^[233, 234] Daneben beobachtet man - wenn auch deutlich geringer - eine Aktivität in Gegenwart von 2,6-Dimethyl-5-hepten-2-ol und Linalool (**10**). Außerdem wurde festgestellt, dass die Nervenzelle durch Mekonium, einem Ausscheidungsprodukt frisch geschlüpfter Motten, erregt wird.^[234] Dennoch konnte über die Funktion dieser geruchsempfindlichen "Benzoesäure-Zelle" nur spekuliert werden. Unter anderem wurde vermutet, dass sie zur Lokalisation geeigneter Eiablageplätze dient.^[235]

Um die physiologischen Prozesse bei *B. mori* Faltern auf Benzoesäure (**92**) besser zu verstehen, sollten Antennen von *B. mori* mit markierter Benzoesäure (**92**) inkubiert und auf mögliche Metaboliten untersucht werden. Radioaktiv markierte Benzoesäure (**92**) wurde von einem Filterpapier auf frisch abgeschnittene Antennen geblasen. Etwa 7 % der radioaktiv markierten Benzoesäure (**92**) wurde an die Antennen adsorbiert. Im Luftstrom wurde nach 5 min etwa 30 % der adsorbierten Benzoesäure (**92**) wieder desorbiert. Die restlichen 70 % Benzoesäure (**92**) blieben an den Antennen haften. Dünnschichtchromatogramme von Extrakten der radioaktiver Benzoesäure (**92**) ausgesetzten Antennen zeigten neben Benzoesäure (**92**) einen zusätzlichen radioaktiven Fleck und somit das Vorhandensein eines Metaboliten der Benzoesäure (**92**).^[235]

3.3.3 Identifikation des Benzoessäuremetaboliten

Zur Aufklärung der Struktur des Metaboliten wurde Benzoessäure (**92**) bzw. [$^2\text{H}_5$]-Benzoessäure ($[^2\text{H}_5]$ -**92**) mit frisch abgeschnittenen Antennen von *B. mori* 30 min inkubiert. Nach Extraktion mit Chloroform wurden die Proben im Argonstrom aufkonzentriert, methyliert und per GC-MS untersucht. Um mögliche Metabolite der Benzoessäure (**92**) finden zu können, wurden die Ionenspuren des Benzoylkations $m/z = 105$ und die des um 5 Masseneinheiten schwereren [$^2\text{H}_5$]-Benzoylkations $m/z = 110$ untersucht. Im GC wurde sowohl nach Benzoessäurebehandlung (**92**) als auch nach Inkubation mit [$^2\text{H}_5$]-Benzoessäure ($[^2\text{H}_5]$ -**92**) nur ein intensiver Peak in den Ionenspuren des Benzoylkations bei $m/z = 105$ bzw. des [$^2\text{H}_5$]-Benzoylkations bei $m/z = 110$ gefunden (siehe Abbildung 41).

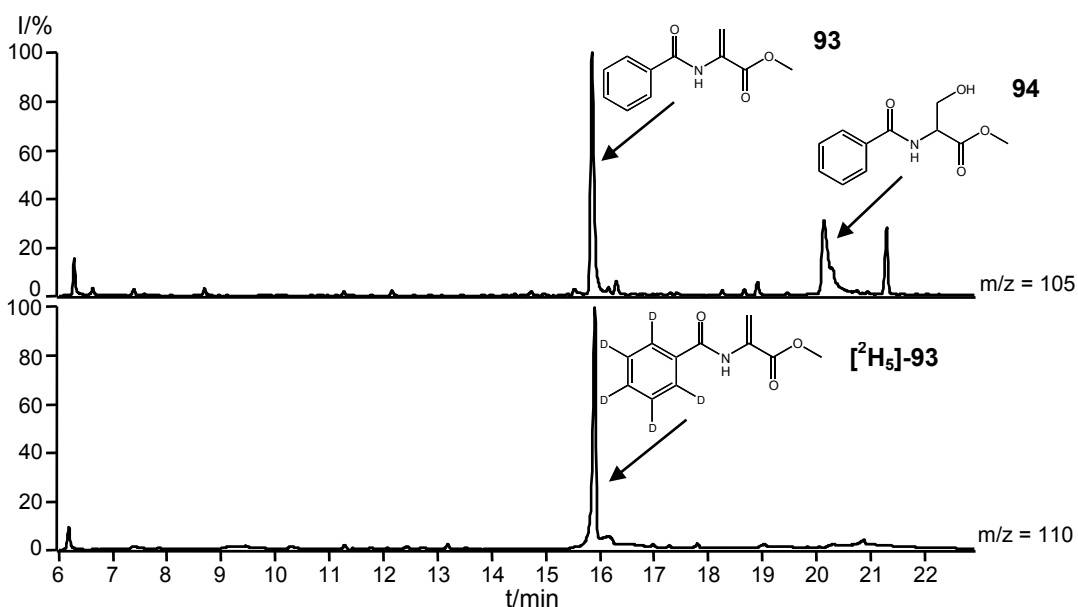


Abbildung 41: Gaschromatogramm^{cc} der Ionenspuren m/z 105 und m/z 110 der Extrakte nach Inkubation von *B. mori* Antennen mit Benzoessäure (**92**) bzw. [$^2\text{H}_5$]-Benzoessäure ($[^2\text{H}_5]$ -**92**) und anschließender Methylierung

^{cc} Alltech EC5 GC-Säule (15 m x 0.25 mm, 0.25 μm , Trägergas Helium, Flussrate 1 ml/min)
Temperaturprogramm: 50 °C, 10 °C min⁻¹ bis 100 °C, mit 5 °C min⁻¹ bis 300 °C, 5 min isotherm 300 °C, Injektortemperatur: 280 °C, splitless Modus.

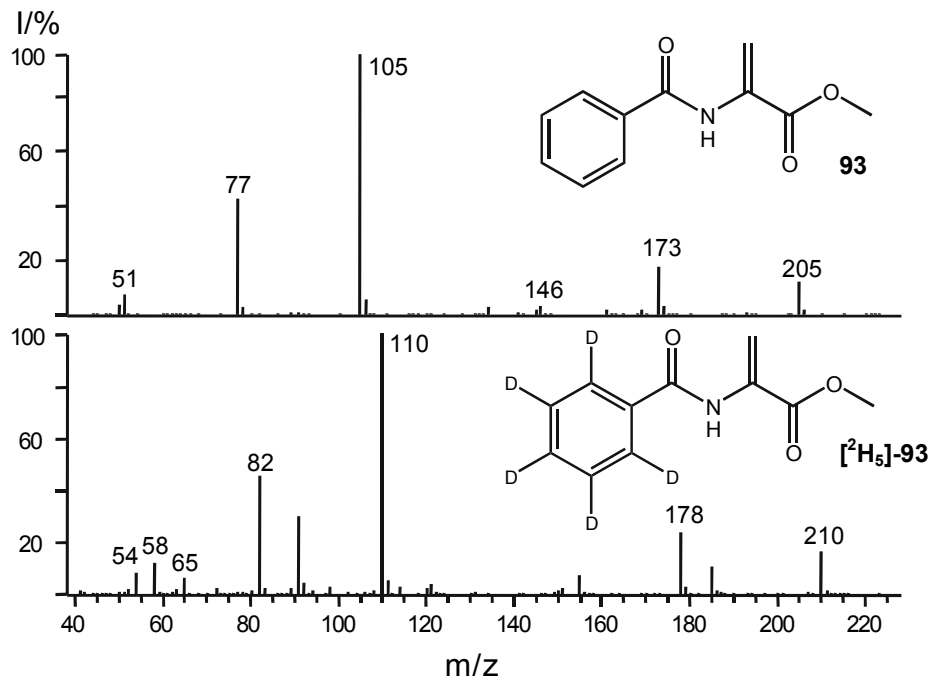


Abbildung 42: EI-Massenspektren (70 eV) von *N*-Benzoyl-2-aminoacrylsäuremethylester (**93**) (oben) und [²H₅]-*N*-Benzoyl-2-aminoacrylsäuremethylester (**[²H₅]-93**) (unten), isoliert aus *B. mori* Antennenextrakten nach Inkubation mit Benzoesäure (**92**) bzw. [²H₅]-Benzoesäure (**[²H₅]-92**) und anschließender Methylierung

Die Identifizierung des unbekannteten Metaboliten (**93**) wurde erleichtert durch die beiden komplementären Spektren, bei denen sich die Ionen jeweils um 5 Masseneinheiten voneinander unterschieden (siehe Abbildung 42). Für die unmarkierte Verbindung **93** wurden die Ionen *m/z* = 77, 105, 146, 173 und 205 beobachtet, für die markierte Verbindung **[²H₅]-93** *m/z* = 82, 110, 151, 178 und 210. Die Differenz vom schwersten beobachteten Ion *m/z* = 205 im Massenspektrum der nichtmarkierten Verbindung zum nächstschwereren Ion (*m/z* = 173) entspricht einem Verlust von 32 amu (CH₃OH). Die Differenz von *m/z* = 205 zu *m/z* = 146 beträgt 59 amu, was einer Carbomethoxygruppe entspricht. Nimmt man an, dass *m/z* = 205 das Moleküllion ist, so muss die Verbindung **93** wegen der ungeraden Massenzahl Stickstoff enthalten. Außerdem kann das Vorhandensein des Benzoylrestes vorausgesetzt werden. Durch GC-HR-MS Messungen konnte die Summenformel des Ions *m/z* = 205 als C₁₁H₁₁NO₃ ermittelt werden. Nach Subtraktion der bekannten Strukturteile Benzoyl- (105 amu), Carbomethoxygruppe (59 amu) und Stickstoff (14 amu) bleibt ein Rest

von 27 amu, der C_2H_3 entspricht. Es gibt prinzipiell drei Möglichkeiten, diese Teilstrukturen zu einem Molekül zusammenzufügen: 3-Benzoyl-aziridin-2-carbonsäuremethylester, 2-Benzoylamino-acrylsäuremethylester und 3-Benzoylamino-acrylsäuremethylester. Berücksichtigt man allerdings die Herkunft der Verbindung, so erscheint das Vorliegen eines 2-Benzoylamino-acrylsäuremethylesters (**93**), der durch thermische Eliminierung von Wasser aus *N*-Benzoylserinmethylester (**94**) entstanden sein könnte (Abbildung 42), am wahrscheinlichsten, zumal in einigen Proben bei der GC-MS Analyse der *N*-Benzoylserinmethylester (**94**) nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 41).

Um herauszufinden, ob 2-Benzoylamino-acrylsäuremethylester (**93**) wirklich als Artefakt im heißen Einlasssystem des Gaschromatographen aus *N*-Benzoylserinmethylester (**94**) gebildet wird, wurde eine Probe des Inkubationsversuchs von *B. mori* Antennen mit Benzoesäure (**92**) direkt per LC-MS untersucht.

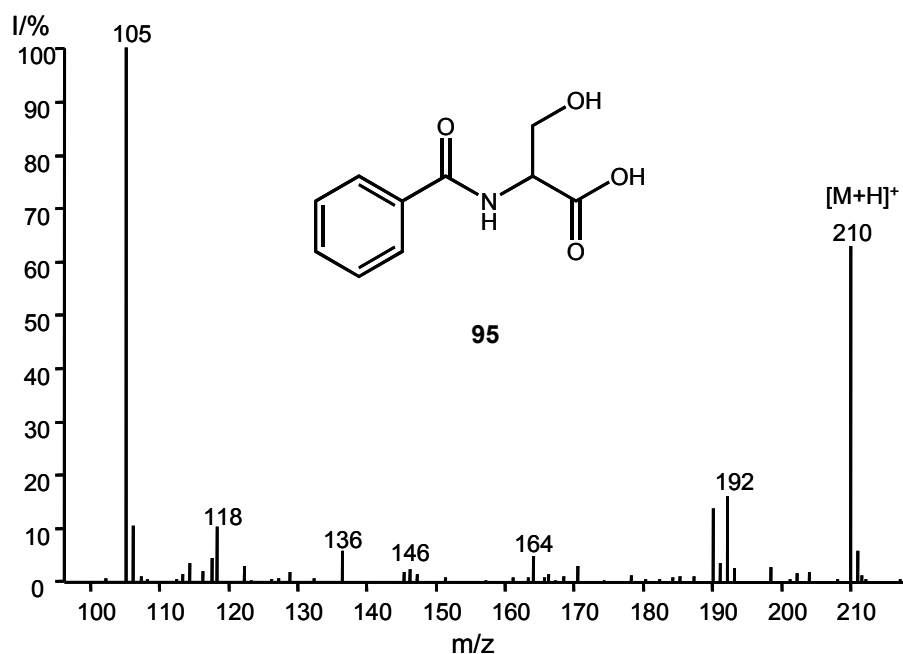


Abbildung 43: APCI-Massenspektrum von *N*-Benzoylserin (**95**) nach Applikation von Benzoesäure (**92**) an frisch abgeschnittene *B. mori* Antennen

Man erhielt im APCI-Massenspektrum nur einen Peak mit dem charakteristischen Benzoylfragment ($m/z = 105$; siehe Abbildung 43). Ein intensives $[M+H]^+$ Ion bei $m/z = 210$ und Koelution mit synthetischem *N*-Benzoylserin (**95**) beweisen zweifelsfrei, dass *N*-Benzoylserin der gesuchte Metabolit ist.^[235]

3.3.4 Dient die Konjugation zur Desaktivierung von Signalstoffen?

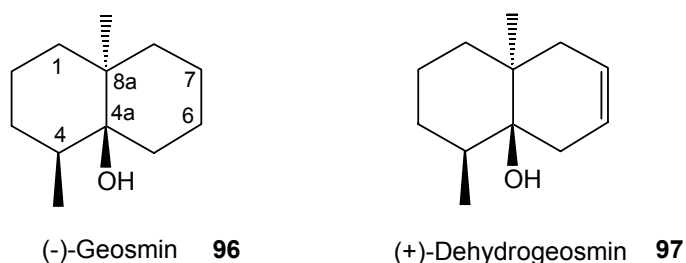
Die von den Antennen von *B. mori* adsorbierten Benzoessäuremoleküle (**92**) werden von Enzymen der Antennen zu Serinkonjugaten metabolisiert. Konjugation ist häufig ein Prozess, der zur Inaktivierung bzw. zur Ausscheidung verwendet wird. So werden bei Mensch und Säugetieren aromatische Verbindungen als Glycinkonjugate (Hippursäure) ausgeschieden.^[236] *B. mori* Larven bilden ebenfalls Glycinkonjugate, um Benzoessäure (**92**) auszuschleiden.^[237] Deshalb liegt es nahe anzunehmen, dass die Bildung von *N*-Benzoylserin (**95**) zur Desaktivierung der Benzoessäure (**92**) dient. Dafür spricht auch, dass es sich um eine schnelle Reaktion handelt. Bei Invertebraten wurde neben oxidativer Inaktivierung^[238] von Duftstoffen Konjugation durch UDP-Glucuronosyltransferasen^[239] und Glutathion-S-transferasen^[126] beobachtet. Interessant wäre es zu untersuchen, ob auch Bombykol (**91**) nach Oxidation^[230, 231] mit Serin konjugiert werden kann.

Wie im Hauptteil dieser Doktorarbeit beschrieben, werden Konjugate von Fettsäuren und Glutamin (**24**) im Darm vieler Invertebraten durch Mikroorganismen gebildet.^[143] Daher stellt sich die Frage, ob Mikroorganismen auf den Antennen von *B. mori* Benzoessäure (**92**) zu *N*-Benzoylserin (**95**) konjugieren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da man bei Kontrollversuchen mit Beinen und Flügeln von *B. mori* keine Umsetzung der Benzoessäure (**92**) beobachtete.^[235]

3.4 Untersuchungen zur Biosynthese von Geosmin

3.4.1 Vorkommen und Bedeutung von Geosmin

Geosmin (**96**) (-)-(4*S*,4*aS*,8*aR*)-(4,8*a*-Dimethyl-octahydro-naphthalin-4*a*-ol) ist ein verbreiteter Duftstoff mit charakteristischer feuchterdiger Duftnote, die an frisch umgegrabene Erde erinnert (siehe Schema 32). Geosmin (**96**) wurde erstmals aus dem Kulturmedium von Actinomyceten isoliert.^[240-242] Es wird, wie spätere Untersuchungen zeigten, von vielen Organismen wie Cyanobakterien,^[243] Pilzen,^[244-246] Moosen^[247] und einigen Kakteen^[248] gebildet. Wegen seiner äußerst niedrigen Wahrnehmungsgrenze von ca. 10 ng/l ist die Entfernung von Geosmin (**96**) aus verschmutztem Wasser schwierig und daher ein Problem bei der Trinkwasseraufbereitung.^[249-251] Andererseits wird Geosmin (**96**) als Aromakomponente bei roten Rüben (*Beta vulgaris*),^[252] Bohnen^[253] und Wein^[254] geschätzt.

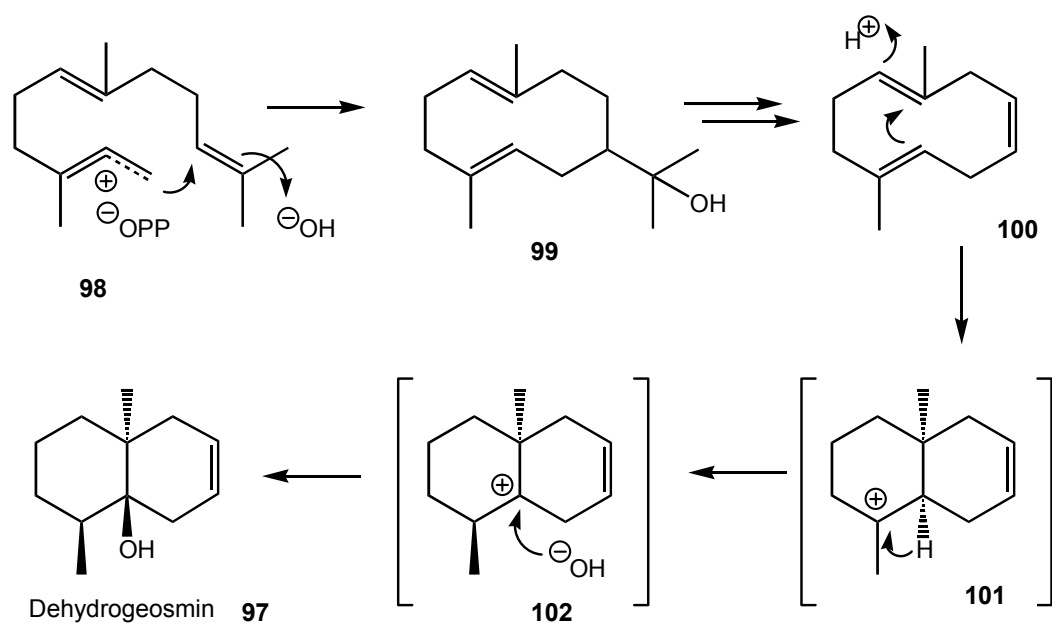


Schema 32: Strukturen von Geosmin (**96**) und Dehydrogeosmin (**97**)

Obwohl die Struktur von Geosmin (**96**) bereits 1969 von Gerber *et al.* aufgeklärt wurde,^[242] ist bisher nur wenig über seine Biogenese bekannt. Bentley *et al.* konnten durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markiertem Acetat an *Streptomyces antibioticus* zeigen, dass Geosmin (**96**) aus dem Terpenstoffwechsel stammt.^[255]

Das dem Geosmin (**96**) strukturell verwandte Dehydrogeosmin (**97**) (siehe Schema 32) findet man als Hauptkomponente in Blütenduftstoffen von Kakteenarten wie *Rebutia*, *Sulcorebutia*, *Mammillaria*, und *Dolichothele*.^[248] Manchmal werden im Blütenduft von Kakteen neben Dehydrogeosmin (**97**) auch Spuren von Geosmin (**96**) nachgewiesen. Auf Grund dieser Beobachtung und der sehr ähnlichen Strukturen beider Moleküle sollte man einen weitgehend gemeinsamen Biogeneseweg beider Verbindungen erwarten. Die Biosynthese von Dehydrogeosmin (**97**) wurde von Feng *et al.*^[256] durch Fütterungsexperimente deuterierter Farnesole an Kakteenblüten der Art *Rebutia marsoneri* studiert. Danach muss Dehydrogeosmin (**97**) als ein

Trinorsesquiterpen angesehen werden, das durch Bicyclisierung aus Farnesyl-diphosphat (**98**) entsteht. Aus der Verteilung der Deuteriummarkierungen im Dehydrogeosmin (**97**) konnte die Biosynthese abgeleitet werden. Durch elektrophilen Angriff des Farnesylkations (**98**) an die terminale Doppelbindung entsteht ein germacradienartiger Zehnringmonocyclus **99**. Die exocyclische C-3-Seitenkette wird oxidativ unter Ausbildung einer Doppelbindung zur Verbindung **100** entfernt. Protonierung an C-8 und nachfolgender transannularer Ringschluss führt zum bicyclischen tertiären Kation **101**. Dieses Kation stabilisiert sich durch suprafaciale 1,2-Hydrid Wanderung zu **102**. Durch Anlagerung von Wasser an das stabilisierte Kation entsteht schließlich Dehydrogeosmin (**97**) (siehe Schema 33).^[256]



Schema 33: Biosynthese von Dehydrogeosmin (**97**)

Im Gegensatz zum ausgezeichneten Einbau von deuterierten Farnesolen in Dehydrogeosmin (**97**) bei Kakteenblüten,^[256] waren alle Versuche, die Geosminbiosynthese mit Farnesolvorstufen in Bakterien (*Streptomyces*) zu studieren, erfolglos, da kein Einbau erfolgte.^[257] Ein Grund dafür scheint zu sein, dass Farnesol in den verwendeten Konzentrationen für die Mikroorganismen toxisch ist, da nach seiner Applikation stark reduziertes Wachstum der Bakterien zu beobachten war.

Um die Biogenese von Geosmin (**96**) dennoch studieren zu können, sollten markierte frühe Vorstufen des Terpenstoffwechsels verfüttert werden. Terpene können in zwei Stoffwechselwegen aufgebaut werden: über den MVA-Weg (mevalonic acid) mit Mevalonat^[258-260] als Vorstufe von Isopentenylpyrophosphat (**103**) und über den

MEP-Weg (Methylerythritolphosphat) mit Deoxy-D-xylulose (**104**)^[261-264] als Vorstufe von Isopentenylpyrophosphat (**103**). Bryophyten wie *Fossombronia pusilla* verwenden für die Synthese von Sesquiterpenen den klassischen Mevalonat-Weg.^[265],^{266, 267]} Bei Bakterien wie *Streptomyces*,^[268-270] aber auch bei Lebermoosen,^[271] hat man während der Wachstumsphase für die Biogenese von manchen Terpenen eine Beteiligung beider Stoffwechselwege beobachtet.

Zum Vergleich der Biogenese von Geosmin (**96**) wurden markierte Vorstufen der beiden Terpensynthesewege an *Streptomyces* sp. JP95, „*Streptomyces maritimus*“^{dd} und an das Lebermoos *F. pusilla* verfüttert.

3.4.2 Studium der Biosynthese von Geosmin

3.4.2.1 Verfütterung markierter Vorstufen an *Streptomyces* spp. und *Fossombronia pusilla*

Trotz der Verwendung unterschiedlicher Quellen für seine Biosynthese hat Geosmin (**96**) von *Streptomyces* spp. und *F. pusilla* die gleiche Stereochemie. Die gaschromatographische Analyse von Geosmin (**96**) an einer chiralen β -Cyclodextrin Kapillarsäule^[272, 273] unter Verwendung synthetischer Referenzverbindungen^[274] ergab, dass Geosmin (**96**) von *Fossombronia pusilla* und *Streptomyces* spp. isomerenrein (-)-konfiguriert ist. Bei GC-MS Analysen von *Streptomyces* sp. JP95, „*Streptomyces maritimus*“ und *Fossombronia pusilla* konnte Dehydrogeosmin (**97**) nicht nachgewiesen werden.

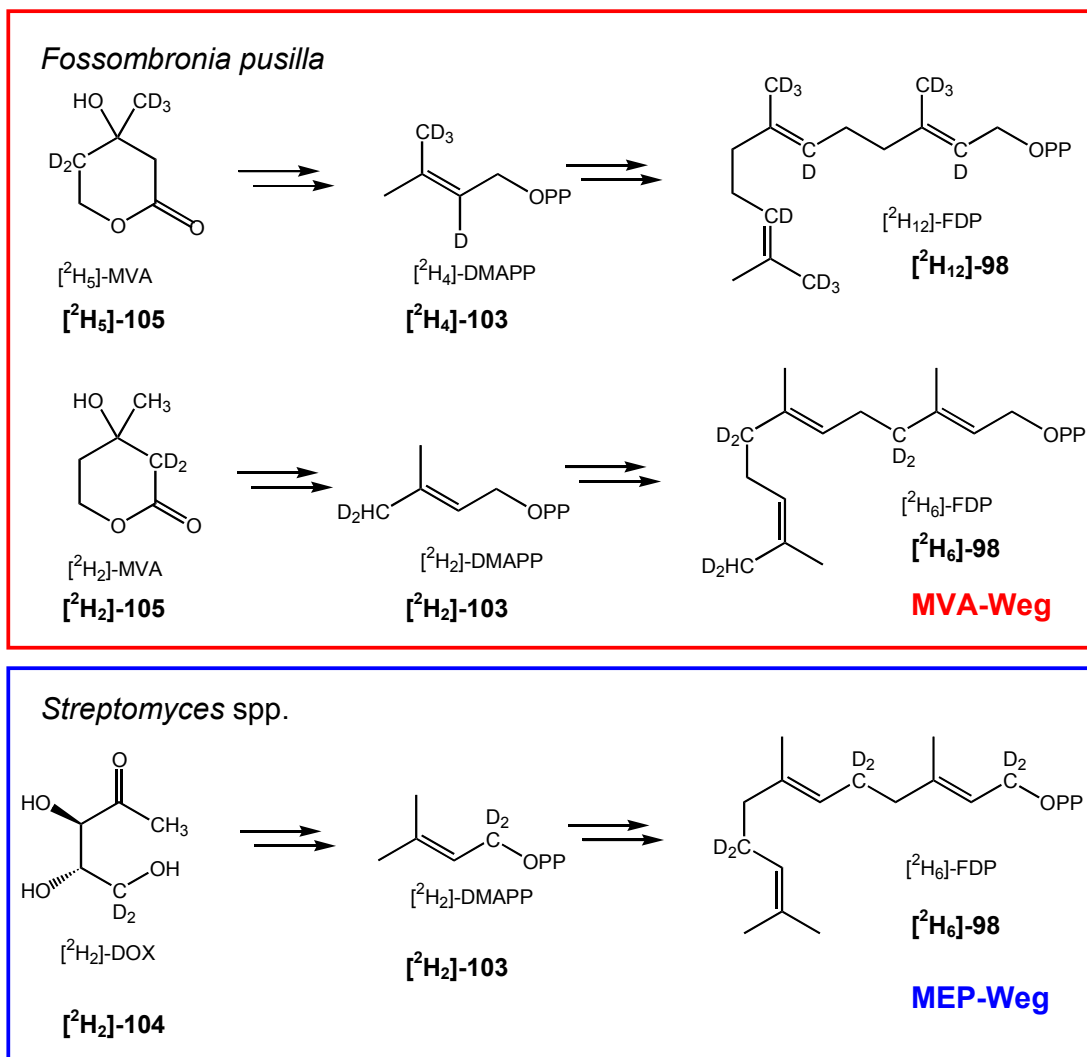
Als markierte Vorstufen wurden [4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton ([²H₅]-MVA) (**[²H₅]-105**)^[262], [2,2-²H₂]-Mevalolacton ([²H₂]-MVA) (**[²H₂]-105**) und [5,5-²H₂]-Desoxy-D-xylulose ([²H₂]-DOX) (**[²H₂]-104**)^[275] an *Streptomyces* sp. JP95, „*Streptomyces maritimus*“ und *Fossombronia pusilla* verfüttert.^{ee} Sämtliche Verbindungen wurden von Dr. Andreas Jux synthetisiert.^[156]

^{dd} Die Anführungszeichen werden benutzt, da *Streptomyces maritimus* noch keine offizielle Bezeichnung ist.

^{ee} Zur leichteren Lesbarkeit wird im Folgenden auf die Angabe der Position der Deuteriumatome von deuteriertem Mevalolacton und markierter Desoxy-D-xylulose verzichtet.

Die flüchtigen Verbindungen wurden nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen entweder per SPME^[276, 277] oder durch „closed loop stripping“^[278] gesammelt und per GC-MS analysiert.

Bei den Streptomyceten wurde ein ausgezeichneter Einbau von [²H₂]-DOX (**[²H₂]-104**) in Geosmin (**(96)**) festgestellt. Das Lebermoos hingegen verwendet fast ausschließlich Terpenbausteine aus dem Mevalonatweg für die Geosminbiosynthese (siehe Schema 34).^[156]



Schema 34: Bildung deuterierter Farnesylpyrophosphate (**(98)**) durch Verfütterung markierter Terpenvorstufen

Bemerkenswerterweise wurde bei den Fütterungsexperimenten immer ein kompletter Einbau von 3 markierten Isopreneinheiten in Farnesylpyrophosphat (**(98)**) beobachtet. Farnesylpyrophosphate (**(98)**) mit nur einer oder zwei markierten C-5-Einheiten

wurden nicht gebildet. So erhält man beispielsweise nach Verfütterung von 2 mg ml^{-1} $[\text{}^2\text{H}_2]$ -DOX an *Streptomyces* sp. JP95 zwei teilweise überlappende Peaks im Gaschromatogramm von $[\text{}^2\text{H}_5]$ -Geosmin ($[\text{}^2\text{H}_5]$ -**96**) (27%) und unmarkiertem natürlichen Geosmin (**96**). Bei Applikation einer höheren Dosis von $[\text{}^2\text{H}_2]$ -DOX ($[\text{}^2\text{H}_2]$ -**104**) findet man beinahe nur markiertes Geosmin ($[\text{}^2\text{H}_5]$ -**96**).

3.4.2.2 Massenspektroskopische Untersuchungen zur Biogenese von Geosmin

Das Massenspektrum von Geosmin (**96**) (siehe Abbildung 44) ist durch zwei intensive geradzahlige Bruchstücke geprägt [$m/z = 126$ und $m/z = 112$ (Basispeak)], die zur Interpretation des Einbaumusters der deuterierten Vorstufen in Geosmin (**96**) wertvolle Informationen liefern. Daneben beobachtet man ein wenig intensives Molekülion bei $m/z = 182$. Durch Verlust einer Methylgruppe entsteht daraus ein Ion $m/z = 167$. Anschließende Eliminierung von Wasser ergibt das Ion $m/z = 149$.

Der Basispeak bei $m/z = 112$ entsteht durch Spaltung des A-Ringes, Wasserstoffübertragung vom protonierten Oxoniumion zum Radikal und nachfolgende McLafferty Umlagerung, wobei Penten als Neutralteil verloren wird (siehe Schema 35). Da bei der Spaltung des A-Ringes ein stabiles sekundäres Radikal gebildet wird, ist diese Zerfallsreaktion gegenüber der Fragmentierung unter Spaltung des B-Ringes begünstigt. Erfolgt hingegen zuerst ein Bindungsbruch im B-Ring, wird zuerst ein primäres Radikal gebildet, das weniger gut stabilisiert ist (Schema 35). Daher beobachtet man im Massenspektrum für diese Fragmentierung ein weniger intensives Ion bei $m/z = 126$ unter Spaltung des B-Ringes (Abbildung 44) als bei der Fragmentierung des A-Ringes ($m/z = 112$).

Um den postulierten Zerfallsmechanismus für den A- und den B-Ring zu bestätigen, wurde ein H/D-Austauschexperiment an der Hydroxygruppe von Geosmin ($[\text{}^2\text{H}]$ -**96**) mit Deuteromethanol/ D_2O durchgeführt. Das Molekülion wird dabei von $m/z = 182$ zu $m/z = 183$ verschoben. Das Fragment bei $m/z = 112$ bleibt unverändert, da das Deuterium der Hydroxygruppe zum größten Teil in die Seitenkette wandert, die durch McLafferty Umlagerung als Penten abgespalten wird. Ein analoger Deuteriumtransfer wird nach Spaltung des B-Ringes beobachtet (siehe Abbildung 45, Schema 35, Schema 39 und Schema 40).

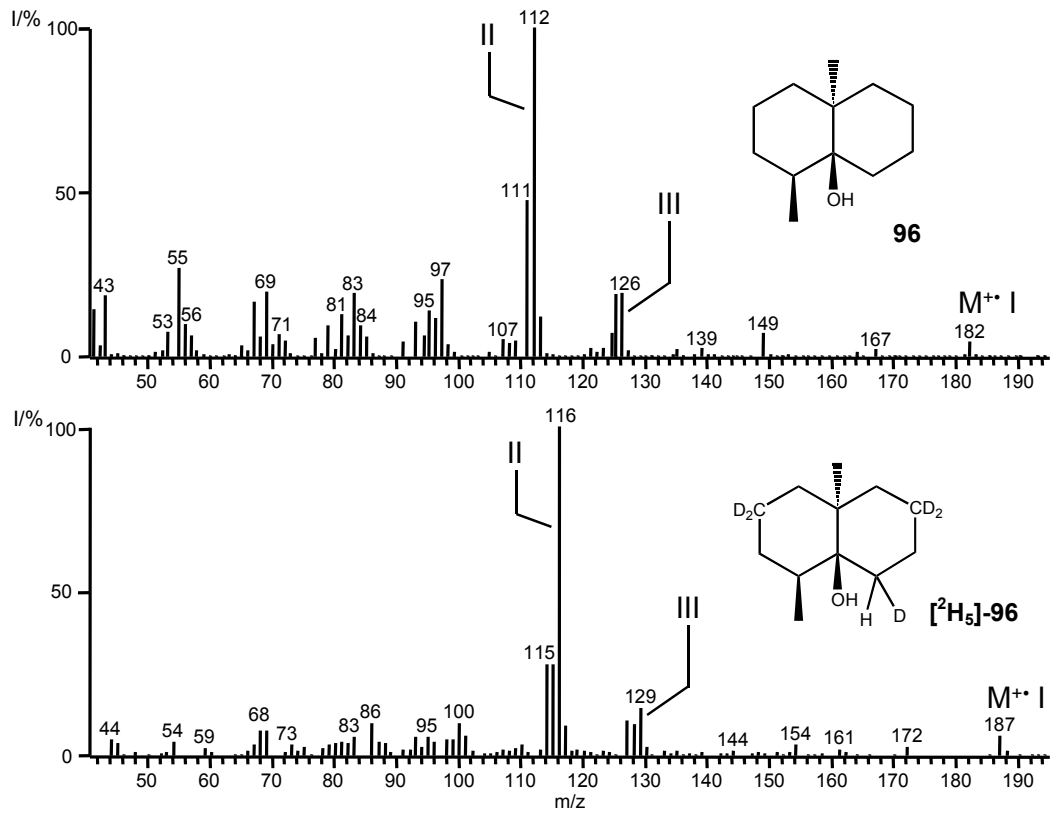
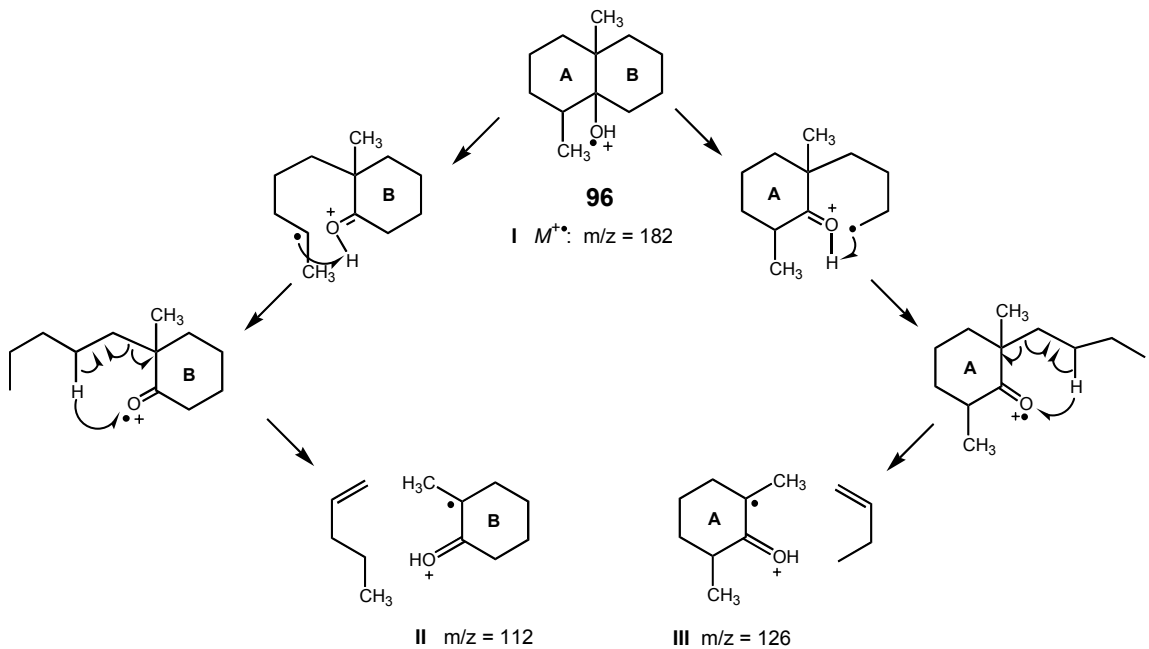


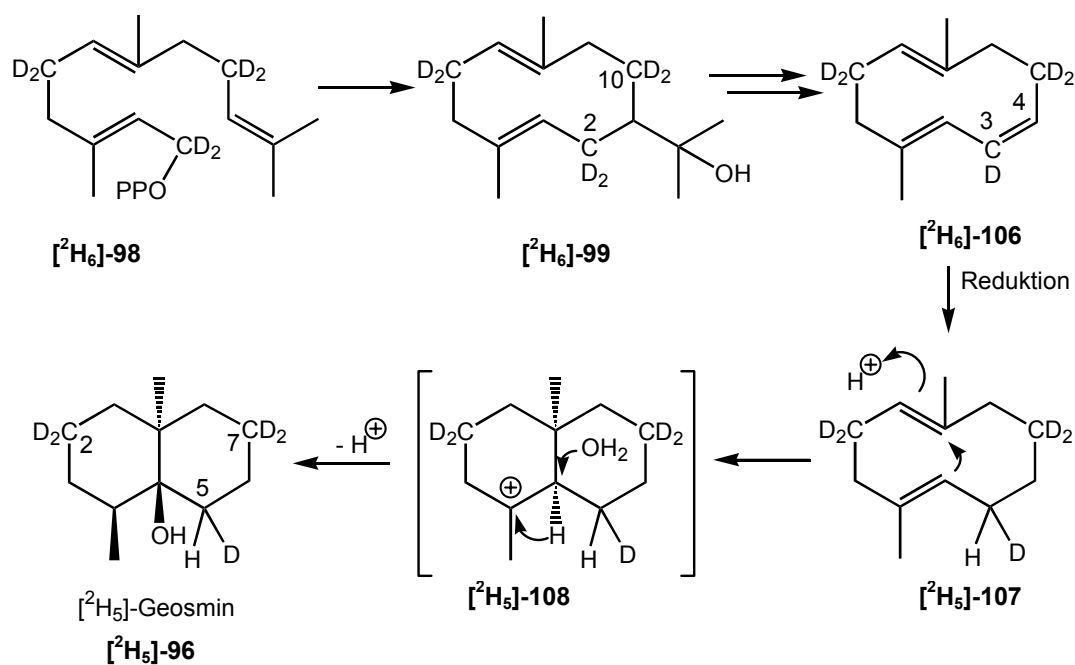
Abbildung 44: EI-Massenspektrum von Geosmin (**96**) und $[^2H_5]$ -Geosmin ($[^2H_5]$ -**96**)



Schema 35: Fragmentierung von Geosmin (**96**): Bildung der beiden indikativen Ionen $m/z = 112$ (B-Ring Fragment) und $m/z = 126$ (A-Ring Fragment)

Mit Kenntnis dieser Zerfallswege, die durch Studium der Fragmentierung von Geosmin und H/D-Austauschexperimente etabliert werden konnten, lassen sich die Deuteriumatome im Geosmin (**96**) nach Verfütterung deuterierter Vorstufen den beiden Ringen zuordnen.

So erhält man nach Applikation von [$^2\text{H}_2$]-DOX (**[$^2\text{H}_2$]-104**) an *Streptomyces* sp. JP95 ein Massenspektrum für Geosmin (**[$^2\text{H}_5$]-96**), in dem das Molekölion um fünf Masseneinheiten zu $m/z = 187$ verschoben ist (siehe Abbildung 44 und Schema 36). Demnach wurden insgesamt fünf Deuteriumatome in Geosmin (**[$^2\text{H}_5$]-96**) eingebaut. Zwei davon befinden sich im A-Ring (C-3), die anderen drei im B-Ring (C-5,C-7) jeweils an den in Schema 36 angegebenen Positionen.



Schema 36: Postulierte Biosynthese von Geosmin (**[$^2\text{H}_5$]-96**) nach Verfütterung von [$^2\text{H}_2$]-Desoxy-D-xylulose (**[$^2\text{H}_2$]-104**) an *Streptomyces* spp.

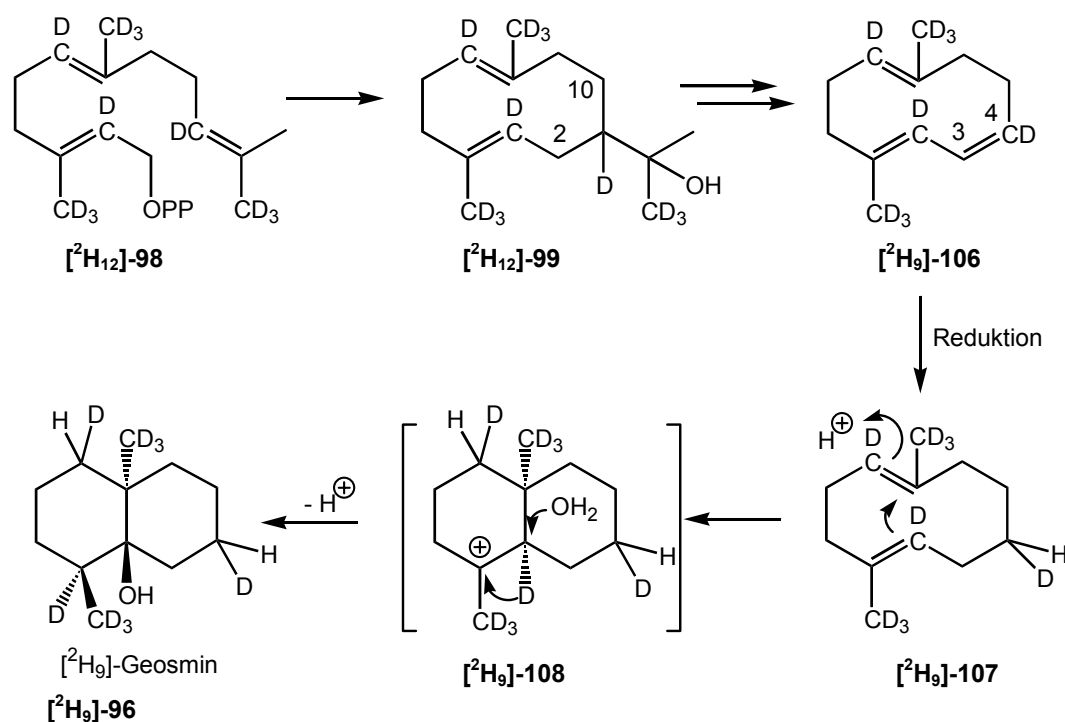
Diese Verteilung der Deuteriumatome lässt sich aus der Cyclisierung von [$^2\text{H}_6$]-FDP (**[$^2\text{H}_6$]-98**) zu Geosmin (**[$^2\text{H}_5$]-96**) und durch Analyse des Fragmentierungsmusters von Geosmin (**[$^2\text{H}_5$]-96**) im Massenspektrometer ableiten (siehe Schema 39 und Schema 40).

Nach Öffnung des A-Ringes, Transfer des Protons und anschließender McLafferty Umlagerung wird eines der beiden Deuteriumatome der Seitenkette auf das Oxoniumion übertragen, wodurch die Anzahl der Deuteriumatome im B-Ring auf vier

ansteigt ($m/z = 116$). Eine einheitliche Reaktion zur Bildung dieses Ions ist nur möglich, wenn sich zwei Deuteriumatome am C-2 von $[^2\text{H}_5]\text{-96}$ befinden, da sonst auch Wasserstofftransfer als Konkurrenzreaktion beobachtet werden müsste. Analog dazu entsteht durch Deuteriumtransfer vom C-7 an das Oxoniumion des A-Ringes ein Ion bei $m/z = 129$. Da man keine Zunahme der Intensität des Ions $m/z = 128$ im Vergleich zur Intensität des korrespondierenden Ions des unmarkierten Geosmins (**96**) beobachtet ($m/z = 125$), müssen beide Deuteriumatome am Kohlenstoff C-7 von $[^2\text{H}_5]\text{-96}$ sein. Das dritte Deuteriumatom im B-Ring von $[^2\text{H}_5]\text{-96}$ sollte nach dem Faltungsmuster für $[^2\text{H}_6]\text{-FDP}$ ($[^2\text{H}_6]\text{-98}$) am Kohlenstoffatom C-5 sitzen. Da das markierte Geosmin ($[^2\text{H}_5]\text{-96}$) nur 5 Deuteriumatome aufweist, muss ein Deuteriumatom des $[^2\text{H}_6]\text{-FDP}$ ($[^2\text{H}_6]\text{-98}$) verloren gegangen sein. Am wahrscheinlichsten ist das ein Deuterium an C-2 von $[^2\text{H}_6]\text{-99}$, das im Zuge der Abspaltung der *i*-Propyloxygruppe zu $[^2\text{H}_6]\text{-106}$ eliminiert wird (siehe Schema 36).

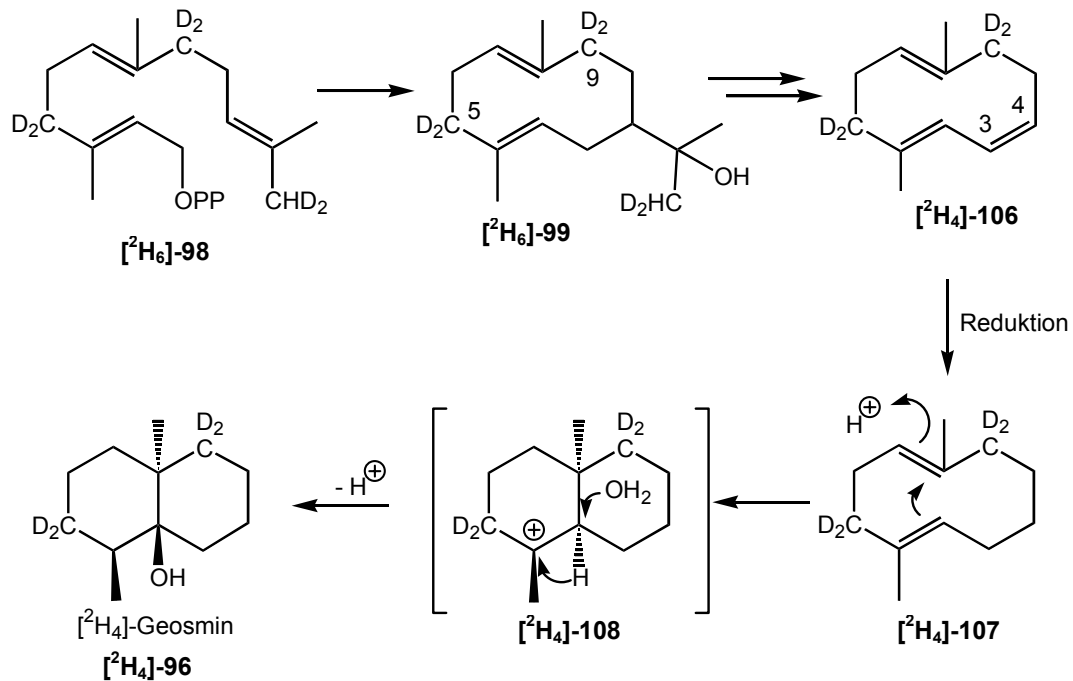
Weitere Details über den Cyclisierungsmechanismus erhält man durch die Verfütterungsexperimente von $[^2\text{H}_2]\text{-MVA}$ ($[^2\text{H}_2]\text{-105}$) und $[^2\text{H}_5]\text{-MVA}$ ($[^2\text{H}_5]\text{-105}$) an das Lebermoos *F. pusilla*. Wie in Schema 34 gezeigt, wird aus $[^2\text{H}_5]\text{-MVA}$ ($[^2\text{H}_5]\text{-105}$) zuerst $[^2\text{H}_{12}]\text{-FDP}$ ($[^2\text{H}_{12}]\text{-98}$) gebildet. Das FDP ($[^2\text{H}_{12}]\text{-98}$) cyclisiert zum Cyclo-decadienderivat ($[^2\text{H}_{12}]\text{-99}$) (siehe Schema 37). Im nächsten Schritt wird die *i*-Propyloxyseitenkette, die drei Deuteriumatome enthält, abgespalten ($[^2\text{H}_9]\text{-106}$). Damit findet man im Geosmin ($[^2\text{H}_9]\text{-96}$) 9 Deuteriumatome. Durch 1,2-Wasserstoffwanderung, die bereits bei der Dehydrogeosminbiosynthese beobachtet wurde,^[256] wird das Deuteriumatom an C-4a von $[^2\text{H}_9]\text{-108}$ in den A-Ring verschoben. Dadurch findet man in $[^2\text{H}_9]\text{-96}$ fünf Deuteriumatome im A-Ring, je eines an C-1 und C-4, sowie drei an der angulären Methylgruppe (CD_3) und vier Deuteriumatome im B-Ring, eines an C-6 und drei an der angulären Methylgruppe (CD_3).

Die Verteilung der Deuteriumatome in beiden Ringhälften stimmt perfekt mit den relevanten Ionen I, II, und III (siehe Schema 35) überein. So wird bei der weniger begünstigten Fragmentierung des B-Ringes von $[^2\text{H}_9]\text{-Geosmin}$ ($[^2\text{H}_9]\text{-96}$) Buten mit einem Deuteriumatom abgespalten, so dass im Massenspektrum ein Ion $m/z = 134$ ($126+8$) auftritt. Bei der Bildung des Fragments II wird ein Spaltstück $m/z = 116$ ($112+4$) erhalten. Fünf Deuteriumatome werden mit Penten eliminiert (vgl. Schema 35).



Schema 37: Postulierte Biosynthese von $[^2\text{H}_9]$ -Geosmin ($[^2\text{H}_9]$ -96) nach Verfüterung von $[^2\text{H}_5]$ -Mevalolacton ($[^2\text{H}_5]$ -105) an *Fossombronina pusilla*

Neben $[^2\text{H}_5]$ -MVA ($[^2\text{H}_5]$ -105) wurde auch $[^2\text{H}_2]$ -MVA ($[^2\text{H}_2]$ -105) an das Lebermoos *F. pusilla* verfüttert. Bei diesem Versuch erhält man ein $[^2\text{H}_4]$ -Geosmin ($[^2\text{H}_4]$ -96) mit je zwei Deuteriumatomen im A- und B-Ring an den Kohlenstoffatomen C-3 bzw. C-8. $[^2\text{H}_4]$ -Geosmin ($[^2\text{H}_4]$ -96) entsteht durch Cyclisierung von $[^2\text{H}_6]$ -Farnesylpyrophosphat ($[^2\text{H}_6]$ -98) zum $[^2\text{H}_6]$ -Germacradienintermediat ($[^2\text{H}_6]$ -99). Dieses verliert die *i*-Propoxyseitenkette mit zwei Deuteriumatomen unter Bildung von $[^2\text{H}_4]$ -106. Aus dem resultierenden Cyclodecatrien $[^2\text{H}_4]$ -106 wird durch Hydrierung, Bicyclisierung, 1,2-Wasserstoffwanderung und Wasseranlagerung $[^2\text{H}_4]$ -Geosmin ($[^2\text{H}_4]$ -96) erhalten (siehe Schema 38). Das Massenspektrum von $[^2\text{H}_4]$ -Geosmin ($[^2\text{H}_4]$ -96) bestätigt und komplementiert die Verfütterungsstudie von $[^2\text{H}_5]$ -MVA ($[^2\text{H}_5]$ -105) an *F. pusilla*.

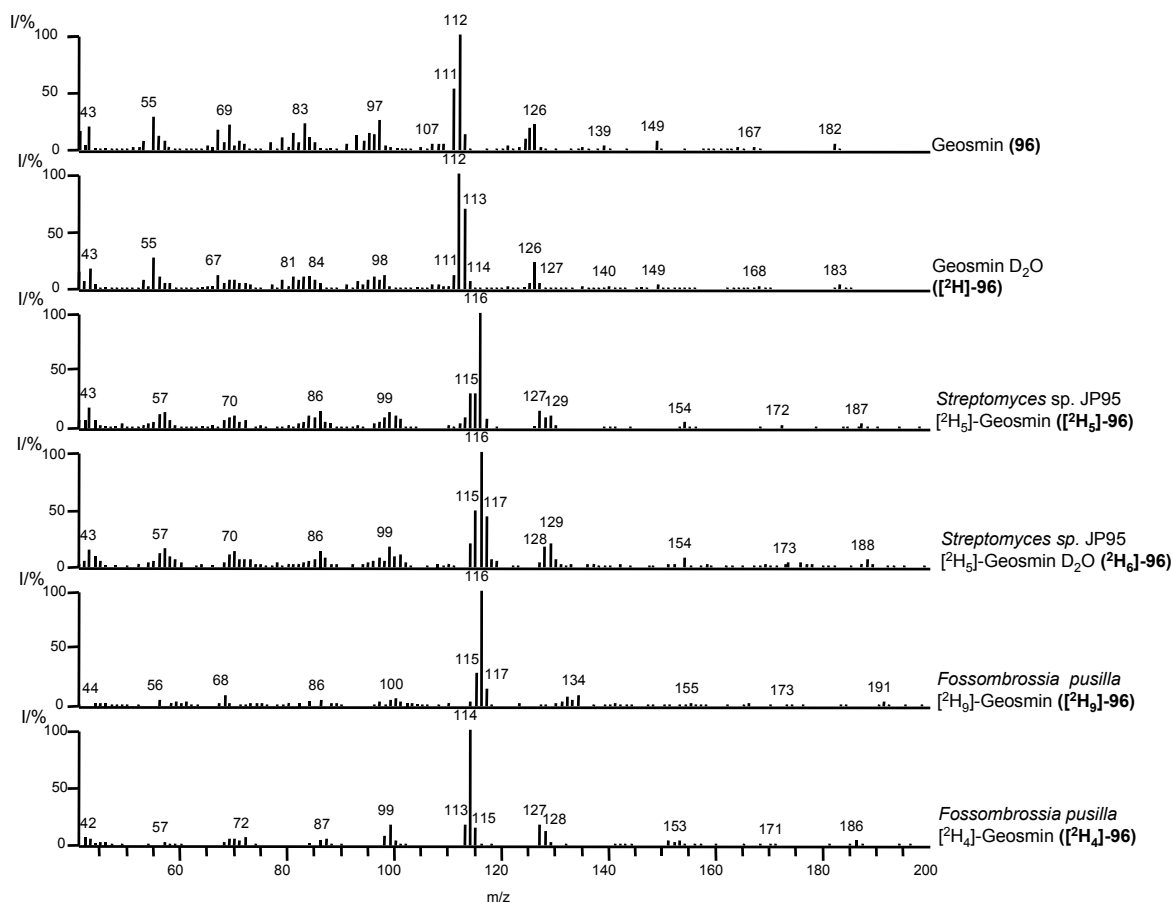


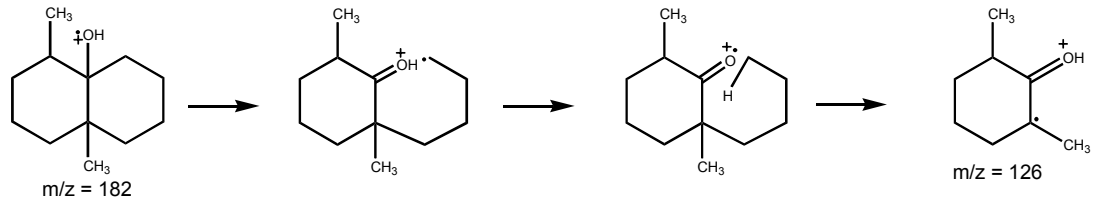
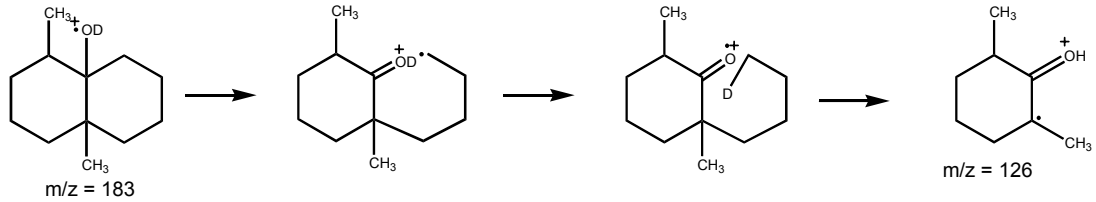
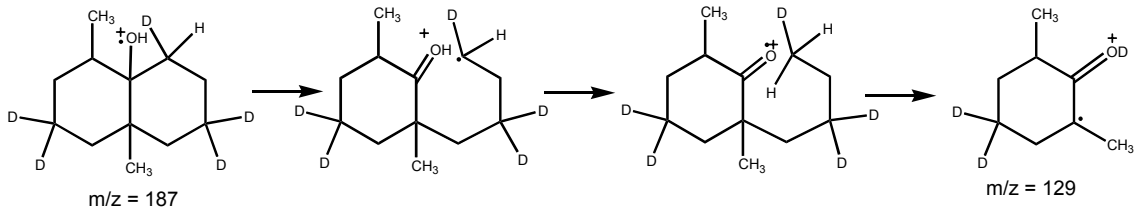
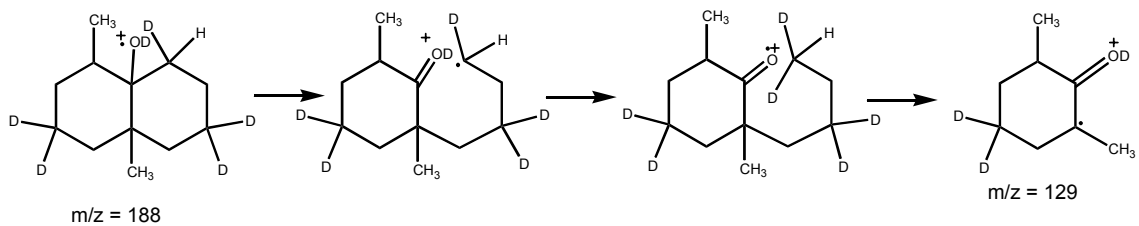
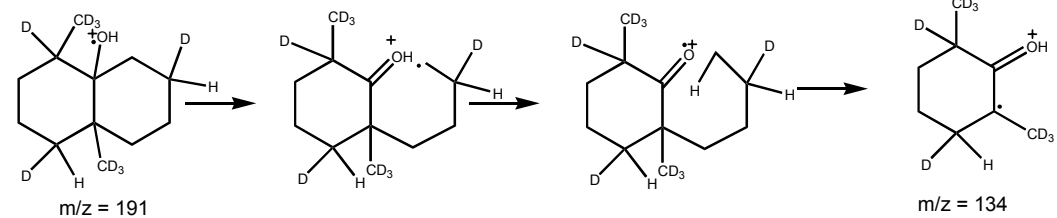
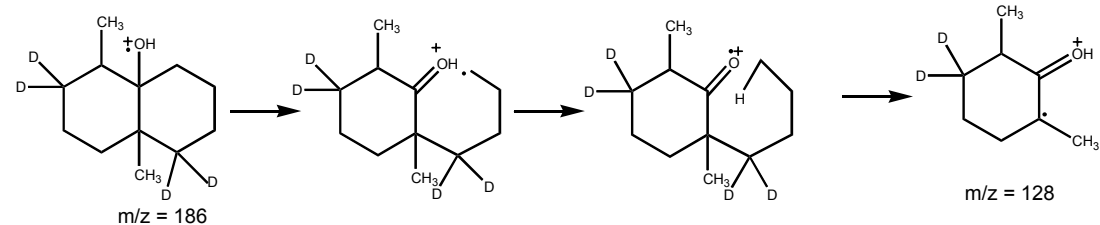
Schema 38: Postulierte Biosynthese von Geosmin ($[^2\text{H}_4]\text{-96}$) nach Verfütterung von $[^2\text{H}_2]$ -Mevalolacton ($[^2\text{H}_2]\text{-105}$) an *Fossombronia pusilla*

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Markierungsexperimente zusammengefasst. Im Schema 39 bzw. Schema 40 lässt sich die Bildung des A-Ring Fragmentes bzw. des B-Ring Fragmentes für die verschiedenen Markierungsversuche nachvollziehen. Die zugehörigen Massenspektren sind in Abbildung 45 zusammengestellt. Der Vergleich der Massenspektren der deuterium-markierten Geosminisotopomere aus sämtlichen Verfütterungsexperimenten bestätigt den vorgeschlagenen Biosyntheseweg für Geosmin. Das Schicksal aller für die Biosynthese von Geosmin (**96**) wichtigen Wasserstoffatome konnte so durch die Verfütterung von drei unterschiedlich markierten Vorstufen an *Streptomyces* spp. und an das Lebermoos *F. pusilla* verfolgt werden.

Tabelle 9: Molekülon, A- und B-Ring Fragment von Geosmin (**96**) und seiner Isotopomere

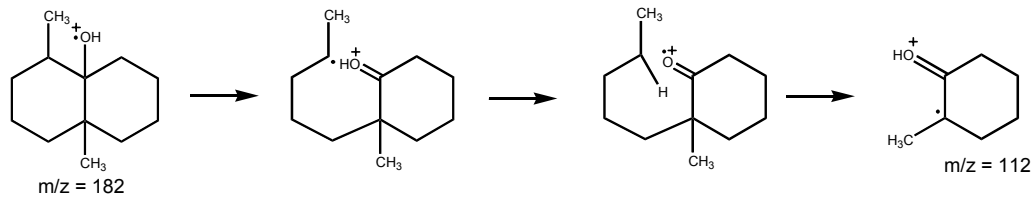
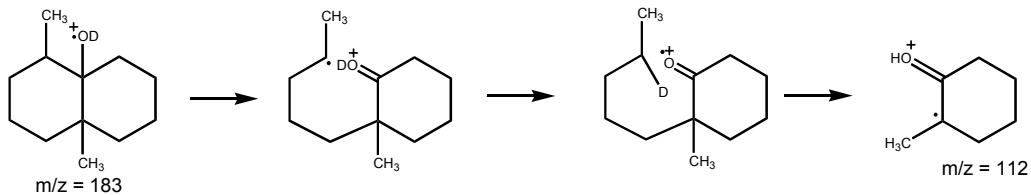
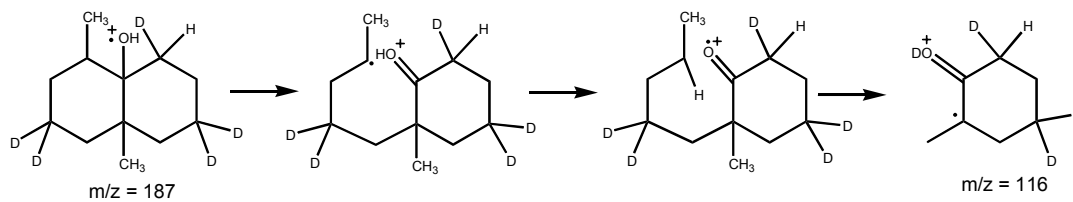
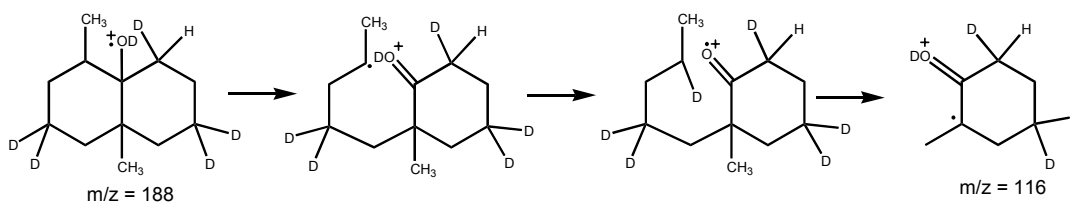
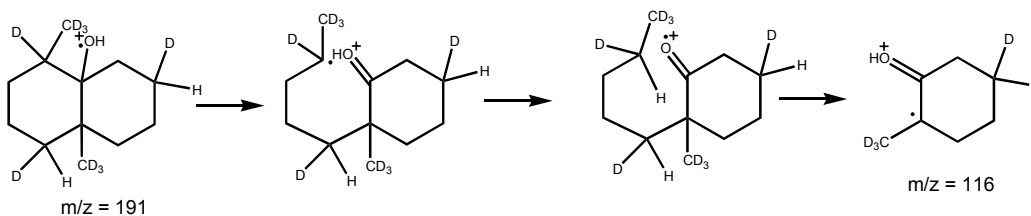
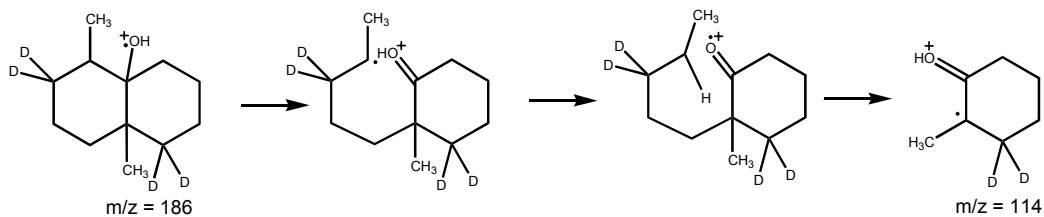
Organismus	Vorstufe	Farnesyl- diphosphat (98)	Geosmin (96)	Molekülon I M ⁺ • m/z	Fragment II m/z	Fragment III m/z
<i>Streptomyces</i> sp. JP95	-	98	96	182	112	126
<i>Streptomyces</i> sp. JP95	- D ₂ O	98	[² H]- 96	183	112	126
<i>Streptomyces</i> sp. JP95	[² H ₂]- 104	[² H ₆]- 98	[² H ₅]- 96	187	116	129
<i>Streptomyces</i> sp. JP95	[² H ₂]- 104 D ₂ O	[² H ₆]- 98	[² H ₆]- 96	188	116	129
<i>F. pusilla</i>	[² H ₅]- 105	[² H ₁₂]- 98	[² H ₉]- 96	191	116	134
<i>F. pusilla</i>	[² H ₂]- 105	[² H ₆]- 98	[² H ₄]- 96	186	114	128

**Abbildung 45:** Vergleich der Massenspektren von Geosmin **96** nach Verfüterung deuterierter Vorstufen an *Streptomyces* sp. und *F. pusilla*.

Geosmin**[²H₁]-Geosmin H/D Austausch*****Streptomyces* sp. JP95 Verfütterung von [²H₂]-DOX: [²H₅]-Geosmin*****Streptomyces* JP95 Verfütterung von [²H₂]-DOX H/D Austausch: [⁶H₂]-Geosmin*****Fossombrossia pusilla* Verfütterung von [²H₅]-Mevalolacton: [²H₅]-Geosmin*****Fossombrossia pusilla* Verfütterung von [²H₂]-Mevalolacton: [²H₄]-Geosmin**

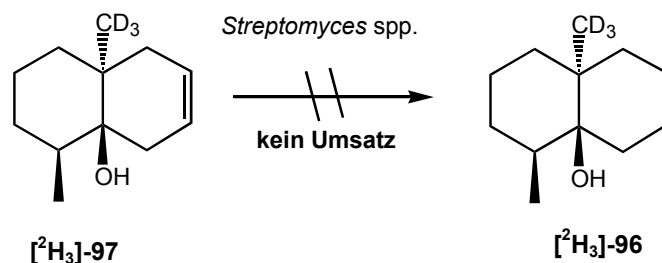
Schema 39: Überblick über die Bildung des A-Ring Fragments von Geosmin (**96**) und deuterierten Geosminen

Geosmin

 $[^2\text{H}_1]$ -Geosmin H/D Austausch*Streptomyces* sp. JP95 Verfütterung von $[^2\text{H}_2]$ -DOX: $[^2\text{H}_5]$ -Geosmin*Streptomyces* sp. JP95 Verfütterung von $[^2\text{H}_2]$ -DOX H/D Austausch: $[^2\text{H}_6]$ -Geosmin*Fossombrossia pusilla* Verfütterung von $[^2\text{H}_5]$ -Mevalolacton: $[^2\text{H}_3]$ -Geosmin*Fossombrossia pusilla* Verfütterung von $[^2\text{H}_2]$ -Mevalolacton: $[^2\text{H}_4]$ -Geosmin

Schema 40: Überblick über die Bildung des B-Ring Fragments von Geosmin (**96**) und deuterierten Geosminen

Um die postulierte Biogenese zu untermauern, wurde an *Streptomyces* spp. synthetisiertes [$^2\text{H}_3$]-Dehydrogeosmin (**[$^2\text{H}_3$]-97**)^[274] verfüttert (siehe Schema 41).



Schema 41: Verfütterung von [$^2\text{H}_3$]-Dehydrogeosmin (**[$^2\text{H}_3$]-97**) an *Streptomyces* spp.

Es wurde keine Umsetzung zum Geosmin (**[$^2\text{H}_3$]-96**) beobachtet, so dass Dehydrogeosmin (**97**) als direkte Vorstufe der Bildung von Geosmin (**96**) bei *Streptomyces* sp. JP95 ausgeschlossen werden kann. Dieser Versuch ist im Einklang mit dem Verfütterungsexperiment von [$^2\text{H}_2$]-DOX (**[$^2\text{H}_2$]-104**) an *Streptomyces* spp., aus dem abgeleitet werden konnte, dass im Gegensatz zur Dehydrogeosminbiosynthese bei der Seitenketteneliminierung eine Doppelbindung zwischen C-3 und C-4 unter Bildung einer Cyclodecatrienzwischenstufe [$^2\text{H}_5$]-106 eingeführt wird (siehe Schema 36).

Bei der Suche nach potentiellen Intermediaten der Geosminbiosynthese im GC-MS Chromatogramm der Duftstoffe von *Streptomyces* sp. JP95 beobachtete man einen Peak für Verbindung **109**.

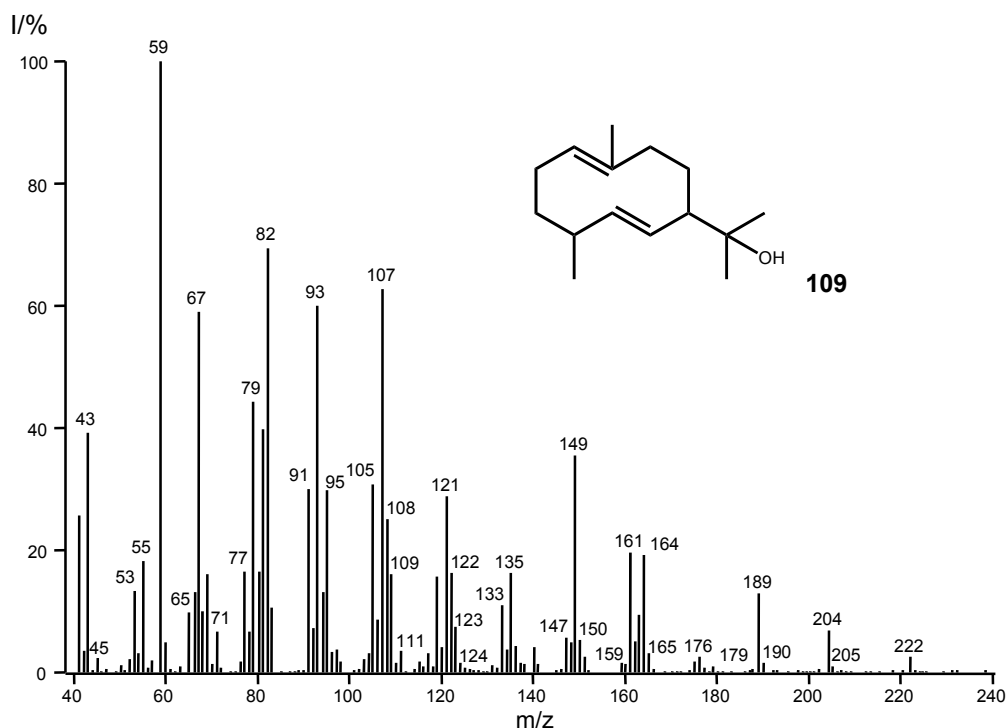
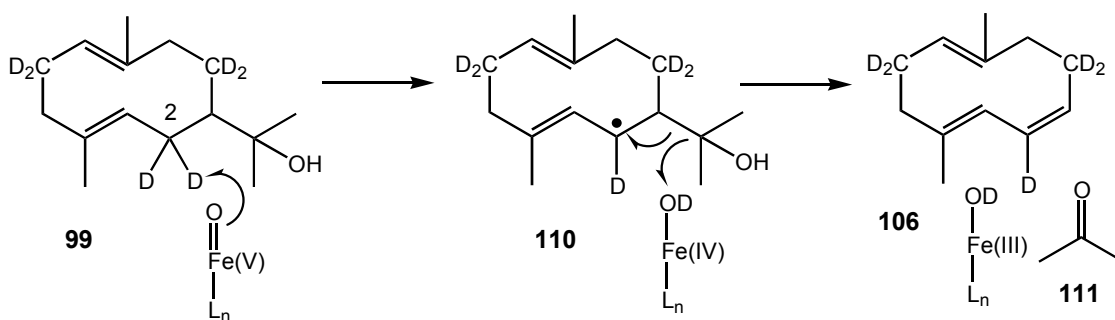


Abbildung 46: EI-Massenspektrum von 1(10)*E*,5*E*-Germacradien-11-ol (**109**) aus dem Duftbouquet von *Streptomyces* sp. JP95.

Aus seinem Molekülion bei $m/z = 222$ in seinem Massenspektrum lässt sich schließen, dass die Verbindung **109** 15 Kohlenstoffatome enthält (siehe Abbildung 46). Das Basision im Massenspektrum dieser Verbindung liegt bei $m/z = 59$. Dies entspricht einem $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{OH}^+$ Ion und ist als gewichtiger Hinweis für das Vorliegen einer Isopropoxyseitenkette zu werten. Unter der Annahme, dass es sich bei der Verbindung um eine Zwischenstufe der Biosynthese des Geosmins (**96**) handeln könnte, wurde nach Vergleichsspektren gesucht. Das Massenspektrum des Metaboliten **109** aus *Streptomyces* sp. JP95 ist in sehr guter Übereinstimmung zum Massenspektrum von 1(10)*E*,5*E*-Germacradien-11-ol aus der Terpendatenbank von Prof. Dr. König (Universität Hamburg).^[279] Die Identität von **109** wurde durch Retentionszeitvergleich mit einer Referenzverbindung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Schulz (Technische Universität Braunschweig) bewiesen.^[280] Damit handelt es sich bei der Verbindung **109** wohl um ein Nebenprodukt der Terpenbiosynthese auf dem Weg zum Geosmin (**96**).

3.4.2.3 Vergleich der Geosmin- mit der Dehydrogeosminbiosynthese

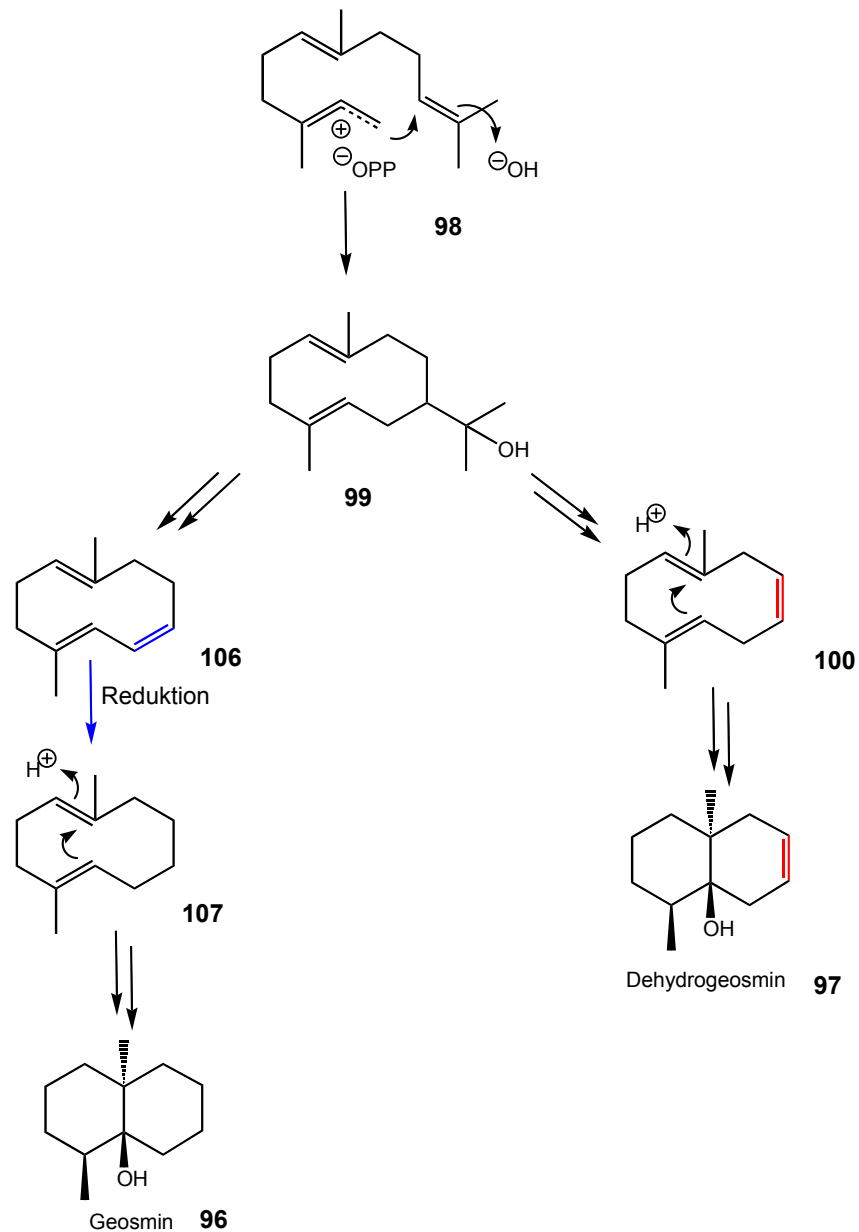
Nach den oben geschilderten Fütterungsversuchen verläuft die Biosynthese von Geosmin (**96**) weitgehend analog zur bereits früher untersuchten Synthese von Dehydrogeosmin (**97**) in Kakteenblüten.^[256] Beide Verbindungen werden aus Farnesylpyrophosphat (**98**) zu einem Germacradienderivat (**99**) cyclisiert. Beim Geosmin (**96**) wird genauso wie bei der Synthese von Dehydrogeosmin (**97**) die Isopropoxyseitenkette vermutlich durch oxidative Dealkylierung unter Verlust von Aceton (**111**) und Ausbildung einer Doppelbindung^[281] zur monocyclischen Trienzwischenstufe **106** eliminiert (Schema 42). Ein solcher Reaktionsverlauf erinnert stark an die oxidative Dealkylierung von (+)-Marmesin zu Psoralen durch ein P450 abhängiges Enzym.^[282] In Analogie zur Psoralen Synthese könnte eine reaktive Fe(V)=O Spezies des Enzyms am C-2 Atom von **99** ein Deuteriumradikal abstrahieren (siehe Schema 42). Aus dem resultierenden allylischen Radikal **110** sollte durch β -Spaltung das Trien **106** und ein *i*-Propyloxyradikal entstehen. Nach Bindung des *i*-Propyloxyradikals an das benachbarte Fe(IV)-OD zerfällt der Komplex sofort zu Aceton (**111**) und Wasser.



Schema 42: Vorgeschlagener Mechanismus zur oxidativen Desalkylierung der Isopropoxyseitenkette unter Ausbildung einer Doppelbindung.

Im Anschluß an die Desalkylierung zum Trien **106** muss die neu eingeführte Doppelbindung selektiv reduziert werden. Eine vergleichbare Reaktion ist vom Steroidstoffwechsel bekannt und im Detail untersucht worden.^[283] Die Cyclisierung des Zehnring-Zwischenproduktes **100** bzw. **107** zum Bicyclus des Dehydrogeosmins **102** oder des Geosmins **108** läuft in gleicher Weise ab: es erfolgt ein elektrophiler Angriff an C-8 von **100** bzw. **107** unter Ausbildung eines tertiären Kations, das durch suprafaciale 1,2-Wasserstoffwanderung stabilisiert wird. Schließlich wird Wasser an das tertiäre Carbokation addiert. Geosmin (**96**) und Dehydrogeosmin (**97**) werden demnach nach dem gleichen Biosyntheseweg hergestellt. Nur der Desalkylierungs-

schritt erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Regioselektivität der Enzyme anders, so dass verschiedene Produkte gebildet werden: Bei der Geosminbiosynthese führt die Desalkylierung zu einem konjugierten Dien (**106**), wohingegen bei der Bildung von Dehydrogeosmin (**100**) eine isolierte Doppelbindung entsteht und erhalten bleibt (siehe Schema 43).



Schema 43: Unterschiedliche Regioselektivität bei der Ausbildung der Doppelbindung bei der oxidativen Abspaltung der Isopropoxyseitenkette von **99** führt zu Geosmin (**96**) bzw. Dehydrogeosmin (**97**)

Da isolierte Doppelbindungen nur selten hydriert werden können, resultiert daraus die Bildung von Dehydrogeosmin (**97**).

Die enge Verwandtschaft der Biogenese von Dehydrogeosmin (**97**) und Geosmin (**96**) könnte Grund dafür sein, dass sich bei Kakteen neben Dehydrogeosmin (**97**) manchmal Spuren von Geosmin (**96**) nachweisen lassen.^[248] In diesem Zusammenhang wäre es höchst interessant festzustellen, ob Dehydrogeosmin (**97**) produzierende Kakteen zur Produktion von Geosmin (**96**) etwa durch Applikation einer Cyclodecatrienzwischenstufe **106** stimuliert werden können. Auf diese Weise ließe sich untersuchen, ob Dehydrogeosmin (**97**) ein Evolutionsprodukt der Geosminbiosynthese (**96**) ist, bei der eine Verschiebung der Einführung der Doppelbindung bei der oxidativen Seitenkettenabspaltung eine nachfolgende Hydrierung verhindert. Ist die veränderte Regioselektivität der Ausbildung der Doppelbindung bei der oxidativen Desalkylierung zu Dehydrogeosmin (**97**) das Resultat einer Mutation des dehydrierenden Enzyms der Geosminbiosynthese? Zur Klärung dieser Spekulationen, wäre es spannend zu untersuchen, ob Kakteen über ein Enzym verfügen das in der Lage ist, das Cyclodecatrien-Zwischenprodukt der Geosminbiosynthese **106** zu reduzieren.

4 Zusammenfassung und Ausblick

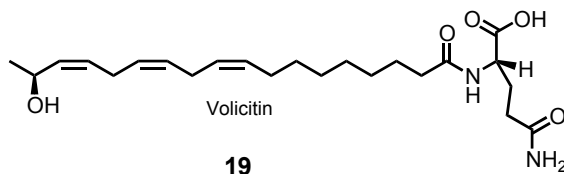
Volicitin [*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin] (**19**) aus dem Regurgitat von Raupen wird eine bedeutende Rolle bei der natürlichen Abwehr pflanzlicher Schädlinge zugeschrieben, denn diese Verbindung bewirkt bei Insektenfraß an Mais die Bildung flüchtiger Stoffe, die natürliche Feinde der Herbivoren anlocken.^[61] In jüngster Zeit wurden weitere *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat von Lepidoptera Larven gefunden, die ebenfalls die Abgabe von flüchtigen Verbindungen induzieren.^[67]

Screening nach *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten im Regurgitat von Lepidopteren

Um die Verbreitung von *N*-Acyl-aminosäuren zu untersuchen, analysierte ich Regurgitat bzw. Darminhalt von 16 Arthropoden. 8 Arten enthielten *N*-Acyl-glutaminkonjugate, was die weite Verbreitung dieser Verbindungen belegt. *N*-Acyl-glutaminkonjugate ließen sich fast ausschließlich bei polyphagen Insekten nachweisen. Im Regurgitat von monophagen Raupen wie *Pieris brassicae* waren dagegen *N*-Acyl-glutaminkonjugate nicht nachweisbar. Da aber diese bei Kohlpflanzen die Biosynthese von Duftstoffen auslösen, können *N*-Acyl-glutaminkonjugate nicht als allgemeine Elicitoren zur Induktion der Duftstoffbiosynthese angesehen werden.

Stereochemie der 17-Hydroxygruppe von Volicitin

Die Stereochemie der 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) [*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin] konnte nach Methanolyse und Derivatisierung mit (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) zum (17*S*,1'*R*)-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(**17S**)-**31**] durch Trennung der Diastereomeren mit GC-MS und Vergleich mit Referenzverbindungen bestimmt werden. Die 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) von vier untersuchten Raupenarten (*S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *H. virescens*) ist *S* konfiguriert mit 92 % ee bis 96 % ee.

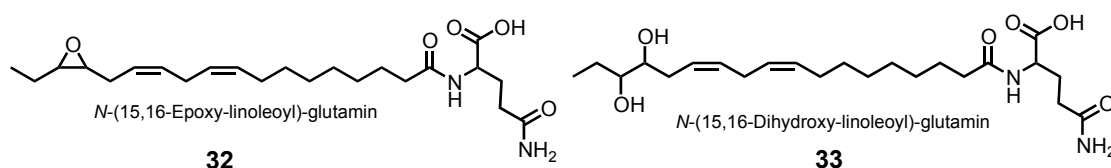


Schema 44: Stereochemie der 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) [(**17S**)-*N*-(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin]

Der Enantiomerenüberschuss beweist, dass die Hydroxygruppe durch eine enzymatische Reaktion - möglicherweise ein P450 abhängiges Enzym - gebildet wird.

***N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin**

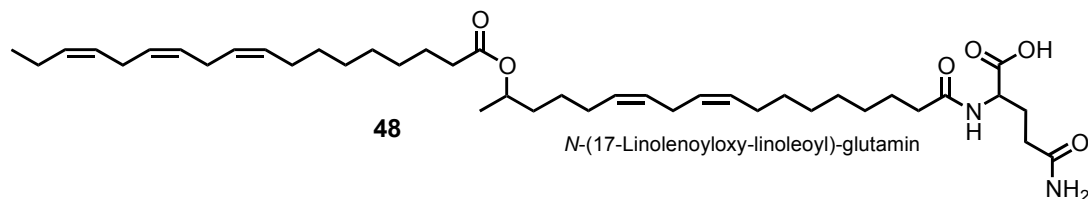
Bei der Analyse des Regurgitates von *Spodoptera* Larven wurden zwei bisher unbekannte Konjugate, *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) (Schema 45), identifiziert und synthetisiert. Das Auftreten dieser Verbindungen ist bemerkenswert, da verwandte Epoxy- und Dihydroxyfettsäuren sich durch hohe biologische Wirksamkeit auszeichnen.



Schema 45: Strukturen von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**)

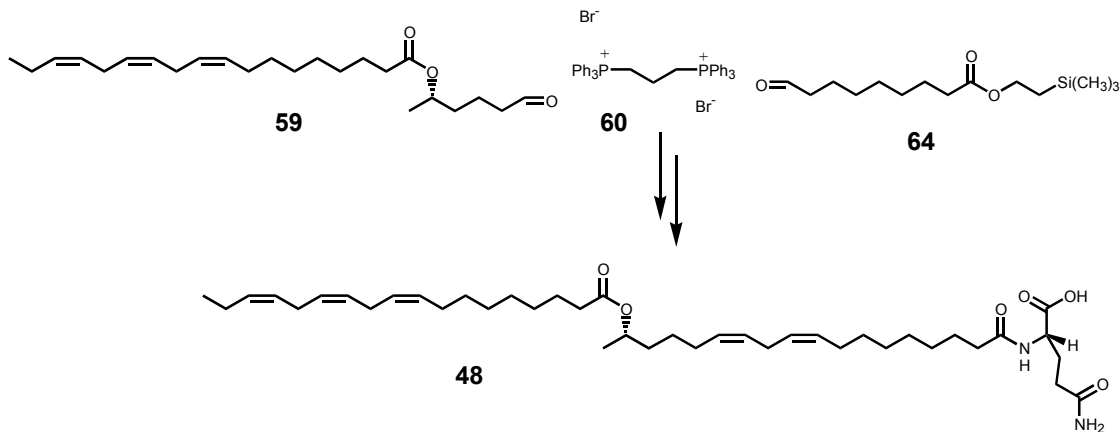
***N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamine**

Neben den polaren *N*-Acyl-glutaminderivaten konnte ich erstmals im Regurgitat von Lepidopteren eine Gruppe von *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugaten z. B. *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**) (Schema 46) nachweisen.



Schema 46: Struktur von *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**)

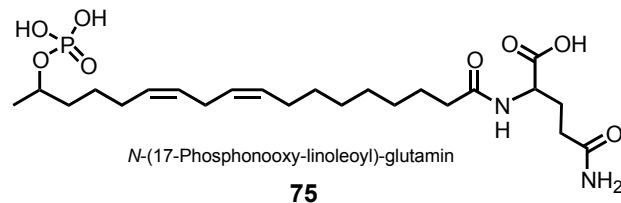
Zum Strukturbeweis habe ich (17*S*)-*N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**) synthetisiert. Dazu wurde sequentiell (1*S*)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) und 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) mit Propan-1,3-bistriphenylphosphoniumbromid (**60**) in einer disymmetrischen Bis-Wittig Olefinierung umgesetzt (siehe Schema 47) und nach Entschützen mit L-Glutamin (**24**) zum Zielmolekül **48** konjugiert.



Schema 47: Synthese von (17*S*)-*N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**)

***N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminkonjugate**

Im Regurgitat von *S. exigua* Larven gelang der Nachweis von bisher unbekanntem phosphorylierten Hydroxyfettsäurederivaten *N*-(17-Phosphonoxy-linolenoyl)-glutamin (**76**) und *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**) (Schema 48). Die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften von *N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminen wird zeigen, ob *N*-(17-Hydroxy-acyl)-glutamine durch Phosphorylierung aktiviert werden.



Schema 48: Struktur von *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**) aus dem Regurgitat von *S. exigua* Larven

Biosynthese von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten durch Darmbakterien der Raupen

Nach Isolierung von Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven stellte ich fest, dass mehr als 50 % der isolierten Mikroorganismen in der Lage waren, *N*-Acylaminosäurekonjugate herzustellen. Bei *in vitro* Versuchen zeigten Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven eine geringe Selektivität bezüglich der Fettsäure- und Aminosäurekomponente bei der Bildung von *N*-Acylaminosäurekonjugaten. Dagegen findet man im Regurgitat von Raupen ausschließlich *N*-Acyl-glutamin- oder *N*-Acylglutamatkonjugate. Durch Injektion von [$^2\text{H}_5$]-Glutamin (**[$^2\text{H}_5$]-24**) in die Hämolymphe von *S. exigua* Larven konnte ich

zeigen, dass die Raupe Glutamin (**24**) in den Darm transportiert, das dort rasch mit Fettsäuren zu *N*-Acyl-glutaminen konjugiert wird.

Diese kooperative Bildung von Konjugaten legt ein enges symbiotisches Verhältnis von Darmbakterien und Raupe nahe.

Durch Verfütterung des Antibiotikums Fosmidomycin (**86**) konnte die Konzentration der Konjugate im Regurgitat von *S. frugiperda* Larven drastisch reduziert werden, was als ein Indiz für eine mögliche ausschließliche Synthese der *N*-Acyl-glutamine durch Mikroorganismen gewertet werden kann. Allerdings konnte bei *S. exigua* Larven nach Verabreichung von Fosmidomycin (**86**) keine Abnahme der Konjugate beobachtet werden. Daher sollten mikroorganismenfreie Raupen auf ihre Fähigkeit zur Konjugatbildung untersucht werden. Erste Versuche mikroorganismenfreie Raupen zu erhalten, gestalteten sich schwierig. Bisher enthielt das Regurgitat der unter sterilen Bedingungen angezogenen Raupen immer noch *N*-Acyl-glutamin-konjugate. Daher konnte nicht endgültig bewiesen werden, ob nur die Darmbakterien oder auch die Raupen selbst in der Lage sind, *N*-Acyl-glutaminkonjugate zu produzieren.

***N*-Acyl-glutamine als Tenside**

N-Acyl-glutamine sind ausgezeichnete Tenside. Als Emulgatoren erleichtern diese Verbindungen der Raupe die Nahrungsaufnahme und bieten einen gewissen Schutz gegen Fraßfeinde, indem sie das Regurgitat besonders schlüpfrig machen. Andererseits sind die Tensideigenschaften möglicherweise auch Ursache dafür, dass *N*-Acyl-glutamine als Elicitoren wirken. Durch Wechselwirkungen mit den Lipidmembranen von Pflanzenzellen induzieren *N*-Acyl-glutamine Depolarisation oder Hyperpolarisierung der Membranen, wodurch Signalprozesse ausgelöst werden könnten.

In Bioassays mit Limabohnen (*Phaseolus lunatus*) konnte in keinem Fall die Induktion der Duftstoffbiosynthese durch *N*-Acyl-glutaminderivate oder Volicitin beobachtet werden. Dieser Befund spricht dafür, dass *N*-Acyl-glutaminkonjugate nur für bestimmte Pflanzen als Elicitoren der Duftstoffbiosynthese wirken.

Multitrophische Systeme

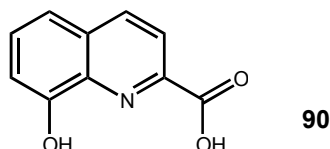
Insgesamt zeigt das Beispiel der *N*-Acyl-glutamin-konjugate, dass natürliche Systeme viel komplexer sind als bisher vermutet wurde. Die Annahme, dass ein

tritrophisches System zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Herbivor, Pflanze und Predator ausreicht, muss deshalb unter Einbeziehung von Mikroorganismen erweitert werden.

Stark basischer pH als Elicitor der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese

Ein verlässlicher Elicitor der Duftstoffbiosynthese bei der Limabohne hingegen ist ein stark basischer pH Wert. So induziert 1 %-ige NaOH Lösung (pH 12.6) die Duftstoffbiosynthese bei der Limabohne. Da Raupenregurgitat einen pH Wert von etwa 10-11 aufweist, könnte der basische pH einen Beitrag bei der Induktion der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese leisten.

8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90) ein Komplexbildner im Regurgitat

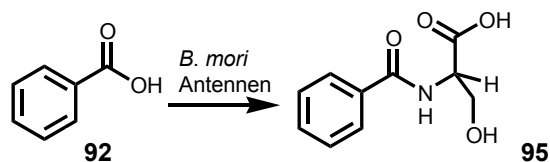


Schema 49: 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90)

Der Chelator 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90) (siehe Schema 49) wurde im Regurgitat von *Spodoptera* Larven nachgewiesen. Gelangt die Verbindung 90 beim Raupenfraß in verletzte Blätter, so könnten durch Komplexbildung mit Metallionen Signalprozesse beeinflusst werden.

Konjugation zur Desaktivierung von Duftstoffen durch *Bombyx mori*

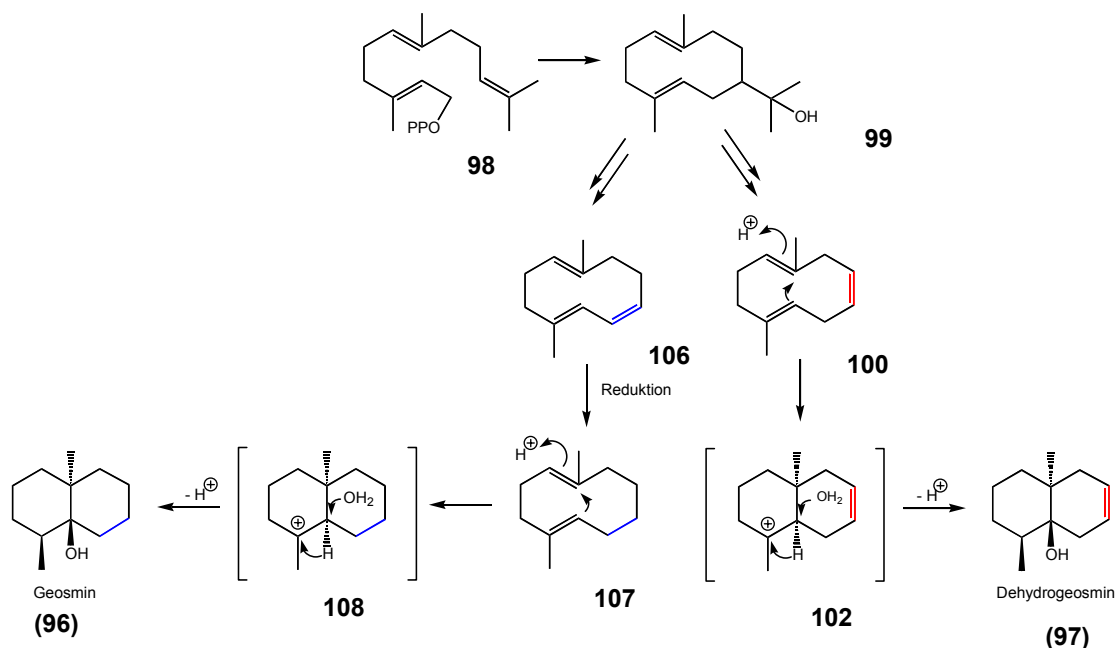
Ein zweiter Teil meiner Dissertation beschäftigte sich mit der Desaktivierung von Benzoesäure (92), die neben Bombykol von den Antennen des Seidenspinners (*B. mori*) wahrgenommen wird. Durch Inkubation von Benzoesäure (92) und [²H₅]-Benzoesäure ([²H₅]-92) mit *B. mori* Antennen konnte ich zeigen, dass Benzoesäure (92) in den Antennen zu *N*-Benzoylserin (95) metabolisiert wird (Schema 50). Dadurch wird vermutlich Benzoesäure (92) als Signal desaktiviert.



Schema 50: Metabolisierung von Benzoesäure (92) in *B. mori* Antennen zu *N*-Benzoylserin (95)

Biosynthese von Geosmin (96) – Produktselektivität durch unterschiedliche Regioselektivität bei oxidativer Bindungsspaltung

Der dritte Teil meiner Arbeit ist der Untersuchung der Biosynthese von Geosmin (96), einem Sekundärmetaboliten vieler Mikroorganismen und Pflanzen, gewidmet. Wegen seines erdigen Geruches verursacht Geosmin (96) beträchtliche Probleme bei der Trinkwasseraufbereitung. Die Biosynthese von Geosmin (96) wurde durch Verfütterung markierter Vorstufen – Mevalolacton (105) und Desoxy-D-xylulose (104) - an das Lebermoos *Fossombronia pusilla* und Streptomyceten durch massenspektrometrische Analyse der Produkte untersucht (siehe Schema 51). Geosmin (96) entsteht in beiden Organismen durch Cyclisierung von Farnesylpyrophosphat (98) zu einem Germacradienderivat (99), Abspaltung der C-3-Seitenkette unter Ausbildung einer Doppelbindung zu 106, Hydrierung dieser Doppelbindung zu 107, Bicyclisierung und 1,2-Wasserstoffwanderung sowie Wasseranlagerung (siehe Schema 51). Damit verläuft die Biosynthese weitgehend gleich zur Bildung von Dehydrogeosmin (97). Allerdings entsteht bei Verlust der Hydroxyisopropyl-Seitenkette beim Geosmin (96) ein anderes Zwischenprodukt 106 als bei der Bildung von Dehydrogeosmin (97). 106 weist ein konjugiertes Doppelbindungssystem auf, während bei der Bildung von Dehydrogeosmin (97) eine isolierte Doppelbindung im Zwischenprodukt 100 entsteht, die nicht hydriert werden kann.



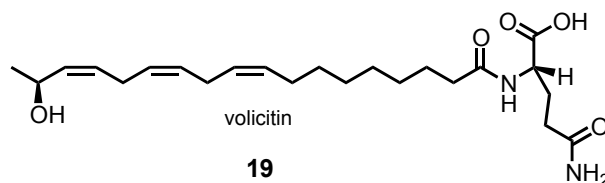
Schema 51: Unterschiede der Biosynthese von Geosmin (96) und Dehydrogeosmin (97)

5 Summary

In recent years volicitin (**19**) and *N*-Acyl-glutamine conjugates from the regurgitate of lepidopteran larvae attracted great interest because these compounds were claimed to elicit plant volatile biosynthesis.^[61, 67]

Stereochemistry of the 17-hydroxy group of volicitin

The stereochemistry of the 17-hydroxy group of volicitin (**19**) was determined by GC-MS and comparison with reference compounds after methanolysis and derivatisation with (1*R*)-1-phenylethylisocyanate (**30**). Volicitin (**19**) isolated from four lepidopteran species investigated is *S* configured (94 % ee) (Scheme 1).

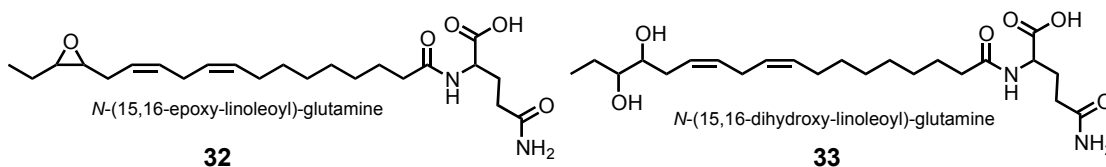


Scheme 1: Stereochemistry of the 17-hydroxy-group of volicitin (**19**)

This result proves the involvement of an enzyme in the hydroxylation step.

N-(15,16-epoxy-linoleoyl)-glutamine (**32**) and *N*-(15,16-dihydroxy-linoleoyl)-glutamine (**33**)

A cytochrome P450 dependent enzyme may be involved since also *N*-(15,16-epoxy-linoleoyl)-glutamine (**32**) and *N*-(15,16-dihydroxy-linoleoyl)-glutamine (**33**) conjugates were also found in the regurgitate of lepidopteran larvae (Scheme 2).

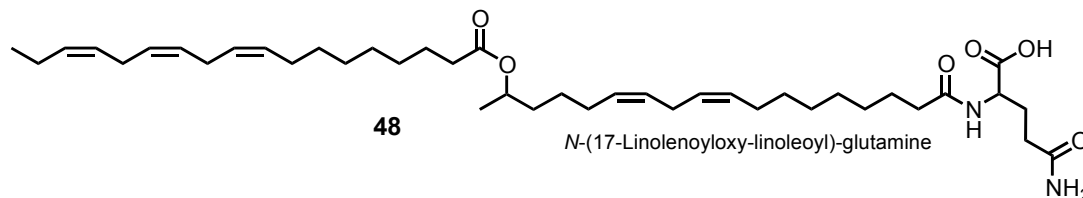


Scheme 2: *N*-(15,16-Epoxylinoleoyl)-glutamine (**32**) and *N*-(15,16-dihydroxylinoleoyl)-glutamine (**33**)

The occurrence of both compounds is remarkable since related free acids show high biological activity.

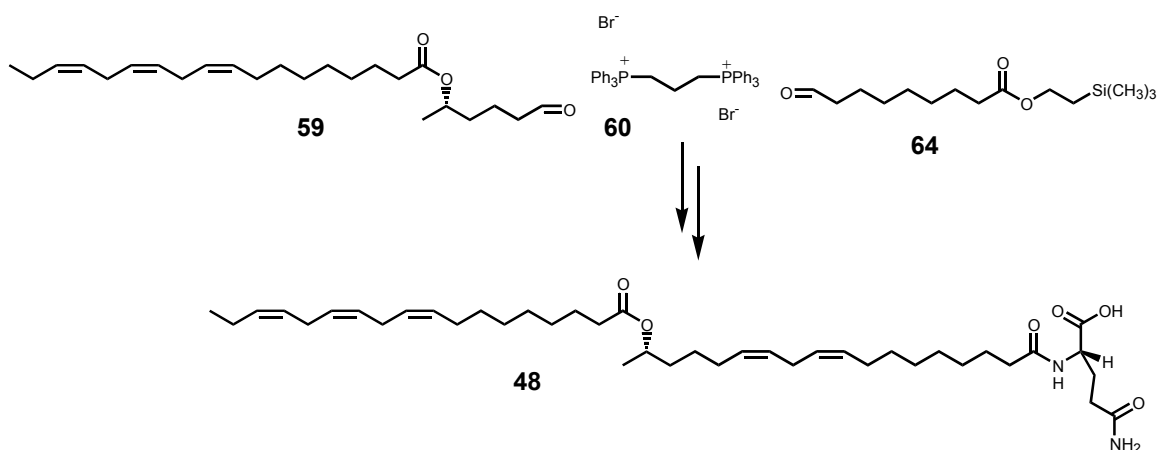
***N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamines**

Besides these polar *N*-acyl-glutamines a series of *N*-(17-acyloxy-acyl)-glutamine conjugates such as *N*-(17-linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamine (**48**) were identified in the regurgitate of lepidopteran larvae (Scheme 3).



Scheme 3: *N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamine (**48**)

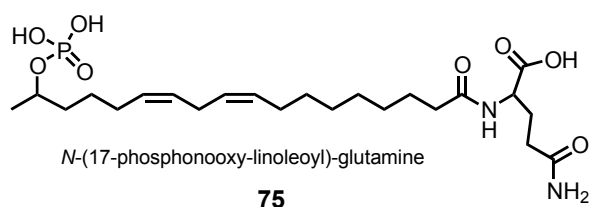
(17*S*)-*N*-(17-linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamine (**48**) was synthesized using a bis-Wittig olefination for the formation of 17-linolenoyloxy-linoleic acid (2-trimethylsilylethyl)-ester (**62**) by condensation of (1*S*)-linolenic acid-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) and 9-oxononanoic acid (2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) with propane-1,3-bis(triphenylphosphonium)bromide (**60**) (Scheme 4).



Scheme 4: Synthesis of (17*S*)-*N*-(17-linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamine (**48**)

***N*-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutamines**

N-(17-Phosphonoxy-linolenoyl)-glutamine (**76**) and *N*-(17-phosphonoxy-linoleoyl)-glutamine (**75**) were detected in the regurgitate of *S. exigua* larvae (Scheme 5). Phosphorylated derivatives of hydroxyfatty acids have been so far unknown. Since phosphorylation is often used for activation of compounds in nature, biological activity of these compounds might be expected.



Scheme 5: *N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamine (**75**)

Biosynthesis of *N*-acyl-L-glutamine conjugates by gut bacteria

N-Acyl-amino acids have been known as natural products from microorganisms for a long time leading to the hypothesis that *N*-acyl-glutamines might be generated by gut bacteria. Indeed microorganisms isolated from the gut of lepidopteran larvae are able to produce *N*-acyl-glutamine conjugates. However, *in vitro* the microorganisms showed a broad acceptance of amino acids and fatty acids for the formation of acyl-amino acid conjugates, whereas in the regurgitate of *Spodoptera* larvae only *N*-acyl-glutamine conjugates are formed. It could be shown by injection of [²H₅]-glutamine ([²H₅]-**24**) in the hemolymph of *S. exigua* larvae that selective formation of *N*-acyl-L-glutamines is due to the supply of L-glutamine (**24**) in the gut by the caterpillar. Such a cooperative formation of compounds suggests an intense symbiotic relationship between caterpillar and gut bacteria.

N-Acyl-L-glutamine conjugates as surfactants

N-Acyl-L-glutamine conjugates serve the caterpillar as surfactants in the digestive process. Their character as surfactants may be the reason for their potential to elicit plant volatile biosynthesis in some plants by interaction of *N*-acyl-L-glutamines with the plant lipid membranes and induction of membrane depolarisation. This might induce further signaling cascades. However, in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) plant volatile biosynthesis is not elicited, in contrast to corn plants, after application of *N*-acyl-L-glutamine conjugates.

Fosmidomycin reduces *N*-acyl-glutamines in the regurgitate of *Spodoptera frugiperda* larvae

The concentration of *N*-acyl-glutamines in the regurgitate could be reduced significantly after application of the antibiotic fosmidomycin (**86**) to *S. frugiperda* larvae, indicating that the gut bacteria are the only producers of *N*-acyl-L-glutamines. However, in the same experiment no reduction of *N*-acyl-L-glutamine conjugates was

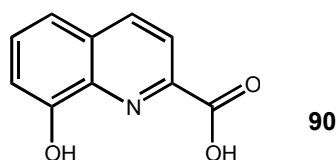
observed with *S. exigua* larvae. First experiments to obtain germ free caterpillars were not conclusive.

Multitrophic systems

In summary, the investigations on the *N*-acyl-glutamines show that the interactions between plants, herbivores and their predators are much more complex than to be described by the often used tritrophic model. Microorganisms seem to play an important role in these interactions.

8-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, a chelator in the regurgitate

The chelator 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**90**) (Scheme 6) was isolated from regurgitate of *Spodoptera* larvae. It is possible that **90** will influence plant signalling by complexation of bivalent metal ions if introduced in damaged leaves during caterpillar feeding.



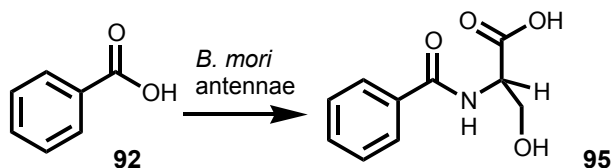
Scheme 6: 8-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**90**)

Plant volatile emission induced by high pH

Incubation of Lima beans with solutions of NaOH or KOH (pH 12.6) lead to the emission of volatiles. This might be important because the oral secretion of caterpillars is of high pH (10-11).

Conjugation of odour molecules in *Bombyx mori* antennae

Besides pheromone reception, *B. mori* odorant receptors in the antennae are highly sensitive to benzoic acid (**92**). The metabolism of benzoic acid (**92**) in *B. mori* antennae was studied by incubation of labelled benzoic acid ($[^2\text{H}_5]$ -**92**) with freshly cut antennae.

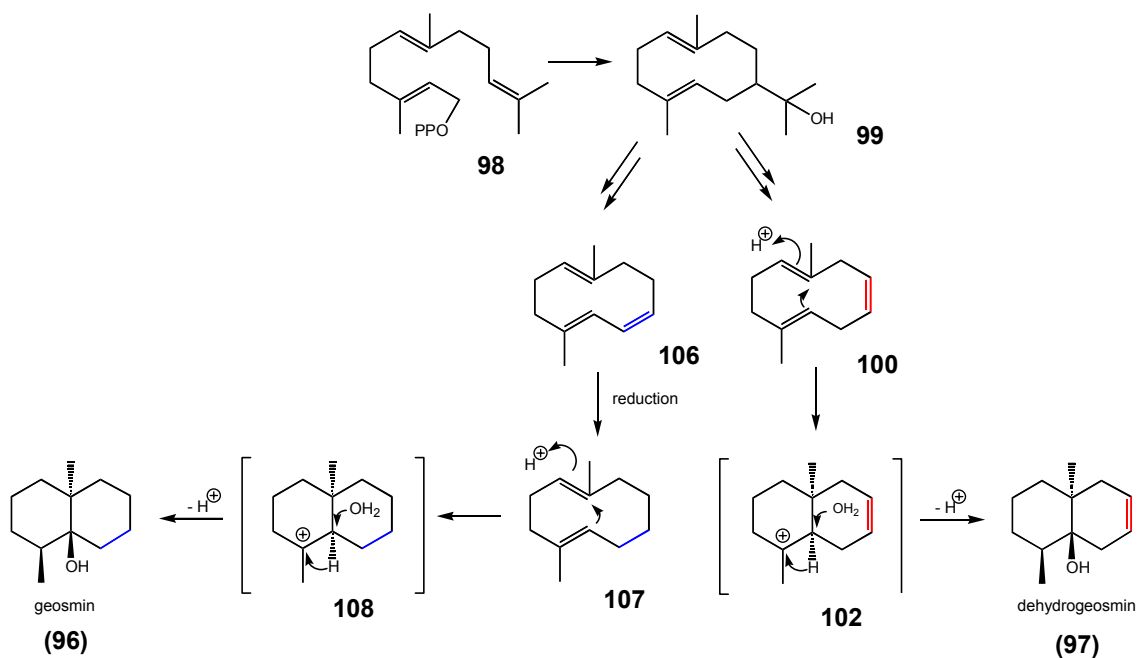


Scheme 7: Metabolism of benzoic acid (**92**) in *B. mori* antennae

By GC-MS analysis benzoic acid (**92**) was demonstrated to be converted rapidly to *N*-benzoylserine (**95**). In this case conjugation may serve for the deactivation of recognized odorous molecules (Scheme 7).

Biosynthesis of Geosmin

The tris-nor-sesquiterpenoid geosmin (**96**) is a well known scent. Its characteristic earthy-musty odour causes great problems for drinking water supply. The biosynthesis of geosmin was studied by application of labelled 1-deoxy-D-xylulose (**104**) and mevalolactone (**105**) to the liverwort *Fossombronia pusilla* and *Streptomyces* spp.. In both organisms geosmin (**96**) is formed by cyclisation of farnesylpyrophosphate (**98**) to a germacradiene intermediate (**99**). Oxidative loss of the C-3 side chain results in a cyclodecatriene (**106**) which is hydrogenated to **107**. Bicyclisation, 1,2 H-shift and hydroxylation leads to geosmin (**96**). The biosynthesis of geosmin (**96**) is analogous to the formation of dehydrogeosmin (**97**) except for the different regioselectivity in the oxidative cleavage of the *i*-propyloxy side chain (Scheme 8).



Scheme 8: Biosynthesis of geosmin (**96**) and dehydrogeosmin (**97**)

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Geräte

6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem Avance DRX 500 bzw. Bruker AV 400 aufgenommen.

Die chemische Verschiebung δ wird in ppm, die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Lösungsmittel, das als interner Standard dient: ^1H -Signal: CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm bzw. ^{13}C -Signal CDCl_3 $\delta = 77.70$ ppm; ^1H -Signal: CD_3OD $\delta = 3.31$ ppm bzw. ^{13}C -Signal CD_3OD $\delta = 49.00$ ppm.

6.1.2 Massenspektrometrie (MS)

6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS)

EI- und GC-MS Spektren wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV mit folgenden Geräten aufgenommen:

Finnigan Trace MS; GC-Säule: Alltech EC 5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm .

Finnigan GCQ; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm .

Finnigan MAT Magnum; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm .

Hochauflösende Massenspektren wurden entweder mit Direkteinlass oder unter Verwendung einer Kopplung mit einem Gaschromatographen aufgenommen: Micromass MassSpec 2 verbunden mit einem HP 6890 Gaschromatographen; GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25 μm .

Perfluorokerosen (PFK, Aldrich, D-82041 Deisenhofen, Deutschland) wurde als Kalibrierungsgas verwendet.

6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS)

Für ESI-MS und APCI-MS Messungen wurden ein Ion-Trap Gerät bzw. ein Triplequadrupol-Massenspektrometer verwendet:

Thermoquest LCQ mit APCI und ESI Ionenquelle; HPLC: HP 1100 System; analytische HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP Microboresäule 120 mm x 2 mm, 3 µm.

Micromass Quattro II mit APCI und ESI Ionenquelle; HPLC: HP 1100 System; analytische HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP Microboresäule 120 mm x 2 mm, 3 µm.

Hochauflösende ESI-Messungen wurden durch direkte Injektion der Probe in das Gerät gemessen; Kalibrierung durch eine Polyethylenglykol-Mischung.

6.1.3 Infrarotspektrometrie (IR)

Infrarotspektren wurden mit einem Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer aufgenommen. Flüssige Substanzen wurden als Film mit NaCl-Platten und Feststoffe als KCl-Preßlinge gemessen.

6.1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für HPLC-Trennungen wurde ein HP1100 System mit binärer Pumpe (0.2 – 5 ml/min Flussrate), Entgaser, Autosampler, Säulenofen und Diodenarraydetektor eingesetzt. Für semipräparative Trennungen konnte ein Fraktionssammler (Gilson 206) benutzt werden.

Für HPL-Chromatographie wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität eingesetzt. Wasser wurde von einer Quarzdestillationsanlage entnommen.

Die verwendeten HPLC Säulen und Trennbedingungen werden beim jeweiligen Versuch angegeben.

6.1.5 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Zur Trennung größerer Substanzmengen unter RP-18 Chromatographiebedingungen (>100 mg) wurde eine Büchi B688-Mitteldruckanlage eingesetzt.

6.1.6 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma Merck verwendet. Zur Detektion wurde die DC-Folie nach Anfärbung im Tauchbad mit dem Heißluftfön entwickelt.

Tauchbad: 2.5 g Molybdatophosphorsäure, 1 g Cer(IV)sulfat, 6 ml Schwefelsäure, 65 ml Wasser.

6.1.7 Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde an Kieselgel von ICN (Silica 32-60, 60 Å) unter Druck (Flash-Chromatographie) durchgeführt. Die Eluenten sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

6.1.8 Strippingpumpen und Festphasenmikroextraktion (SPME)

Flüchtige Verbindungen wurden entweder mit der „Closed Loop Stripping“ (CLS) Technik^[284] oder durch SPME^[285] gesammelt.

Für CLS-Versuche wurden Miniaturdrehchieberpumpen der Firma Fürgut (D-88139 Aitrach) eingesetzt.

Die Duftstoffe wurden an Aktivkohlefiltern 1.5 mg Aktivkohle, Länge 60 mm, Durchmesser 5 mm adsorbiert (CLSA, le Ruisseau de Montbrun, F-0935 Daumazan sur Arize, Frankreich).

6.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

6.2.1 Lösungsmittel und Arbeiten unter Schutzgas

Für die Synthesen wurden entweder käufliche trockene Lösungsmittel über Molekularsieb oder nach Standardmethoden getrocknete Lösungsmittel verwendet. Petrolether, Essigester und Ether wurden vor der Verwendung destilliert.

Für luft- bzw. feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden Kolben im Hochvakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt und Argon als Schutzgas verwendet.

6.2.2 Derivatisierungsmethoden zur GC-MS Analyse

6.2.2.1 Derivatisierung mit *N*-Methyl-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)

Zu etwa 0.05-0.5 mg der zu derivatisierenden Probe wurden in einem GC-Vial 10-50 µl *N*-Methyl-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) gegeben und 60 min bei 40°C im Thermomixer geschüttelt. Je nach Konzentration der Probe wurde die Lösung vor der GC-MS Analyse mit Ether oder Dichlormethan verdünnt und 0.1-1µl dieser Lösung in das GC-MS injiziert.

6.2.2.2 Methylierung mit Diazomethan

Zu etwa 0.05-0.5 mg der zu derivatisierenden Probe wurden 250 µl ca. 5 %-ige etherische Diazomethanolösung gegeben. Nach 5 min wurde das überschüssige Diazomethan und die Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen.

6.3 Haltung der Herbivoren

Gelege von *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda* und *Heliothis virescens* wurden regelmäßig von der Firma BAYER zur Verfügung gestellt (Dr. A. Elbert, Mohnheim, Zentrum für tierische Schädlinge). *Spodoptera littoralis* Eier wurden entweder von der Abteilung Prof. Gershenson (Max Planck Institut für chemische Ökologie, Jena, Abteilung Biochemie) oder von der biologischen Bundesanstalt (Dr. H. Bathon) in Darmstadt bezogen. Aus den Eiern geschlüpfte Raupen wurden mit einer künstlichen Diät ernährt (siehe unten). Die Raupen wurden in Plastikbehältern mit Gazedeckel bei 23 – 25 °C bei einem Tag/Nacht Rhythmus (16 h hell und 8 h dunkel) gehalten. Jeden 3. Tag wurden die Raupen in frische Dosen mit neuer Kunstnahrung gesetzt.

Kunstpahrung:

500 g gemahlene weiße Bohnen wurden über Nacht in 1200 ml Wasser eingeweicht, am nächsten Tag wurden 9 g Vitamin C, 9 g Paraben und 4 ml Formalin eingerührt. 75 g Agar in 1000 ml H₂O wurden aufgekocht und mit dem Bohnenbrei vermischt.^[286] Alternativ wurden Raupen auf frischen Bohnenblättern gehalten.

Die monophagen Kohlweißlingslarven *Pieris brassicae*, *Pieris rapae* und *Pieris napae* wurden entweder in der Natur gesammelt oder von silkworm supplies (England) bezogen. Die Larven wurden mit Weißkohlblättern ernährt.

Gryllus bimaculatus stammte aus einer Zucht der Tierökologie der Universität Bayreuth.

Manduca sexta Larven wurden auf Tabakpflanzen von der Abteilung Prof. Baldwin (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) angezogen.

6.4 Sammlung von Regurgitat

Um Regurgitat von Insektenlarven zu sammeln, wurden diese mit einer Federstahlpinzette am Hinterkopf gepackt und mit sanften Druck gereizt bis ein Tropfen des Regurgitates an den Mandibeln erschien, den man in einer Kapillare sammelte.

Zur Analyse von Regurgitat per HPLC-MS wurde dieses mit der gleichen Menge Methanol versetzt. Dann wurde das Gemisch bei 13000 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne weitere Probenvorbereitung für die LC-MS Analyse verwendet.

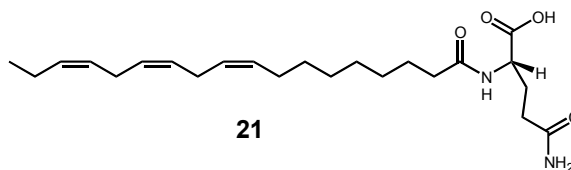
6.5 Screening von Insekten nach *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

Um einen Eindruck über die Verbreitung und Variabilität der *N*-Acyl-aminosäurekonjugate zu bekommen, wurde Regurgitat von 16 Insekten (insbesondere Lepidopteren) auf *N*-Acyl-aminosäurekonjugate per LC-MS untersucht. Dazu wurde entweder Regurgitat gesammelt, oder die Insekten wurden nach Einfrieren seziiert und ihr Vorderdarminhalt analysiert. Zu den Regurgitatproben wurde jeweils die gleiche Menge Methanol gegeben, bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand direkt per LC-MS untersucht. Die Konjugate wurden mit Hilfe ihres Massenspektrums und durch Vergleich mit Massenspektren synthetischer Referenzverbindungen identifiziert (siehe Tabelle 1).

6.6 Synthese von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

6.6.1 *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**)

Zu 500 mg (1.8 mmol) Linolensäure (**3**) in 20 ml trockenem THF in einem 100 ml Zweihalskolben wurden unter Rühren bei 0 °C 275 µl Triethylamin



und 190 µl Chlorameisensäureethylester gegeben.^[100] Nach 2 min wurden 550 mg (3.9 mmol) L-Glutamin (**24**) - gelöst in 14 ml 0.3 N NaOH - rasch zugegeben. Nach 5 min wurde das Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur weitere 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit 2 N HCl abgebrochen. Es wurde 3-mal mit je 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde per MPLC (H₂O: MeOH 20:80) gereinigt.

Ausbeute: 566 mg (77 %)

IR (cm⁻¹, KBr): 3430 s, 3367 s, 3320 s, 3227 w, 3011 m, 2959 m, 2924 s, 1730 m, 1693 s, 1662 s, 1646 s, 1625 s, 1536 m, 1510 m, 1465 m, 1445 w, 1420 w, 1353 w, 1310 w, 1259 w, 1210 w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.98 (t, *J* = 7.53, 3 H), 1.24-1.40 (m, 8 H), 1.59-1.69 (m, 2 H), 2.01-2.13 (m, 5 H), 2.15-2.23 (m, 1 H), 2.26 (pt, *J* = 7.59, 2 H), 2.42-2.51 (m, 1 H), 2.61-2.71 (m, 1 H), 2.81 (pt, *J* = 5.97, 4 H), 4.46 (dd, *J* = 11.29, *J* = 6.10, 1 H), 5.28-5.44 (m, 6 H), 5.92 (br, OH/NH, 1 H), 6.23 (br, OH/NH, 1 H), 7.18 (br, OH/NH, 1 H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.92, 21.26, 26.26, 26.31, 26.36, 27.95, 28.37, 29.89, 29.95, 29.99, 30.34, 32.23, 36.95, 52.99, 127.85, 128.51, 128.95, 129.07, 130.92, 132.68, 174.31, 175.80, 178.15.

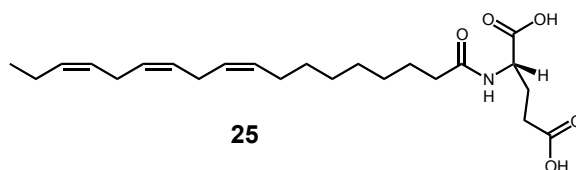
APCI-MS *m/z* (%): [M+H]⁺ 407 (100), 390 (7), 389 (4), 261 (6), 147 (4), 130 (5).

EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 406 (12), 388 (50), 359 (5), 260 (27), 232 (18), 204 (12), 191 (15), 170 (18), 163 (11), 147 (39), 129 (65), 108 (54), 95 (69), 91 (43), 84 (73), 79 (100), 67 (79), 55 (59).

HR-MS: $C_{23}H_{38}N_2O_4$ gefunden: $M^{+\bullet}$ 406.2825 berechnet: 406.2832.

6.6.2 *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)

250 mg (0.9 mmol) Linolensäure (**3**) -
gelöst in 10 ml trockenem THF -
wurden in einem 50 ml Zweihalskolben
unter Rühren bei 0 °C mit 137 μ l



Triethylamin und mit 85 μ l Chlorameisensäureethylester versetzt.^[100] Nach 2 min wurden 275 mg (1.9 mmol) L-Glutamat - gelöst in 7 ml 0.3 N NaOH - rasch zugegeben. Das Eisbad wurde nach 5 min entfernt. Bei Raumtemperatur wurde noch weitere 30 min gerührt und dann die Reaktion durch Ansäuern mit 2 N HCl abgebrochen. Es wurde 3-mal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten Fraktionen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch MPLC ($H_2O:MeOH$ 20:80) aufgereinigt.

Ausbeute: 299.4 mg (82 %)

IR (cm^{-1} , KBr): 3357 s, 3010 m, 2964 m, 2928 s, 2854 s, 1730 s, 1654 s, 1540 s, 1453 m, 1418 m, 1360 w, 1215 m, 1134 w, 974 w.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 0.98 (t, J = 7.53, 3 H), 1.25-1.40 (m, 8 H), 1.57-1.69 (m, 2 H), 2.00-2.19 (5 H, m), 2.21-2.31 (m, 2 H), 2.46-2.55 (m, 2 H), 2.80 (pt, J = 5.97, 4 H), 4.58-4.68 (m, 1H), 5.27-5.44 (6 H, m), 5.55 (br, OH/NH, 2 H), 6.55 (br, OH /NH, 1 H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 14.93, 21.24, 26.24, 26.31, 26.34, 27.66, 27.93, 29.90, 29.95, 29.98, 30.34, 30.78, 37.04, 52.75, 127.84, 128.50, 128.94, 129.05, 130.90, 132.67, 175.49, 176.26, 178.17.

APCI-MS m/z (%): $[M+H]^+$ 408 (100), 390 (4), 261 (8), 148 (6).

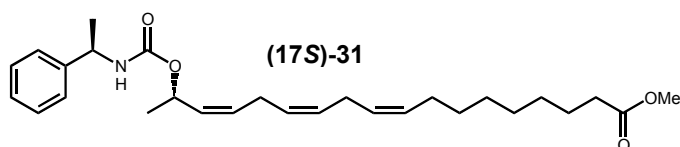
EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 407 (47), 389 (27), 363 (6), 260 (26), 232 (12), 204 (11), 191 (13), 189 (18), 163 (9), 148 (93), 130 (100), 121 (15), 108 (29), 102 (35), 93 (31), 84 (47), 79 (51), 67 (41), 55 (32).

HR-MS: $C_{23}H_{37}NO_5$ gefunden: 407.2662 berechnet: 407.2671.

6.7 Stereochemie des Volicitins (19)

6.7.1 (17S,1'R)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17S)-31]

Zu 2 mg (0.006 mmol) (17S)-17-Hydroxylinolensäuremethylester [(17S)-29] in 250 μ l



Toluol wurden 10 μ l (1R)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) gegeben und 2 h bei 120 °C inkubiert.^[87] Nach Entfernen des Lösungsmittels im Argonstrom wurde der resultierende (17S,1'R)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17S)-31] per HPLC gereinigt.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Nucleosil 50-5 (Macherey-Nagel) 250 mm x 4 mm; Laufmittel: A: Hexan B: Essigester; Flussrate: 1 ml/min; Gradient: von 0 % B zu 100 % B in 30 min. Retentionszeit: 11 min

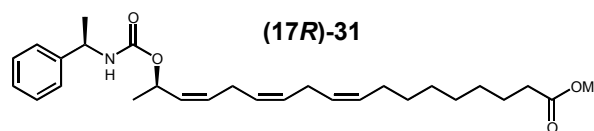
APCI-MS m/z (%): $[M+H]^+$ 456 (19), 395 (4), 291 (100), 259 (3).

EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 455 (11), 416 (6), 291 (36), 290 (100), 261 (4), 259 (7), 235 (10), 175 (7), 164 (20), 147 (38), 133 (50), 120 (46), 107 (50), 105 (81), 93 (53), 80 (69), 67 (42), 59 (11), 55 (53).

HR-MS: $C_{28}H_{41}NO_4$ gefunden: $M^{+\bullet}$ 455.3033 berechnet: 455.3036.

6.7.2 (17*R*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*R*)-31]

Zu 5 mg (0.016 mmol) (17*R*)-17-Hydroxylinolensäuremethylester [(17*R*)-29] in 500 μ l Toluol wurden



20 μ l (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) gegeben und 2 h bei 120 °C inkubiert.^[87] Nach Entfernen des Lösungsmittels im Argonstrom wurde der resultierende (17*R*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*R*)-31] per HPLC aufgereinigt.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Nucleosil 50-5 (Macherey-Nagel) 250 mm x 4 mm; Laufmittel: A:Hexan B: Essigester; Flussrate: 1 ml/min; Gradient: von 0 % B zu 100 % B in 30 min.

Retentionszeit: 11 min

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.19 (d, $J = 6.36$, 3 H), 1.20-1.31 (m, 8 H), 1.39 (d, $J = 6.85$, 3 H), 1.55 (pt, $J = 7.58$, 2 H), 1.97 (pq, $J = 6.85$, 2 H), 2.23 (t, $J = 7.46$, 2 H), 2.73 (pt, $J = 6.24$, 2 H), 2.86 (2 H, s, br), 4.70-4.87 (m, 2 H), 5.21-5.42 (m, 6 H), 5.49 (dq, $J = 6.93$, $J = 6.81$, 1 H), 7.14-7.31 (m, 5 H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.79, 23.29, 25.64, 26.31, 26.79, 27.89, 29.77, 29.80, 29.85, 29.91, 30.10, 30.25, 34.80, 51.26, 52.11, 68.12, 126.58, 126.62, 126.93, 127.93, 128.00, 128.26, 129.30, 129.33, 129.72, 130.88, 131.12, 131.22, 131.23, 144.46, 155.83, 175.00.

APCI-MS m/z (%): [M+H]⁺ 456 (19), 395 (4), 291 (100), 259 (3).

EI-MS m/z (%): M⁺• 455 (11), 416 (6), 290 (100), 259 (7), 235 (10), 175 (7), 164 (20), 147 (38), 133 (50), 120 (46), 105 (81), 93 (53), 80 (69), 67 (42), 59 (11), 55 (53).

HR-MS: C₂₈H₄₁NO₄ gefunden: M⁺• 455.3034 berechnet: 455.3036.

6.7.3 Hydrierung von (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-linolensäuremethylester (31)

Um festzustellen, ob cis/trans Isomere mit der Bestimmung der Isomerenverhältnisse interferieren, wurden die beiden Diastereomeren des (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-linolensäuremethylesters [(17*R*)-31] und [(17*S*)-31] mit Pt/C (10%) hydriert. Die resultierenden (1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-stearinsäuren wurden per GC-MS untersucht.

(17*S*, 1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-stearinsäuremethylester:

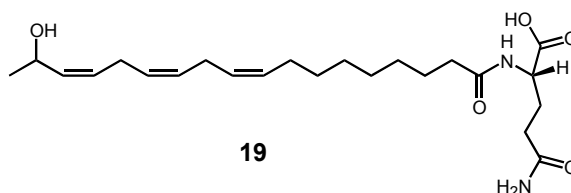
EI-MS *m/z* (%): 164 (88), 150 (100), 132 (22), 120 (68), 105 (83), 77 (19), 74 (29), 55 (32).

(17*R*, 1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxy)-stearinsäuremethylester:

EI-MS *m/z* (%): 164 (88), 150 (100), 132 (22), 120 (68), 105 (83), 77 (19), 74 (29), 55 (32).

6.7.4 Konfiguration der 17-Hydroxygruppe von natürlichem Volicitin (19)

100 μ l MeOH wurden zu 50-100 μ l Regurgitat von Lepidoptera Larven gegeben und das Gemisch zentrifugiert (5 min, 13000 U/min). Der



Überstand wurde im Argonstrom zur Trockene eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mit 100 μ l MeOH und 100 μ l Essigsäureanhydrid versetzt und 30 min auf 80 °C erhitzt.^[89] Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wurden 100 μ l Toluol und 0.5 μ l (1*R*)-1-Phenylethylisocyanat (**30**) zugegeben und bei 120 °C 2 h inkubiert.^[87] Nach Einengen im Argonstrom wurde der Rückstand in 10 μ l MeOH gelöst. 1 μ l der Lösung wurde in das GC-MS System injiziert. Die Verbindungen durch Retentionszeitvergleich mit den Referenzverbindungen sowie Aufnahme der charakteristischen Ionen *m/z* = 105 und 290 (SIM-Modus) identifiziert.

Von *S. littoralis* Larven wurden zur Kontrolle der Methode 500 µl Regurgitat gesammelt und daraus Volicitin (**19**) durch HPLC aufgetrennt. Das so gewonnene Volicitin (**19**) wurde dann - wie oben beschrieben - abgebaut und derivatisiert und per GC-MS, allerdings im Full Scan Modus, analysiert.

GC-Bedingungen:

Kapillarsäule: Alltech EC5: 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm; Trägergas: Helium, Flussrate: 1 ml/min, Injektortemperatur: 280 °C; Splitless Modus; Temperaturprogramm: 210 °C (2 min), 1 °C min⁻¹ bis 255 °C, dann 10 °C min⁻¹ bis 300 °C (5 min).

MS-Bedingungen:

Full-Scan: 41-461

Sim-Modus: 105, 290 bzw. 164, 150

(17S,1'R)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17S)-31]

Retentionszeit: 28.95 min

(17R,1'S)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-linolensäuremethylester [(17R)-31]

Retentionszeit: 29.81 min

(17S, 1'R)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-stearinsäuremethylester

Retentionszeit: 36.24 min

(17R, 1'R)-17-(1'-Phenylethylcarbamoxyloxy)-stearinsäuremethylester

Retentionszeit: 37.36 min

Die 17-Hydroxygruppe von Volicitin (**19**) aus Regurgitat von *S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. littoralis* und *H. virescens* Larven war in allen Fällen S konfiguriert mit 92 bis 96 % ee.

6.8 ***N*-(15,16-Epoxy-linolenoyl)-glutamin (32) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (33)**

6.8.1 **Strukturaufklärung von *N*-(15,16-Epoxy-linolenoyl)-glutamin (32) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (33)**

Beim LC-MS Screening nach polaren *N*-Acyl-glutaminderivaten im Regurgitat von Lepidopteren (*S. exigua*, *S. frugiperda* und *H. virescens*) wurden zwei Verbindungen, die bei 21.1 min bzw. 24.7 min von der HPLC-Säule eluierten, als *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (**32**) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (**33**) identifiziert.

LC-MS Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹; Laufmittel: A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; Gradient: 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

APCI-MS: Finnigan LCQ; APCI-Ionenquelle, Verdampfertemperatur: 450 °C.

***N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin (32):**

Retentionszeit: 24.7 min

APCI-MS *m/z* (%): 423 (100), 405 (69), 388 (7), 259 (3), 147 (3).

***N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-glutamin (33):**

Retentionszeit: 21.1 min

APCI-MS *m/z* (%): 441 (100), 423 (13), 405 (6), 147 (2).

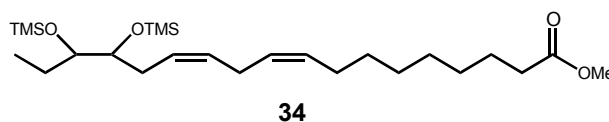
N-(15,16-Dihydroxy-linolenoyl)-glutamin wurde durch HPL-Chromatographie von etwa 500 µl Regurgitat von *S. exigua* Larven aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und nach Trocknen im Hochvakuum wurde der Rückstand mit 0.25 ml Methanol und 0.25 ml Essigsäureanhydrid 0.5 h bei 70 °C methanolysiert.^[89] Das Lösungsmittel wurde entfernt und Essigsäurereste wurden im Hochvakuum abgezogen. Der Rückstand wurde durch einstündiges Erwärmen auf 40 °C mit 20 µl MSTFA derivatisiert.

GC-MS Bedingungen:

GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm ; Trägergas: Helium; konstanter Druck: 30 kP; splitless Modus; Injektortemperatur 280 °C; Temperaturprogramm: 50 °C in 10 °C/min 100 °C in 5 °C/min 300 °C 5 min.

15,16-Bis-trimethylsilyloxy-linolsäuremethylester (34):

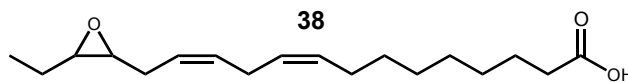
EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 470 (0.5), 439 (0.5), 380 (0.5), 339 (4), 310 (10), 299 (2), 233 (35), 217 (5), 147 (22), 143 (40), 131 (54), 75 (32), 73 (100), 59 (8).



6.8.2 Synthese von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32) und *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)

6.8.2.1 Synthese von 15,16-Epoxylinolsäure (38)

Zu 278 mg (1 mmol) Linolensäure (**3**) in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 wurden 195 mg (1.2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol bei Raumtemperatur zugegeben und 20 min gerührt.^[98]



In einem zweiten Kolben wurden 10 g 30 %-iges Wasserstoffperoxidharnstoffaddukt^[99] in 50 ml CH_2Cl_2 suspendiert und 5 g (35 mmol) wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat zugefügt. Anschließend wurde der Kolben auf 0 °C abgekühlt und 0.2 eq Lithiumimidazolid zugegeben. Nach 5 min wurde die aktivierte Linolensäure in 10 ml CH_2Cl_2 zur H_2O_2 -Lösung innerhalb von 2 min zugetropft. Nach weiteren 5 min Rühren bei 0 °C wurden 5 g wasserfreies Kaliumhydrogensulfat und 50 ml CH_2Cl_2 zugefügt. Nach 5 min Rühren wurden 5 g Na_2SO_4 zugegeben, wobei die Lösung klar wurde.

Ohne weiteres Rühren wurde die Lösung 1 Woche bei 0 °C stengelassen. Der Umsatz zur 15,16-Epoxylinolsäure (**38**) wurde durch Entnahme von Proben nach Derivatisierung mit CH_2N_2 per GC-MS verfolgt. Nach ca. 60 % Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml H_2S abgebrochen. Die Salze wurden abfiltriert, mit

50 ml CH₂Cl₂ gewaschen und das CH₂Cl₂ am Rotationsverdampfer entfernt. Das rohe Produkt wurde durch RP-18 Chromatographie (H₂O: MeOH 25:75) aufgereinigt. Um eine Probe für NMR-Messungen zu erhalten, wurden die Isomeren durch RP-HPLC getrennt:

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹; Laufmittel A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; Gradient: 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

Retentionszeit: 15,16-Epoxylinolsäure: 30.28 min; 9,10-Epoxy-12,15-octadecadiensäure und 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure 30.69 min

Fraktionssammler von 28 min - 32 min; Fraktionsgröße 0.2 min

Ausbeute: 149 mg (51 %)

Regioselektivität: ca. 75 % 15,16-Epoxylinolsäure (**38**)

IR (cm⁻¹, NaCl): 3011 m, 2971 m, 2931 s, 2856 m, 1711 s, 1455 s, 1260 w, 1240 w, 1085 w, 910 w, 815 w, 795 w, 730 m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.06 (t, *J* = 7.51, 3 H), 1.25-1.41 (m, 8 H), 1.48-1.68 (m, 4 H), 2.01-2.10 (m, 2 H), 2.17-2.27 (m, 1 H), 2.34 (pt, *J* = 7.47, 2 H), 2.37-2.45 (m, 1 H), 2.80 (pt, *J* = 6.89, 2 H), 2.90 (dt, *J* = 4.24, *J* = 6.31, 1 H), 2.96 (dt, *J* = 4.24, *J* = 6.41, 1 H), 5.26-5.55 (m, 4 H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 11.30, 21.72, 25.39, 26.49, 26.81, 27.89, 29.69, 29.73, 29.77, 30.18, 34.62, 57.33, 59.14, 124.82, 127.97, 131.24, 131.50, 179.36.

APCI-MS: [M+H]⁺ 295 (38), 277 (100), 259 (7).

EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 294 (0.5), 276 (6), 236 (10), 222 (32), 207 (10), 135 (12), 121 (21), 107 (40), 95 (45), 93 (73), 91 (34), 81 (67), 80 (84), 79 (100), 67 (77), 59 (18), 55 (68).

HR-EI-MS: $C_{18}H_{30}O_3$ gefunden: $[M^{+\bullet}-H_2O]$ 276.2090 berechnet: 276.2089.

15,16-Epoxylinolsäuremethylester:

GC-MS-Bedingungen:

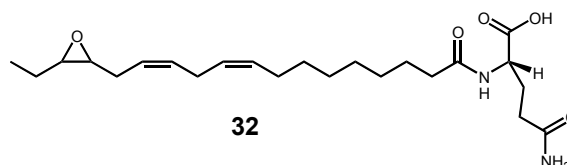
GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μ m; Trägergas: Helium; konstanter Druck: 30 kPa; splitless Modus; Injektortemperatur 280 °C; Temperaturprogramm: 50 °C in 10 °C/min 100 °C in 5 °C/min 300 °C 5 min.

Retentionszeit: 27.24 min

EI-MS m/z (%): $M^{+\bullet}$ 308 (0.5), 277 (1), 236 (4), 176 (2), 161 (5), 147 (4), 135 (10), 121 (8), 107 (33), 93 (47), 91 (34), 80 (55), 79 (100), 67 (39), 59 (27), 55 (48).

6.8.2.2 Synthese von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**)

Zu 100 mg (0.34 mmol) 15,16-Epoxylinolsäure (**38**), gelöst in 10 ml trockenem THF, wurden in einem 25 ml Zweihalskolben unter Rühren bei 0 °C 55 μ l Triethylamin und danach 34



μ l Chlorameisensäureethylester gegeben.^[100] Nach 2 min wurden 125 mg L-Glutamin - gelöst in 7 ml 0.3 N NaOH - rasch zugegeben. Das Eisbad wurde nach 5 min entfernt. Bei Raumtemperatur wurde noch weitere 30 min gerührt und dann die Reaktion durch vorsichtiges Ansäuern mit 2 N HCl abgebrochen. Es wurde 3-mal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten Fraktionen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde per MPLC (H_2O : MeOH 25:75) aufgereinigt.

Um eine Probe für NMR Untersuchungen zu erhalten, wurden die unerwünschten Regioisomeren durch semipräparative HPLC vom *N*-(15,16-Epoxylinoleoyl)-L-glutamin (**32**) abgetrennt. Dazu wurden Fraktionen gesammelt und deren Reinheit

mit LC-MS überprüft. Danach wurden die Lösungsmittel und AcOH am Rotationsverdampfer entfernt und die Probe über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-4HE 250 x 8 mm, 5 μ m; Fluss: 2 ml/min; Laufmittel: A: H₂O 0.5 % AcOH, B: MeCN 0.5 % AcOH; Gradient: 3 min 0 % B, in 30 min 100 % B, 3 min isokratisch 100 % B, in 2 min 0 % B, 5 min isokratisch 0 % B.

Fraktionssammler von 25 min bis 34 min, Fraktionsgrösse 0.5 min.

Ausbeute: 114 mg (79 %)

IR (cm⁻¹, KBr): 3438 m, 3405 m, 3315 m, 3216 w, 3070 w, 3013 w, 2966 w, 2933 m, 2856 w, 1712 m, 1660 s, 1641 s, 1542 m, 1452 w, 1419 w, 1249 w, 1136 w, 985 w, 815 w, 797 w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.05 (t, J = 7.55, 3 H), 1.25-1.40 (m, 8H), 1.48-1.68 (m, 4 H), 1.94-2.50 (m, 11 H), 2.80 (pt, J = 6.71, 2 H), 2.90 (dt, J = 4.17, J = 6.27, 1 H), 2.96 (dt, J = 6.29, J = 4.17, 1 H), 4.39 (br, 1 H), 5.26-5.56 (m, 4 H), 6.21 (br, 1 H), 6.65 (br, 1 H), 7.24 (br, 1 H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 11.26, 21.74, 26.28, 26.54, 26.87, 27.94, 29.85, 29.93, 30.26, 32.44, 37.02, 57.34, 59.14, 124.87, 128.03, 131.23, 131.52, 174.96, 175.22, 177.43.

APCI-MS m/z (%): [M+H]⁺ 423 (100), 405 (69), 259 (3), 147 (3).

EI-MS m/z (%): M⁺ 422 (12), 404 (54), 386 (7), 335 (6), 319 (8), 294 (7), 276 (6), 170 (9), 147 (29), 129 (29), 130 (30), 101 (33), 93 (21), 84 (100), 79 (32), 67 (31), 55 (32).

HR-MS: C₂₃H₃₈N₂O₅ gefunden: M⁺ 422.2785 berechnet: 422.2781.

6.8.2.3 Darstellung von *N*-(Epoxy-linoleoyl)-glutaminen (**32,35,36**) mit Metachlorperbenzoesäure

10 mg (0.025 mmol) *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) - gelöst in 1 ml MeOH - wurden mit 4.5 mg (0.026 mmol) MCPBA bei RT 2 h geschüttelt. Von der Lösung wurden 50 μ l entnommen, mit 450 μ l MeOH verdünnt und davon 1 μ l direkt per LC-MS analysiert. Man erhielt zwei Peaks im Verhältnis 1:2 im ersten Peak war *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**); und im zweiten Peak waren die unter den verwendeten Bedingungen zusammen eluierenden Konjugate *N*-(9,10-Epoxy-octadeca-12,15-dienoyl)-L-glutamin (**35**) und *N*-(12,13-Epoxy-octadeca-9,15-dienoyl)-L-glutamin (**34**) enthalten.

Auf eine Aufreinigung der Produkte wurde verzichtet, da *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) besser durch regioselektive Synthese (siehe 6.8.1 und 6.8.2) erhalten werden konnte.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹ A: Laufmittel: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; Gradient: 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

N-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**):

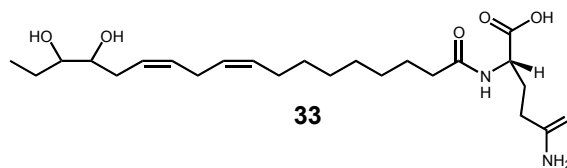
Retentionszeit: 24.7 min

N-(9,10-Epoxy-octadeca-12,15-dienoyl)-L-glutamin (**35**) und *N*-(12,13-Epoxy-octadeca-9,15-dienoyl)-L-glutamin (**34**):

Retentionszeit: 25.3 min

6.8.2.4 Synthese von *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**33**)

10 mg (0.024 mmol) *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (**32**) wurden in einer aus 1.5 ml THF, 0.5 ml Wasser und 25 μ l Natriumperchlorat^[101]



bestehenden Mischung 15 min bei RT gerührt. Nach Neutralisieren mit 2 N NaOH wurde das Rohprodukt mit RP18-HPLC gereinigt.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-4HE 250 x 8 mm, 5 μm ; Fluss: 2 ml/min; Laufmittel: A: H₂O 0.5 % AcOH, B: MeCN 0.5 % AcOH; HPLC-Programm: 3 min 0 % B, Gradient in 30 min 100 % B, 3 min isokratisch 100 % B, in 2 min Gradient 0 % B, 5 min isokratisch 0 % B.

Fraktionssammler von 21 min bis 31 min, Fraktionsgrösse 0.25 min

Retentionszeit (semipräparative Säule): 22.27

Ausbeute: 3.1 mg (30 %)

IR (cm⁻¹): 3391 s (br), 3011 w, 2932 s, 2858 m, 1716 m, 1657 s, 1539 m, 1410 w, 1287 w, 1242 w, 1129 w, 1059 w, 980 w.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 0.97 (t, J = 7.40, 3H), 1.29-1.41 (m, 8H), 1.42-1.60 (m, 4H), 1.63 (pt, J = 6.91, 2H), 1.90-2.01 (m, 2H), 2.08 (pq, J = 6.62, 2H), 2.11-2.21 (m, 2H), 2.25 (pt, J = 7.40, 2H), 2.26-2.40 (m, 2H), 2.82 (pt, J = 6.50, 2H), 3.36-3.31 (m, 1H), 3.42-3.47 (m, 1H), 4.36-4.41 (m, 1H), 5.29-5.54 (m, 4H).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 10.76, 26.73, 26.86, 26.98, 28.17, 28.72, 30.21, 30.27, 30.33, 30.71, 32.19, 32.82, 36.90, 53.48, 74.89, 76.18, 127.26, 128.88, 130.93, 131.11, 175.30, 176.35, 177.80.

APCI-MS m/z (%): 441 (100), 423 (16), 405 (7), 259 (1), 147 (1).

EI-MS m/z (%): [M⁺-H₂O] 422 (3.5), 404 (1), 367 (1.5), 363 (4), 334 (5), 311 (20), 294 (6), 276 (9), 252 (34), 235 (25), 223 (58), 206 (45), 199 (5), 189 (9), 164 (20), 145 (13), 135 (26), 121 (35), 107 (38), 95 (52), 91 (36), 84 (72), 79 (73), 72 (72), 67 (66), 59 (100).

HR-MS: C₂₃H₄₁N₂O₆ gefunden: [M+H]⁺ 441.2956 berechnet: 441.2965.

6.9 *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamine

6.9.1 Strukturaufklärung von *N*-(17-Acyloxy-acyl)-glutamin-konjugaten per LC-MS-MS

Bei der LC-MS Analyse des Regurgitates von *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *S. exigua* und *H. virescens* Larven beobachtete man bei 39-55 min eine Serie von Peaks, deren Massenspektren große Ähnlichkeit zu denen des Volicitins (**19**) bzw. des *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamins (**20**) aufwiesen. Vier dieser Verbindungen, die bei 39-45 min eluierten, wurden mit Hilfe von MS-MS untersucht (Kollisionsenergie: 15-25 %).

Nach Sammlung des bei 40 min eluierenden Peaks per HPLC wurden hochaufgelöste ESI-Massenspektren mit einem Micromass Quattro II aufgenommen.

LC-MS Bedingungen:

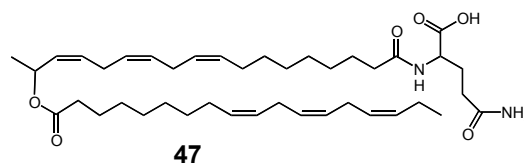
HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μm ; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹;

Laufmittel: A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; Gradient: 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 25 min 100 % B.

APCI-MS: Finnigan LCQ; APCI-Ionenquelle, Verdampfertemperatur: 450 °C.

N-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin (**47**):

Retentionszeit: 40.5 min

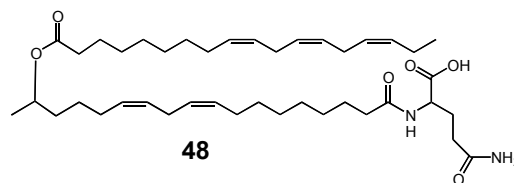


APCI-MS, *m/z* (%): [M+Na]⁺ 705 (8), [M+H]⁺ 683 (28), 405 (100), 259 (6), 147 (1).

HR-ESI-MS: C₄₁H₆₇N₂O₆ gemessen: [M+H]⁺ 683.4979 berechnet: 683.4999

N-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin (**48**):

Retentionszeit: 41.5 min

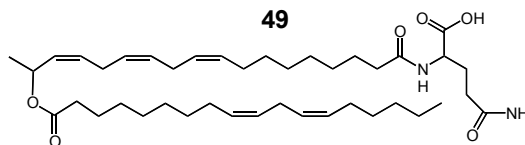


APCI -MS *m/z* (%): [M+Na]⁺ 707, [M+H]⁺ 685 (100), 667 (5), 407 (16), 261 (2), 147 (1), 130 (1).

HR-ESI-MS: $C_{41}H_{69}N_2O_6$ gefunden: $[M+H]^+$ 685.5143 berechnet: 685.5155.

***N*-(17-Linoleoyloxy-linolenoyl)-glutamin (49):**

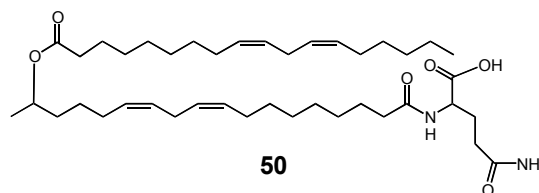
Retentionszeit: 43.4 min



APCI-MS *m/z* (%): $[M+Na]^+$ 707, $[M+H]^+$ 685 (27), 405 (100), 259 (5), 147 (2).

***N*-(17-Linoleoyloxy-linoleoyl)-glutamin (50):**

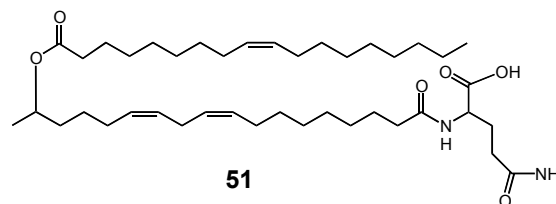
Retentionszeit: 44.8 min



APCI-MS *m/z* (%): $[M+H]^+$ 687 (100), 407 (18), 261 (1), 147 (1).

***N*-(17-Oleoyloxy-linoleoyl)-glutamin (51):**

Retentionszeit: 50.6 min



APCI-MS *m/z* (%): $[M+Na]^+$ 712 (12), $[M+H]^+$ 689 (100), 672 (5), 407 (16), 261 (2), 147 (2).

6.9.2 Bestimmung der Doppelbindungspositionen durch Ozonolyse

N-(17-Acyloxy-acyl)-glutaminkonjugate aus 500 μ l Regurgitat von *S. exigua* Larven wurden per HPLC gereinigt. Dazu wurde eine Fraktion bei 40 min - 44 min gesammelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 200 μ l in trockenem Methanol gelöst und 5 min bei -78 °C ozonolysiert (15 mg Ozon/min).^[119] Zum Reduzieren wurden 200 μ l Dimethylsulfid zur Lösung gegeben, nach 5 min wurde das Methanol im Argonstrom entfernt, mit CH_2N_2 derivatisiert und die Proben per GC-MS analysiert.

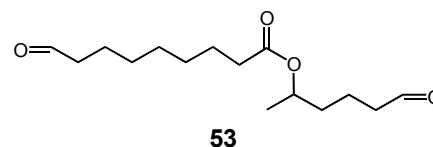
GC-MS Bedingungen:

GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm ; Trägergas: Helium; konstanter Druck: 30 kPa; splitless Modus; Injektortemperatur: 280 $^{\circ}\text{C}$; Temperaturprogramm: 50 $^{\circ}\text{C}$ in 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 100 $^{\circ}\text{C}$ in 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 300 $^{\circ}\text{C}$ 5 min.

9-Oxononansäure-1-methyl-5-oxopentylester

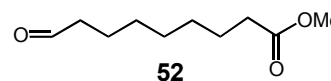
(53):

EI-MS m/z (%): 155 (100), 115 (24), 109 (48), 99 (88), 81 (90), 69 (35), 67 (26), 55 (81), 44 (40).



9-Oxononansäure-methylester (52):

EI-MS m/z (%): 158 (7), 155 (18), 143 (26), 111 (39), 87 (67), 83 (45), 74 (100), 59 (40), 55 (75).



HPLC-MS Bedingungen:

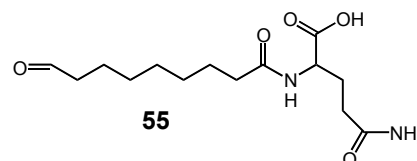
HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μm ; Flussrate: 0.2 ml min^{-1}
Gradient A: H_2O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 25 min 100 % B.

APCI-MS: Finnigan LCQ; APCI-Ionenquelle, Verdampfertemperatur: 450 $^{\circ}\text{C}$.

N-(9-Oxononanoyl)-L-glutamin (55):

Retentionszeit: 18.14 min

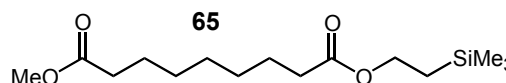
APCI-MS m/z (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 301 (100), 283 (37), 155 (2).



6.9.3 Synthese von (17*S*)-*N*-(17-Linolenyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)

6.9.3.1 Synthese von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)

Zu 2 g (10 mmol) Nonandisäuremonomethylester (**66**) in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 , wurden 80 mg DMAP und 2.1 g



(15 mmol) 2-Trimethylsilylethanol^[122, 123] zugefügt. Unter Rühren wurden in einer Argonatmosphäre bei 0 °C 2.3 g (11 mmol) DCC in 10 ml CH₂Cl₂ zugefügt.^[125] Nach 5 min Rühren bei 0 °C lässt man die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt weitere 3 h. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert. Die organische Phase wurde mit 0.5 N Salzsäure extrahiert und danach mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Petrolether: Ethylacetat 9:1).

Ausbeute: 2.16 g (68 %)

IR (cm⁻¹): 2951 m, 2857 w, 1735 s, 1437 w, 1355 w, 1250 s, 1172 s, 1062 w, 938 w, 856 s, 838 s.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.02 (s, 9 H), 0.92-0.99 (m, 2 H), 1.22-1.36 (m, 6H), 1.52-1.65 (m, 4 H), 2.25 (t, *J* = 7.55, 2 H), 2.25 (t, *J* = 7.43, 2 H), 3.64 (s, 3 H), 4.10-4.16 (m, 2 H).

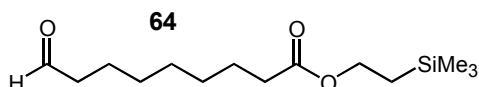
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -0.84, 17.96, 25.51, 25.53, 29.53, 29.59, 34.68, 35.10, 52.08, 63.02, 174.58, 174.86.

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 302 (0.5), 287 (3), 259 (45), 243 (15), 227 (9), 215 (6), 209 (8), 185 (19), 183 (13), 173 (45), 171 (23), 159 (24), 146 (15), 129 (13), 117 (29), 75 (49), 73 (100), 59 (12).

HR-MS: C₁₅H₃₀O₄Si gefunden: M⁺ 302.1911 berechnet: 302.1913.

6.9.3.2 Synthese von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)

Zu 9.5 ml einer 3.5 M Natrium-dihydrido-bis-(2-methoxy)-aluminat Lösung in 10 ml trockenem THF wurden unter Rühren in



einer Argonatmosphäre bei 0 °C 3.9 ml (36.6 mmol) *N*-Methylpiperazin langsam zugetropft.^[124] Die so vorbereitete Lösung wurde zur regioselektiven Reduktion

eingesetzt. 1.5 g (5 mmol) Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**65**) wurden in 20 ml THF unter Argonatmosphäre bei - 50-70 °C gerührt. Innerhalb einer Stunde wurde die Reduktionlösung zugegeben. Der Reaktionskolben wurde langsam auf - 20 °C erwärmt, wobei der Fortschritt der Reaktion ständig per GC-MS kontrolliert wurde. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit 2 N HCl und Dichlormethan abgebrochen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Petrolether: Ethylacetat 9:1).

Ausbeute: 709.6 mg (47 %)

IR (cm⁻¹): 2949 s, 2936 s, 2859 m, 2823 w, 2718 w, 1727 s, 1459 w, 1414 w, 1375 w, 1350 w, 1250 s, 1173 s, 1100 w, 1059 w, 1041 w, 936 w, 864 w, 836 w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.03 (s, 9 H), 0.93-0.99 (m, 2 H), 1.25-1.37 (m, 6 H), 1.55-1.66 (m, 4 H), 2.25 (t, *J* = 7.55, 2 H), 2.40 (dt, *J* = 1.89, *J* = 7.55, 2 H), 4.10-4.17 (m, 2 H), 9.74 (t, *J* = 1.89, 1 H).

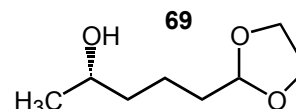
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -0.83, 17.98, 22.64, 25.52, 29.56, 29.60, 29.64, 35.09, 44.50, 63.05, 174.57, 203.39.

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 272 (0.05), 257 (0.6), 245 (0.4), 243 (1), 229 (8), 211 (19), 201 (8), 199 (11), 173 (24), 155 (12), 131 (13), 129 (23), 117 (21), 109 (14), 95 (8), 75 (56), 73 (100), 67 (12), 55 (13).

HR-MS: C₁₄H₂₈SiO₃ gefunden: M⁺ 272.1815 berechnet: 272.1808.

6.9.3.3 Synthese von (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (**69**)

1.1 g (45 mmol) Magnesium Späne in 10 ml trockenem THF wurden mit 90 µl 1,2-Dibromoethan aktiviert. Bei 30-35 °C wurden 2.4 ml (20 mmol) 2-(Bromethyl)-1,3-



dioxolan (**68**) zugetropft. Nach Abklingen der Reaktion wurde die Mischung auf -78 °C abgekühlt, 0.75 g (3.7 mmol) CuBr•(Me₂S) in 7 ml Me₂S wurden zugetropft und

1 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. 1 ml (15 mmol) (S)-Propylenoxid (**67**) wurde mit einer gekühlten Spritze zugetropft. Man ließ die Lösung innerhalb von 3.5 h auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmen. 20 h wurde weitergerührt, wobei man bis auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmen ließ. ^[126] Es wurde mit gesättigter NH_4Cl Lösung gequench, mit CH_2Cl_2 extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 1.39 g (58 %)

IR (cm^{-1}): 3415 m (br), 2956 m, 2929 m, 2882 m, 1456 w, 1410 m, 1369 w, 1128 s, 1054 m, 1031 m, 943 m, 915 m, 845 w.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.18 (d, $J = 6.23$, 3 H), 1.42-1.53 (m, 4 H), 1.63-1.74 (m, 2 H), 1.80-1.86 (m, 1 H), 3.75-3.85 (m, 3 H), 3.93-3.97 (m, 2 H), 4.85 (t, $J = 4.72$, 1 H).

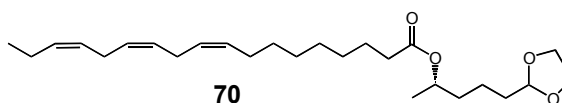
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 20.83, 24.10, 34.38, 39.76, 65.52, 68.53, 105.20.

EI-MS m/z (%): $[\text{M-H}]^{+\bullet}$ 159 (1), 143 (10), 129 (8), 112 (6), 99 (6), 83 (9), 81 (9), 73 (100), 71 (10), 69 (8), 57 (17).

HR-MS: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_3$ gefunden: $[\text{M-H}]^{+\bullet}$ 159.1019 berechnet: 159.1021.

6.9.3.4 Synthese von (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methylbutylester (**70**)

Zu einer gut gerührten Lösung von 1 g (3.8 mmol) Linolensäure (**3**) in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 wurden 100 mg



N,N -4-Dimethylaminopyridin und 450 mg (2.8 mmol) (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (**69**) zugefügt. Bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 598 mg (2.9 mmol) DCC - gelöst in 5 ml CH_2Cl_2 - innerhalb von 2 min zugegeben. ^[125] Nach 5-minütigem Rühren bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Kühlung entfernt und weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der

Harnstoff wurde abfiltriert, die Mischung mit 0.5 N HCl extrahiert und mit NaHCO₃ Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Petrolether : Ethylacetat 9:1).

Ausbeute: 637.3 mg (54 %)

IR (cm⁻¹): 3010 s, 2932 s, 2855 s, 1730 s, 1652 w, 1460 m, 1373 m, 1245 m, 1181 s, 1135 s, 1098 m, 1057 m, 1030 m, 938 m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.97 (t, *J* = 7.49, 3 H), 1.20 (d, *J* = 6.42, 3 H), 1.24-1.38 (m, 8 H), 1.38-1.72 (m, 8 H), 2.01-2.11 (m, 4 H), 2.26 (t, *J* = 7.49, 2 H), 2.86-2.76 (pt, 4 H), 3.80-3.87 (m, 2 H), 3.91-3.99 (m, 2 H), 4.83 (t, *J* = 4.64, 1 H), 4.90 (se, *J* = 6.23, 1 H), 5.27-5.45 (m, 6 H).

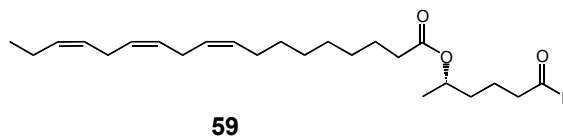
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.96, 20.61, 21.22, 25.72, 26.19, 26.28, 27.88, 29.79, 29.86, 30.26, 34.32, 35.37, 36.45, 65.53, 71.18, 105.03, 127.77, 128.37, 128.92, 128.94, 130.95, 132.62, 174.17.

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 420 (43), 305 (25), 277 (29), 261 (20), 143 (100), 108 (57), 101 (48).

HR-MS: C₂₆H₄₄O₄ gefunden: M⁺ 420.3239 berechnet: 420.3240.

6.9.3.5 Synthese von (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)

750 mg (1.79 mmol) (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70) wurden in 50 ml THF gelöst und 25 ml 6 N HCl bei 0 °C zugegeben.



Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 3-mal mit CH₂Cl₂ extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel mit Petrolether : Ethylacetat 9:1 gereinigt.

Ausbeute: 561.8 mg (84 %)

IR (cm⁻¹): 3010 m, 2964 m, 2934 s, 2853 m, 2717 w, 1733 s, 1457 w, 1370 w, 1246 w, 1181 m, 1134 m, 1099 m, 715 w.

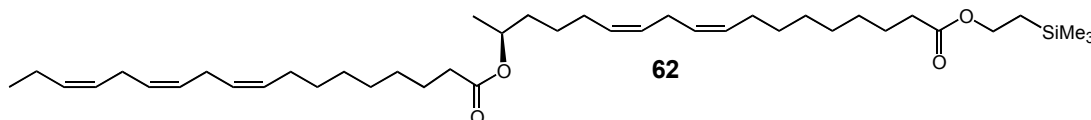
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.95 (t, *J* = 7.55, 3 H), 1.19 (d, *J* = 6.30, 3 H), 1.37-1.21 (m, 8 H), 1.72-1.47 (m, 6 H), 2.10-1.97 (m, 4 H), 2.24 (t, *J* = 7.55, 2 H), 2.48-2.38 (m, 2 H), 2.81-2.73 (m, 4 H), 4.88 (qt, *J* = 6.3, *J* = 5.28, 1 H), 5.42-5.24 (m, 6 H), 9.74 (t, *J* = 1.51, 1 H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.89, 18.63, 20.57, 21.20, 25.70, 26.21, 26.30, 27.86, 29.77, 29.81, 30.23, 35.32, 35.94, 44.15, 70.68, 127.81, 128.43, 128.94, 128.97, 130.91, 132.61, 174.05, 202.41.

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 376 (10), 277 (11), 261 (20), 135 (5), 129 (25), 121 (7), 108 (15), 99 (100), 81 (64), 69 (15), 67 (14), 55 (35).

HR-MS: C₂₄H₄₀O₃ gefunden: M⁺ 376.2978 berechnet: 376.2978.

6.9.3.6 Synthese von (17*S*)-17-Linolenoyloxy-linolsäure-(2-trimethylsilyl-ethyl)-ester (**62**)



Zu einer Suspension von 661 mg (0.91 mmol) Propan-1,3-bis(triphenylphosphonium)bromid (**60**) in 15 ml trockenem THF wurden unter Rühren bei -78 °C 3.8 ml einer 0.5 M KN(SiMe₃)₂ Lösung in Hexan gegeben. Man ließ die Lösung für 10 min auf 0 °C erwärmen, wobei eine tiefrote Färbung entstand. Nach Abkühlen auf -78 °C wurden 338 mg (0.9 mmol) (1*S*)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (**59**) in 3 ml THF tropfenweise mit einer gekühlten Spritze zugegeben. Die entstandene Mischung

wurde innerhalb 1 h auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde wieder auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und 245 mg (1 mmol) 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**64**) in 2 ml THF tropfenweise mit einer vorgekühlten Spritze zugegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur innerhalb 1 h wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt.^[121] Nach Reaktionsabbruch durch Zugabe einer gesättigten NH_4Cl -Lösung wurde mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Petrolether: Ether 95:5) gereinigt.

Ausbeute: 172 mg (26 %)

IR (cm^{-1}): 3010 m, 2928 s, 2855 m, 1734 s, 1455 w, 1377 w, 1245 m, 1172 m, 1135 w, 856 m, 833 m, 696 w.

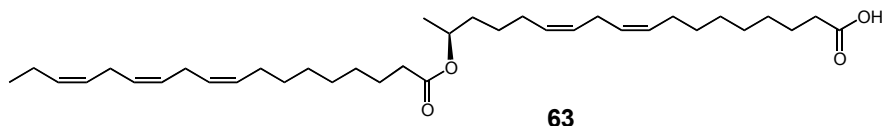
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.04 (s, 9 H), 0.96-1.00 (m, 2 H), 0.97 (t, $J = 7.43$, 3 H), 1.20 (d, $J = 6.30$, 3 H), 1.23-1.67 (m, 24 H), 1.97-2.12 (m, 8 H), 2.26 (t, $J = 7.55$, 2 H), 2.27 (t, $J = 7.55$, 2 H), 2.76 (pt, $J = 5.79$, 2 H), 2.80 (pt, $J = 6.04$, 4 H), 4.11-4.19 (m, 2 H), 4.85-4.95 (m, 1 H), 5.25-5.45 (m, 10 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = -0.81, 1.71, 14.97, 18.02, 20.74, 21.25, 25.77, 26.12, 26.22, 26.31, 27.65, 27.90, 29.82, 29.88, 30.28, 35.22, 35.41, 36.24, 63.06, 71.24, 127.81, 128.41, 128.52, 128.94, 128.97, 129.06, 129.23, 130.17, 130.29, 130.79, 130.91, 130.96, 132.65, 174.19, 174.72.

EI-MS m/z (%): $\text{M}^{+\bullet}$ 656 (2), 629 (26), 614 (6), 351 (83) 350 (100), 349 (42), 335 (55), 321 (7), 308 (11), 294 (7), 278 (67), 277 (51), 261 (46), 243 (9), 236 (14), 196 (25), 163 (16), 135 (48), 121 (44).

HR-MS: $\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{O}_4\text{Si}$ gefunden: $\text{M}^{+\bullet}$ 656.5176 berechnet: 656.5199.

6.9.3.7 Synthese von (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (63)



100 mg (0.15 mmol) (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (**62**) in 2.5 ml THF wurde mit 2 ml Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1M in THF) über Nacht gerührt.^[122] Nach Ansäuern mit 10 ml 2 N HCl wurde (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (**63**) 3-mal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch RP18 MPL-Chromatographie (H₂O/MeOH 1:3, 100 % MeOH) gereinigt.

Ausbeute: 51.7 mg (62%)

IR (cm⁻¹): 3010 m, 2964 s, 2928 s, 2855 s, 1734 s, 1711 s, 1460 m, 1373 w, 1245 m, 1181 m, 1130 m, 1085 w, 719 m.

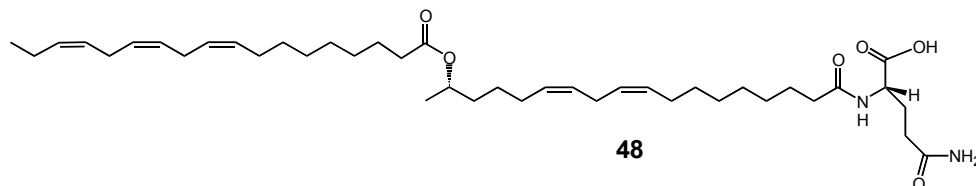
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.98 (t, *J* = 7.53, 3 H), 1.20 (d, *J* = 6.36, 3 H), 1.26-1.68 (m, 24 H), 2.00-2.17 (m, 8 H), 2.27 (t, *J* = 7.46, 2 H), 2.35 (t, *J* = 7.46, 2 H), 2.77 (pt, *J* = 5.77, 2 H), 2.81 (pt, *J* = 6.03, 4 H), 4.92 (se, *J* = 6.29, 1 H), 5.28-5.45 (m, 10 H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.94, 20.72, 21.26, 25.79, 25.76, 26.14, 26.26, 26.36, 27.68, 27.90, 27.93, 29.72, 29.75, 29.84, 29.88, 30.24, 30.30, 34.24, 35.45, 36.28, 71.32, 127.87, 128.47, 128.62, 128.99, 129.03, 129.29, 130.19, 130.89, 130.99, 132.68, 174.27, 177.58.

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 556 (28), 294 (10), 278 (100), 277 (55), 236 (18), 222 (12), 135 (20), 113 (39).

HR-MS: C₃₆H₆₀O₄ gefunden: M⁺ 556.4481 berechnet: 556.4492.

6.9.3.8 Synthese von (17S)-N-(17-Linolenyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)



Zu 50 mg (0.10 mmol) (17S)-N-17-Linolenyloxy-linolsäure (**63**) in 4 ml trockenem THF wurden unter Argonatmosphäre bei -10 °C 11 mg (0.11 mmol, 16 μ l) NEt₃ und 12 mg (0.11 mmol, 11 μ l) Chlorameisensäureethylester gegeben.^[100] Nach 5 min wurde eine Lösung von 30 mg (0.20 mmol) L-Glutamin in 2.8 ml 0.30 N NaOH schnell zugegeben. Nach 5 min Rühren wurde das Eisbad entfernt und 30 min bei RT gerührt.

Es wurde mit 2 N HCl angesäuert und 3-mal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde per RP-18 HPLC gereinigt.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-4HE 250 x 8 mm, 5 μ m; Fluss: 2 ml/min; Laufmittel: A: H₂O 0.5 % AcOH, B: MeCN 0.5 % AcOH; HPLC-Programm: 1 min 30 % B, Gradient in 10 min 100 % B, 15 min isokratisch 100 % B, in 5 min Gradient 30 % B, 5 min isokratisch 30 % B.

Ausbeute: 49.6 mg (72 %)

IR (cm⁻¹): 3429 m, 3327 m, 3210 w, 3013 w, 2959 m, 2927 s, 2858 m, 1731 m, 1657 s, 1542 w, 1455 w, 1423 w, 1260 m, 1188 w, 1098 w, 1026 w, 801 w.

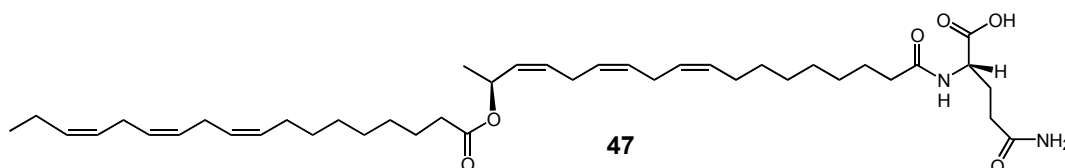
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.98 (t, J = 7.53, 3 H), 1.20 (d, J = 6.17, 3 H), 1.23-1.67 (m, 24 H), 1.99-2.12 (m, 8 H), 2.15-2.22 (m, 1 H), 2.25 (t, J = 6.91, 2 H), 2.26 (t, J = 7.28, 2 H), 2.39-2.48 (m, 1 H), 2.55-2.64 (m, 1 H), 2.70-2.74 (m, 1 H), 2.76 (pt, J = 5.68, 2 H), 2.80 (pt, J = 5.80, 4 H), 4.47 (q, J = 6.09, 1 H), 4.91 (s, J = 6.32, 1 H), 5.27-5.44 (m, 10 H), 5.97 (br, 1 H), 6.32 (s, br, 1 H), 7.08 (br, 1 H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 177.23, 175.42, 174.33, 173.85, 132.68, 130.99, 130.90, 130.20, 129.29, 129.04, 129.00, 128.62, 128.48, 127.87, 71.37, 53.22, 37.34, 37.09, 36.26, 32.62, 30.30, 29.90, 29.88, 29.84, 29.82, 28.34, 27.68, 26.37, 26.36, 26.27, 26.20, 26.12, 25.80, 21.26, 20.72, 14.93.

APCI-MS m/z (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 685 (100), 667 (5), 407 (16), 261 (2), 147 (1), 130 (1).

HR-ESI-MS: $\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_6$ gefunden: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 685.5143, berechnet: 685.5155.

6.9.4 Synthese von (17S)-N-(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-L-glutamin (47)



0.25 mg Volicitin (**19**) und 0.5 mg Linolensäure (**3**) wurden in 2 ml wasserfreiem Decan 2 d in Gegenwart von 100 mg Lipase (Porcine Pancreas Lipase Typ II) bei Raumtemperatur gerührt.^[120]

LC-MS Analyse der Probe ergab, dass *N*-(17-Linolenoyloxy)-linolenoyl-L-glutamin (**47**) in ca. 5 % Ausbeute im Vergleich zum eingesetzten Volicitin (**19**) durch die Lipase gebildet wurde. Retentionszeit und APCI-Massenspektrum der Verbindung (**47**) waren identisch mit dem aus Regurgitat isolierten Naturstoff.

6.10 Identifizierung von N-(17-Phosphonoxy-acyl)-glutaminen

Bei der Analyse von Regurgitat von *S. exigua* Larven wurde im mittelpolaren Bereich des HPL-Chromatogramms bei 22 min kurz vor Volicitin (**19**) ein breiter Peak gefunden, der charakteristische Ionen für Volicitin (**19**) und *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-glutamin (**20**) aufwies. Bei genauerer Analyse konnten in dem Peak zwei Verbindungen identifiziert werden. Die Ionen $m/z = 503$ und 505 konnten unter schonenden ESI-Bedingungen als Quasimolekularionen der Verbindungen **75** und **76** identifiziert werden. Mit Hilfe von negativ ESI-MS-MS wurden diese Verbindungen unter Berücksichtigung ihrer biologischen Herkunft als *N*-(17-Phosphonoxy-

linoleoyl)-glutamin (**75**) und *N*-(17-Phosphonoxy-linolenoyl)-glutamin (**76**) identifiziert.

LC-MS Bedingungen:

HPLC-säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 μ m; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹;
Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

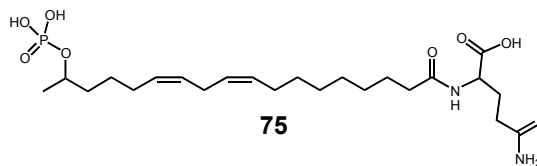
APCI-MS: Finnigan LCQ; APCI-Ionenquelle, Verdampfertemperatur: 450 °C.

ESI-MS Finnigan LCQ

Micromass Quattro II

***N*-(17-Phosphonoxy-linoleoyl)-glutamin (**75**):**

APCI MS *m/z* (%): [M+H]⁺ 505 (100), 487 (6), 407 (19), 261 (1), 147 (1).



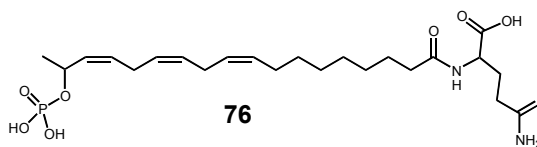
ESI-MS *m/z* (%): [M+H]⁺ 505 (100).

ESI-MS-MS des [M+H]⁺ 505; Kollisionsenergie 20 %; *m/z* (%): 407 (100), 390 (14), 261 (3), 147 (1)

ESI-MS-MS *m/z* (%): [M-H]⁻ 503 (100), 97 (20), 79 (31).

***N*-(17-Phosphonoxy-linolenoyl)-glutamin (**76**):**

APCI-MS *m/z* (%): 405 (100), 388 (17), 259 (2), 147 (1).



ESI-MS *m/z* (%): [M+H]⁺ 503 (100), 405 (42).

ESI-MS-MS des [M+H]⁺ 503; Kollisionsenergie 20 %; *m/z* (%): 405 (100), 388 (9), 147 (1)

ESI-MS-MS *m/z* (%): [M-H]⁻ 501 (100), 403 (45), 145 (4), 97 (79), 79 (27).

Zum Vergleich wurde ein Standard aus Ricinolsäure-L-glutamin mit $\text{SO}_3\text{-DMF}^{[287]}$ *N*-(12-Sulfooxy-ricinoleoyl)-L-glutamin dargestellt.

***N*-(12-Sulfooxy-ricinoleoyl)-L-glutamin:**

Retentionszeit: 22.3 min

APCI-MS *m/z* (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 507 (2), 427 (37), 409 (100), 391 (19), 263 (5), 147 (3).

ESI-MS-MS *m/z* (%): $[\text{M}+\text{H}]^-$ 505 (11), 425 (100), 145 (66), 97 (79), 80 (11).

6.11 Versuche zur Biosynthese von *N*-Acyl-glutaminen

6.11.1 Einfluss des Substratangebots auf die Bildung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

0.5 g Palmitinsäure oder $[2,3\text{-}^2\text{H}_2]$ -Phenyldodecensäure wurden zusammen mit 0.5 g Glutamin (**24**), 5 g Agar und 50 ml Wasser aufgekocht. Diese künstliche Diät wurde *S. littoralis* Larven zum Fressen angeboten. Nach mehreren Stunden (ca. 5-10 h) wurde den Raupen Regurgitat abgenommen und wie beschrieben per LC-MS untersucht. Die verfütterten Fettsäuren wurden bereitwillig zu *N*-Acyl-glutaminen umgesetzt. Ein Angebot von anderen Aminosäuren als Glutamin hingegen führte zu keinem nennenswerten Einbau.

Diese starke Abhängigkeit der Bildung von *N*-Acyl-glutaminen vom Fettsäureangebot wurde auch bei Verfütterung unterschiedlicher Diäten beobachtet. So führte eine aus Weizenkeimen bestehende Diät in erster Linie zur Bildung von *N*-Linoleoyl-L-glutamin (**22**) und von *N*-(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (**20**), wohingegen nach Fraß einer Diät, die auf Bohnen basiert, hauptsächlich *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) und Volicitin (**19**) gefunden wurden.

6.11.2 Bildung von *N*-Acylaminosäurekonjugaten durch Darmbakterien aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven und *Manduca sexta* Larven

Von *S. exigua* und *A. segetum* Larven wurden jeweils etwa 50 µl Regurgitat gesammelt und nach Verdünnen mit 200 µl Wasser auf LB- und BHI-Platten (Brain Heart Infusion Agar; CM 225, Oxoid, Basingstoke/England) ausgestrichen. Nach ca. zweitägiger Inkubation bei 27 °C wurden Kolonien der entstandenen Bakterienmischkultur in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, mit 500 µl BHI-Medium versetzt und mit 1-2 mg L-Glutamin (**24**) und 1 µl Linolensäure (**3**) 5 h inkubiert. Bei der anschließenden LC-MS Analyse wurde *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) gefunden.

In gleicher Weise wurde etwa 50 µl Regurgitat von *M. sexta* Larven gesammelt, mit 200 µl Wasser verdünnt und auf einer BHI Platte ausgestrichen. Nach zwei Tagen bei 27 °C wurden Kolonien der entstandenen Bakterienmischkultur in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, mit 500 µl BHI-Medium versetzt und mit Glutamin (**24**) bzw. Glutamat und Linolensäure (**3**) 5 h inkubiert.

Die Lösung wurde wie beschrieben per LC-MS untersucht. Sowohl bei Inkubation mit Glutamat als auch mit Glutamin (**24**) ließ sich *N*-Linolenoyl-L-glutamat (**25**) nachweisen.

6.11.3 Isolierung von Mikroorganismen aus dem Darm von Lepidoptera Larven

Zur Isolierung der Mikroorganismen aus dem Darm von Raupen wurden die Larven unter sterilen Bedingungen in einer Laminarbox mit 70 % Ethanol 2 Sekunden gewaschen, um Kontaminationen von Bakterien auf der Oberfläche der Larven zu entfernen. Die Larven wurden unter einem Stereomikroskop seziiert. Präparierte Darmproben wurden in Eppendorf Röhrchen mit 210 µl NaCl Lösung (0.9 % g/v) überführt.

100 µl dieser Lösungen wurden auf BHI Medium ausplattiert und bei 20 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach 7 Tagen wurden einzelne Kolonien nach morphologischen Kriterien wie Koloniegröße, Farbe und Oberflächenstruktur ausgewählt.

Die Mikroorganismen wurden auf BHI-Agar, einem nährstoffreichen Medium, zur Kultivierung von Mikroorganismen ausplattiert. Für die Inkubationsversuche wurde BHI Flüssigmedium mit den Bakterien mittels Zahnstocher oder Impföse inokuliert und bei 28 °C im Schüttler über Nacht angezogen.

Für Mikroansätze wurden Eppendorf-Röhrchen (2 ml) mit einem luftdurchlässigen Deckel verwendet, um die Sauerstoffversorgung der Organismen zu gewährleisten.

6.11.4 Biosynthese von *N*-Acyl-glutaminen durch Mikroorganismen

Zu 1.0 ml einer Bakteriensuspension im BHI Medium wurden 3.6 µmol der Fettsäure und 6.8 µmol L-Glutamin (**24**) gegeben und anschließend bei 28 °C bzw. 37 °C geschüttelt.

In Kontrollexperimenten wurden autoklavierte Kulturen und BHI Medium mit Linolensäure (**3**) (1-2 mg) und L-Glutamin (**24**) (2 mg) versetzt und unter gleichen Bedingungen inkubiert. 20 µl Proben wurden nach 1 h, 5 h, 1 d, 2 d und 5 d entnommen, mit 20 µl Methanol versetzt, bei 13000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand per LC-MS analysiert.

LC-MS Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹
Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

APCI-MS: Finnigan LCQ, APCI-Ionenquelle, Verdampfer Temperatur: 450 °C.

6.11.5 Wachstumskurve der Mikroorganismen

Von den durch 16S-rRNA bestimmten Mikroorganismen wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. So war es möglich, einen Zeitpunkt zur Substratzugabe für die Versuche zur Produktion von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten zu wählen, bei dem der Großteil der Mikroorganismen sich am Ende der log-Phase befand. Damit wurden halbwegs vergleichbare Werte erhalten, da die Mikroorganismen zu diesem Zeitpunkt ähnliche metabolische Aktivität zeigen sollten. Zur Aufnahme der Kurve wurden die Mikroorganismen gleichzeitig in einer Multi-Well-Plate bei 27 °C im BHI Medium angezogen. Nach jeweils einer Stunde

Wachstum wurden je 100 μl Medium entnommen, in eine 96 Well-Plate überführt und mit 100 μl Wasser verdünnt. Mit einem ELISA Reader wurde die Zunahme der Trübung durch Messung bei 600 nm bestimmt.^[288] Der Großteil der Mikroorganismen erreichte das Ende der Log-Phase nach etwa 10-12 h. Daher wurden bei den Versuchen zur Konjugatbildung die Substrate nach 8 h zugegeben und weitere 4 h inkubiert.

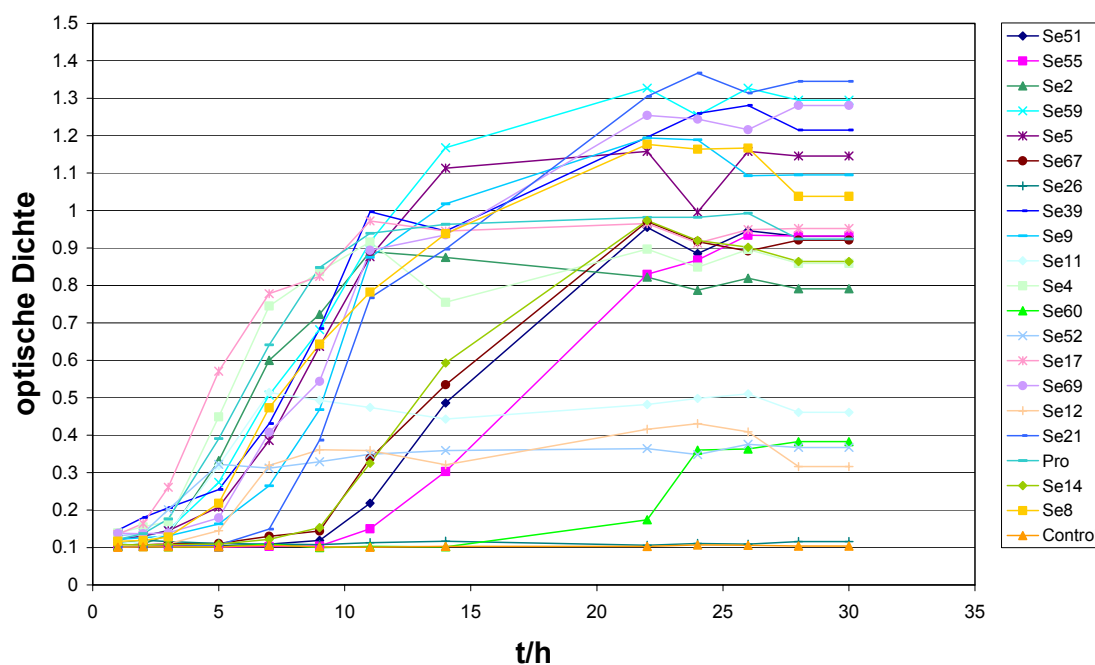


Abbildung 47: Wachstumskurven der aus dem Darm von *S. exigua* Larven isolierten Mikroorganismen (Erklärung der Abkürzungen: siehe Tabelle 3 und Tabelle 4)

6.11.6 Vergleich des Potentials der Mikroorganismen zur Bildung von *N*-Acyl-aminosäuren

Um das Potential der isolierten Mikroorganismen, *N*-Acyl-aminosäuren zu synthetisieren, vergleichen zu können, wurden die Mikroorganismen unter möglichst gleichen Bedingungen angezogen. Die Mikroorganismen wurden nach Inokulation in 1 ml BHI Medium in Eppendorf Röhrcchen mit luftdurchlässigem Deckel bei 28 °C 8 h lang geschüttelt. Danach wurden 1 μl Linolensäure (**3**) und 1 mg L-Glutamin (**24**) zu

den Mikroorganismen gegeben und weitere 4 h unter Schütteln inkubiert (Erreichen des Endes der Log Phase; siehe Abbildung 47). 100 µl Proben wurden entnommen und mit 1 µl methanolischer *N*-Phenyldodecanoyl-L-glutamin Lösung (1 µg/ml) sowie 100 µl Methanol versetzt. Es wurde 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde per LC-MS analysiert (Injektionsvolumen: 30 µl). Die Menge an von dem Mikroorganismen gebildeten Konjugaten wurde durch Peakflächenvergleich der produzierten *N*-Acyl-aminosäuren mit dem als Standard verwendeten *N*-[2-²H]-Phenyldodecanoyl-L-glutamin quantifiziert (siehe Abbildung 31). Über 70 % der 26 untersuchten Mikroorganismen aus dem Darm von *S. exigua* Larven produzierten *N*-Acyl-aminosäuren. Es wurden große Schwankungen hinsichtlich der Menge an gebildeten Konjugaten der gleichen Stämme bei unterschiedlichen Versuchen festgestellt.

LC-MS Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil ODS-3 CP 120 mm x 2 mm, 3 µm; Flussrate: 0.2 ml min⁻¹

Gradient A: H₂O 0.5 % AcOH B: MeCN 0.5 % AcOH; 3 min 100 % A, in 27 min 100 % B, 15 min 100 % B.

APCI-MS: Finnigan LCQ, APCI-Ionenquelle, Verdampfer Temperatur: 450 °C.

6.11.7 Substratspezifität der Mikroorganismen bei der Bildung von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

Die Substratspezifität der Mikroorganismen wurde bei den Stämmen *Providencia rettgeri*, *Ochrobactrum sp.*, *Myroides odoratus* und *Acinetobacter sp.* Genospezies 11 untersucht. In einer Versuchsreihe wurden den Stämmen gesättigte und ungesättigte Fettsäuren angeboten: geradkettige gesättigte Fettsäuren von C-8 bis C-18, Heptadecansäure, sowie Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure (**3**) in einer Konzentration von insgesamt 2 mg/ml. Nach 1 d Inkubation wurden Proben entnommen und per LC-MS analysiert. Alle untersuchten Fettsäuren wurden von den Mikroorganismen mit Glutamin konjugiert. Eine nur leichte Präferenz ließ sich für ungesättigte C18-Fettsäuren feststellen. Zum Studium des Einbaus der Aminosäuren wurden je 3 Aminosäuren in einer Konzentration von 1 mg/ml zusammen mit je 1 µl Linolensäure, Linolsäure und Ölsäure den Mikroorganismen angeboten. Von den 20 natürlichen Aminosäuren wurden alle bis auf Asparagin eingebaut, wobei Glutamat

und Aspartat allerdings nur schlecht von den Mikroorganismen zu *N*-Acyl-glutamaten bzw. *N*-Acyl-aspartat umgesetzt wurden.

6.11.8 LC/APCI-MS Daten von *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten

Zur leichteren Identifikation wurden von sämtlichen natürlichen L-Aminosäuren Konjugate mit Linolensäure (**3**) nach der bei der Synthese von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) beschriebenen Methode der gemischten Anhydride hergestellt (siehe 6.6.1).

HPLC Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 3 µm, A: H₂O 0.5 % AcOH; B: CH₃CN 0.5 % AcOH, Flussrate: 0.2 ml/min; 0 % B 3 min, in 27 min 100 % B, 100 % B 15 min

Tabelle 10: *N*-Acyl-glutaminkonjugate unterschiedlicher Kettenlänge

Konjugat	Retentionszeit	APCI-MS [M+H] ⁺
<i>N</i> -Octanoyl-L-glutamin	20.30 min	273
<i>N</i> -Decanoyl-L-glutamin	23.02 min	301
<i>N</i> -Dodecanoyl-L-glutamin	25.6 min	329
<i>N</i> -Tetradecanoyl-L-glutamin	28.5 min	357
<i>N</i> -Palmitoyl-L-glutamin	31.6 min	385
<i>N</i> -Heptadecanoyl-L-glutamin	33.2 min	399
<i>N</i> -Stearoyl-L-glutamin	34.7 min	413

Tabelle 11: *N*-Acyl-glutaminkonjugate ungesättigter C-18 Fettsäuren und Volicitin (**19**)

Konjugat	Retentionszeit	APCI-MS
<i>N</i> -Oleoyl-L-gutamin (23)	28.6 min	411, 265, 147
<i>N</i> -Linoleoyl-L-glutamin (22)	30.2 min	409, 263, 147
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin (21)	32.2 min	407, 261, 147
Volicitin (19)	22.9 min	423, 405, 388, 259, 147

Tabelle 12: *N*-Linolenoyl-aminosäurekonjugate

Konjugat	Retentionszeit	APCI-MS
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glycin	30.8 min	336, 261
<i>N</i> -Linolenoyl-L-alanin	31.5 min	350, 332, 305, 261
<i>N</i> -Linolenoyl-L-valin	33.0 min	378, 361, 333, 261, 118
<i>N</i> -Linolenoyl-L-isoleucin	33.8 min	392, 347, 374, 261, 132
<i>N</i> -Linolenoyl-L-lysin	25,5 min	407, 261, 147
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin (21)	28.9 min	407, 389, 261, 147, 130
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamat (25)	29.3 min	408, 390, 261, 148
<i>N</i> -Linolenoyl-L-asparagin	28.5 min	393, 376, 261, 133
<i>N</i> -Linolenoyl-L-arginin	25.1 min	435, 261
<i>N</i> -Linolenoyl-L-phenylalanin	33.8 min	426, 409, 261, 166, 120
<i>N</i> -Linolenoyl-L-tyrosin	30.9 min	442, 425, 261, 182, 165
<i>N</i> -Linolenoyl-L-tryptophan	31.4 min	479, 434, 261, 219
<i>N</i> -Linolenoyl-L-cystein	32.4 min	382, 364, 261, 122
<i>N</i> -Linolenoyl-L-threonin	30.6 min	380, 363, 261, 120
<i>N</i> -Linolenoyl-L-serin	29.8 min	366, 349, 302, 261, 106

Tabelle 13: *N*-Linolenoyl-dipeptide

Konjugat	Retentionszeit	APCI-MS
<i>N</i> -Linolenoyl-glycyl-leucin	32.1 min	449, 431, 318, 290, 261
<i>N</i> -Linolenoyl-glutamyl-glycin 85	27.7 min	464, 446, 389, 261
<i>N</i> -Linolenoyl- β -alanyl-histidin	25.6 min	487, 469, 278, 261, 156, 110
<i>N</i> -Linolenoyl-alanyl-alanin	30.6 min	421, 332, 304
<i>N</i> -Linolenoyl-glutamyl-phenylalanin	30.6 min	555, 537

6.12 Untersuchungen zum Stoffwechsel der *N*-Acyl-aminosäuren

6.12.1 Herkunft der Glutaminkomponente in *N*-Acyl-glutaminen

S. exigua und *S. frugiperda* Raupen (3.-4. Larvalstadium) wurden 5-10 µl einer wässrigen Aminosäurelösung (^{13}C -Aminosäure Mischung aus Algen, 12 mg/ml bzw. $^2\text{H}_5$ -Glutamin und $^2\text{H}_5$ -Phenylalanin, jeweils 4 mg/ml H_2O) in die Hämolymphe injiziert. Injiziert wurde mit einer Mikroinjektionsnadel seitlich am Hinterteil der Raupe bei den letzten Beinpaaren. Nach der Injektion wurde 10 s gewartet und dann die Nadel vorsichtig herausgezogen. Um orale Aufnahme von Resten der Injektionslösung auszuschließen, wurde die Raupe mit Wasser gewaschen und kontrolliert, dass die Wunde verschlossen war. Nach 2 h, 4 h, 6 h und 18 h Fraß auf Kunstnahrung wurde Regurgitat gesammelt und wie beschrieben mit LC-MS analysiert. Der Einbau an markierten Glutamin (**24**) wurde durch Vergleich der Peakflächen des $[\text{M}+\text{H}]^+$ Ions bestimmt:

Tabelle 14: Einbau von markiertem Glutamin (**24**) in Volicitin (**19**) und in *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**)

Konjugat	2 h	4 h	6 h
$^{13}\text{C}_5$ -Volicitin/Volicitin (19 / $^{13}\text{C}_5$ - 19)	2.6 %	5.3 %	20 %
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin/ <i>N</i> -Linolenoyl-L- $^{13}\text{C}_5$ -glutamin (21 / $^{13}\text{C}_5$ - 21)	3.4 %	3.7 %	11 %

Konjugat	3 h	6 h	18 h
$^2\text{H}_5$ -Volicitin/Volicitin (19 / $^2\text{H}_5$ - 19)	1.5 %	20 %	0 %
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin/ <i>N</i> -Linolenoyl-L- $^2\text{H}_5$ -glutamin (21 / $^2\text{H}_5$ - 21)	4 %	39 %	0 %

Volicitin (**19**):

APCI-MS m/z : $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 405, 387, 259, 147, 130.

$^2\text{H}_5$ -Volicitin ($^2\text{H}_5$ -**19**) bzw. $^{13}\text{C}_5$ -Volicitin ($^{13}\text{C}_5$ -**19**):

APCI-MS m/z : $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 410, 392, 259, 152.

***N*-Linolenoyl-L-glutamin (21):**

APCI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 407, 389, 261, 147, 130.

***N*-Linolenoyl-L-[²H₅]-glutamin [²H₅]-21 bzw. Linolenoyl-[¹³C₅]-L-glutamin ([¹³C₅]-21):**

APCI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 412, 394, 261, 152.

Konjugate mit anderen Aminosäuren wurden nicht gefunden.

Analyse freier Aminosäuren im Darm von *S. exigua* Larven

Zur Analyse der freien Aminosäuren im Darm wurden 40 µl Regurgitat von *S. exigua* Larven mit 40 µl Methanol versetzt und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein GC-Gläschen überführt und das Lösungsmittel wurde im Argonstrom entfernt. Der Rückstand wurde mit 20 µl MSTFA bei 40 °C 1 h derivatisiert. 1.0 µl dieser Probe wurde ins GC-MS injiziert.

GC-MS-Bedingungen:

Finnigan, Trace MS, GC-Säule: Optima 5 MS, 15 m x 0.25 mm, 25 µm, Macherey & Nagel, D-52313 Düren, Deutschland; Trägergas: Helium: 3 ml/min; Injektortemperatur: 280 °C; splitless Modus; Temperaturprogramm: 50 °C 10 °C min⁻¹ bis 100 °C, 5 °C min⁻¹ bis 300 °C, 5 min 300 °C.

Als Referenzverbindungen wurden Aminosäuren mit MSTFA derivatisiert und unter identischen Bedingungen per GC-MS analysiert. Abgesehen von Glutamin bzw. Glutamat, nachgewiesen als MSTFA Derivate, ließen wenige andere Aminosäuren in größerer Menge im Darm von *S. exigua* Larven nachweisen. Nach Injektion der ¹³C-Aminosäuremischung wurden allerdings größere Mengen an Serin gefunden.

6.12.2 Versuche zur Gewinnung mikroorganismenfreier Raupen

6.12.2.1 Versuch, mikroorganismenfreie Raupen durch Fütterung von Antibiotika zu gewinnen

Da sich in Vorversuchen konventionelle Antibiotika wie Chloramphenicol, Ampicillin und sogar Vancomycin als wenig wirksam gegen die Darmbakterien der Raupen (*S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. littoralis*) gezeigt hatten, wurde Fosmidomycin (**86**) verwendet, das Andreas Jux synthetisiert hatte.^[156]

S. frugiperda und *S. exigua* Larven wurden ab dem 2. Larvalstadium in einen Exsikkator mit abgeschnittenen Limabohnenpflanzen gesetzt, die zuvor 1 d mit Fosmidomycin Lösung (0.05 mg/ml-0.2 mg/ml) vorinkubiert worden waren.

Als Kontrolle wurden parallel *S. frugiperda* bzw. *S. exigua* Larven auf unbehandelten Bohnenpflanzen gehalten.

Jeden Tag wurden 5 µl Regurgitatproben gesammelt, mit 5 µl 100 µg/ml *N*-([²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) bzw. Linolenoylvalin als Standard versetzt, und per LC-MS untersucht. Nur bei den *S. frugiperda* Larven konnte eine kontinuierliche Reduktion der *N*-Acyl-glutaminkonjugate auf etwa 1/10 – 1/25 der ursprünglichen Konzentration gefunden werden. Dieser Versuch wurde 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt und jeweils über mehrere Tage Proben untersucht.

Tabelle 15: Abnahme von *N*-Acyl-glutaminen im Regurgitat von *S. frugiperda* Larven

Versuchs-Dauer	Volicitin (19) Kontrolle / [0.5 mg/ml]	<i>N</i> -Linolenoyl-glutamin (21) Kontrolle / [0.5 mg/ml]	Volicitin (19) Fosmidomycin / [0.5 mg/ml]	<i>N</i> -Linolenoyl-glutamin (21) Fosmidomycin / [0.5 mg/ml]
7 d	7.65	4.65	0.31	1.04
6 d	5.84	1.76	0.53	1.49
3 d	3.92	3.24	0.46	0.47
6 d	0.85	0.39	0.52	0.08
5 d	13.03	6.8	0.04	0.16
4 d	5.05	2.83	0.03	0.06
Mittelwert	6.06	3.28	0.32	0.55

Bei einem weiteren Versuch wurde eine drastische Abnahme der Konjugate auch in der Kontrollgruppe beobachtet. Dieses Phänomen, dass die *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat plötzlich praktisch vollständig fehlen, wurde zuvor bereits von Verena Jung beobachtet.^[162]

6.12.2.2 Versuch, mikroorganismenfreie Larven durch Oberflächensterilisation der Gelege und sterile Aufzucht zu erhalten

Eier von *S. exigua* Raupen wurden mit Peressigsäure sterilisiert und einzeln in verschlossenen, mit Kunsnahrung versetzten Röhrchen im Labor von Dr. Dillon (Bath University, England) aufgezogen. Die Sterilität der aufgezogenen Larven wurde durch Verweilen der Raupen auf sterilen Agarplatten (auf denen sich vorhandene Mikroorganismen entwickeln könnten) kontrolliert. Die sterilen Larven wurden lebend von Bath nach Jena transportiert bzw. geschickt. Zu den Regurgitatproben wurde die gleiche Volumenmenge einer *N*-([²H]-Phenyldodecanoyl)-L-glutamin (**84**) Lösung (100 µg/ml) als Standard gegeben und mit 20 µl Methanol versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben sofort per LC-MS analysiert. Zur Kontrolle wurde Regurgitat von unbehandelten *S. exigua* Larven, die mit der gleichen Diät wie die axenischen Larven ernährt wurden, per LC-MS analysiert.

Tabelle 16: *N*-Acyl-glutaminkonjugate im Regurgitat von *S. exigua* Larven nach Oberflächensterilisation der Eier im Vergleich zum Regurgitat unbehandelter *S. exigua* Larven

	Volicitin (19) (x 100 µg/ml)	OHLAGln (20) (x 100 µg/ml)	LEAGln (21) (x 100 µg/ml)	LAGln (22) (x 100 µg/ml)	LEAOLEAGln (47) (x 100 µg/ml)	LEAOLAGln (48) (x 100 µg/ml)	Summe
oberflächensterilisiert	0.24	0.52	0.42	2.17	0	0	3.35
oberflächensterilisiert	0.11	0.21	0.07	0.53	0	0	0.9
oberflächensterilisiert	0.04	0.07	0	0.02	0	0	0.13
oberflächensterilisiert	0.1	0.23	0	0.03	0	0	0.36
oberflächensterilisiert	0.04	0.14	0.04	0.45	0	0	0.67
oberflächensterilisiert	0.08	0.42	0	0.10	0	0	0.6
oberflächensterilisiert	0.06	0.26	0.05	0	0	0	0.37
Kontrolle	0.21	0.69	0.06	0.41	0	0	1.37
Kontrolle	0.08	0.24	0.31	1.44	0.09	0,16	2.32
Kontrolle	0.15	0.41	0.08	0.56	0.32	0.61	2.13

6.13 Anzucht von Limabohnen (*Phaseolus lunatus*)

Die Samen der Limabohnen *Phaseolus lunatus* Ferry Morse cv. Jackson Wonder Bush stammten von der Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Limburgerhof der BASF AG. Die Pflanzen wurden in Gefäßen mit 5.5 cm Durchmesser auf eine etwa 5 cm dicke Erdschicht (sterilisierte Pflanzerde, Capriflor) gelegt und anschließend mit einer etwa 1 cm dicken Erdschicht bedeckt. Nach 12-15 Tagen wurden die Pflanzen für Versuche verwendet.

Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und 80 % Luftfeuchte und einem 14 h Tag / 10 h Nacht Rhythmus mit einer Lichtintensität von 270 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.14 Duftassay mit Limabohnen

10-15 Tage alte Limabohnen wurden mit einer scharfen Rasierklinge abgeschnitten und sofort in eine wässrige Lösung der zu testenden Substanz gestellt. Die Pflanzenprobe wurde in einen Exsikkator gestellt, und der Exsikkator verschlossen. Mit Hilfe einer Miniaturpumpe wurde das Luftvolumen des Exsikkators durch einen Kohlefilter gepumpt, an dem die flüchtigen Duftstoffe adsorbiert wurden.^[284] Nach 1 bzw. 2 d wurde der Versuch abgebrochen. Der Kohlefilter wurde aus der Pumpe entnommen und 3-mal mit 10 μl CH_2Cl_2 - versetzt mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Bromdecan als Standard - eluiert. 1 μl der Probe wurde per GC-MS analysiert.

GC-Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm , Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml/min, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, 10°C/min 200°C, 30 °C/min 280 °C 1 min; Injektortemperatur 220 °C; Split: 1:10

6.14.1 Inkubation von Limabohnen mit *N*-Acyl-aminosäure-konjugaten und Volicitin

Etwa 14 Tage alte Limabohnen (*Phaseolus lunatus*) wurden am Stiel abgeschnitten und sofort mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Lösungen der Konjugate in Leitungswasser gestellt. Die Bohnenpflanze wurde in einem 750 ml Exsikkator gesetzt. 1-2 d wurden die Duftstoffe der Gasphase durch Adsorption an Kohlefilter gesammelt. Nach Elution der Duftstoffe mit Dichlormethan wurden die Proben per GC-MS analysiert (siehe 6.14). Durch Vergleich der Peakflächen der Duftstoffe mit der Peakfläche des zugesetzten Standards (Bromdecan) konnte das Ausmaß der Induktion abgeschätzt

bzw. mit den Messungen anderer Proben verglichen werden. In Tabelle 14 ist die Menge der gebildeten Duftstoffe in Prozent der Peakfläche des Duftstoffes zum Standard angegeben.

Weder nach Inkubation von Limabohnen mit Volicitin (**19**) noch mit *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) oder (17*S*)-*N*-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (**48**) wurde Freisetzung von Duftstoffen bei der Limabohne beobachtet (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17 Ergebnisse der Induktion der Duftstoffe von Limabohnen durch *N*-Linolenoyl-L-glutamin (**21**) bei verschiedenen pH-Werten (Einheit: % Peakfläche Duftstoff/Standard).

Verbindung	Ocimen (9) (%)	Linalool (10) (%)	DMNT (11) (%)	MeSA (13) (%)	TTMT (13) (%)
Volicitin	0	0	1,2	0	0
Volicitin	0	0	0	0	0
EpoxyLAGln	0	0	1	0	0
EpoxyLAGln	0	0	1	0	0
LEAOLAGln	0	0	0	0	0
LEAOLAGln	0	0	0	0	0
LEAOLAGln	0	0	0	0	0
LEAGln pH 7	0	0	7	68	23
LEAGln pH 8	0	0	0	0	0
LEAGln pH 8	0	0	1,3	7	0
LEAGln pH 8	0	0	1	3,6	0,5
LEAGln pH 8	0	0	1,5	9	2
LEAGln pH 8	0	0	0,7	4	0,8
LEAGln pH 9	0	0	0	0	0
LEAGln pH9	0,5	0,8	8,7	20	10
LEAGln pH 9	0	0	0	0	0
LEAGln pH 10	0	0	0	0	0
LEAGln pH 10	0	0	11	8	3
LEAGln pH 10	0	0	12	50	27
LEAGln pH 10	0	0	2	5	1

6.14.2 Inkubation von Limabohnen mit NaOH-, KOH- und NaCl-

Lösungen

Das Regurgitat von *Spodoptera* Larven weist einen extrem basischen pH Wert von etwa 10 auf. Um einen möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die Duftstoffbildung in Limabohnen zu prüfen, wurden abgeschnittene Pflanzen 1 h in wässrige Lauge-Lösungen (siehe Tabelle 18) gesetzt und danach in Leitungswasser gestellt. Alternativ wurden die abgeschnittenen Limabohnen während des ganzen Versuchs

1 d in NaOH, KOH und NaCl-Lösungen gestellt. Duftstoffe wurden wie oben beschrieben (siehe 6.14) gesammelt und analysiert. Zur Abschätzung des Ausmaßes der Duftstoffinduktion wurden die Peakflächen der Duftstoffe mit dem zugesetzten Standard (Bromdecan) verglichen. In Tabelle 18 ist die Menge der gebildeten Duftstoffe in Prozent der Peakfläche des Duftstoffes zum Standard angegeben.

Tabelle 18: Duftstoffe der Limabohne nach Inkubation mit NaOH- bzw. KOH- und NaCl-Lösungen (Einheit: % Peakfläche Duftstoff/Standard).

Inkubationslösung	Hexenylacetat (16) (%)	Ocimen (9) (%)	Linalool (10) (%)	DMNT (11) (%)	MeSA (13) (%)	C ₁₀ H ₁₆ O (%)	TMTT (12) (%)
NaOH 5 % 1 d	243	165	103	384	43	170	358
NaOH 5 % 1 h	0	19	30	193	7.5	63	65
NaOH 5 % 1 h	299	107	46	107	0	70	41
NaOH 5 % 1 h	122	108	46	115	11	81	51
NaOH 5 % 1 h	300		9	107	11		41
NaOH 3 % 1 h	32	2.50	33	264	26	195	71
NaOH 3 % 1 h	7	0	23	119	19	60	124
NaOH 3 % 1 h	13	0	36	194	19	66	52
NaOH 1 % 1 d	0	0	31	54	21	20	124
NaOH 1 % 1 d	0	0	73	122	49	41	291
NaOH 1 % 1 d	5	0	29	99	10	22	145
NaOH 1 % 1 d	24	0	23	64	13	7	65
NaOH 1 % 1 d	14	0	50	158	35	45	152
NaOH pH 10 1d	5,9	0	0	43	31		22
NaOH pH10 1 d	0	0	0	50	27		46
NaOH pH 10 30 min	0	0	0	4	7		2
KOH 10 mg/ml 1 d	141	14	41	69	0	28	10
KOH 10 mg/ml 1 d	132	0	5	53	0	12	3
NaCl 10 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 20 mg/ml 30 min	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 20 mg/ml	0	0	0	0	26	0	0
NaCl 20 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 20 mg/ml							
NaCl 20 mg/ml	0	0	0	18	46	0	21
NaCl 20 mg/ml 1 d	0	0	0	1,70	1	0	0
NaCl 20 mg/ml 1 d	0	0	0	38	70	0	37
NaCl 20 mg/ml 1 d	0	0	0	130	75	0	134
<i>S. frugiperda</i> 1 d	21	71	56	70	3,6	65	18
<i>S. littoralis</i> 1 d	0	46	0	50	1,3	17	57

Bei hoher Laugekonzentration (1 %-ige Lösung entspricht pH 12.6) wurde bei allen untersuchten Proben eine intensive Induktion der Duftstoffbildung festgestellt. Bei Inkubation mit NaCl-Lösung wurde nur gelegentlich eine Bildung von Duftstoffen beobachtet.

6.14.3 Inkubation von Limabohnen mit Tris- und Mes-Pufferlösungen bei verschiedenen pH Werten

Der Einfluss von basischen pH Werten auf die Physiologie der Limabohne wurde durch Simone Bossi untersucht. Dazu wurde die Potentialänderung von Limabohnenblattstücken bei unterschiedlichen pH Werten verfolgt. Für den Versuch wurde eine gepufferte Lösung benötigt. Daher wurden Versuche mit 50 mM und 5 mM Mes (**87**) und Tris (**88**) Puffer zur Induktion der Duftstoffbiosynthese durchgeführt. Abgeschnittene Limabohnenpflanzen wurden 1 d-1.5 d in Pufferlösungen bei pH 6, 7, 8, 9, 10 bzw. 11 gestellt.

Tabelle 19: Duftstoffe der Limabohne nach Inkubation mit Mes-Puffer (Einheit: % Peakfläche Duftstoff/Standard).

Inkubationslösung	DMNT (11) (%)	MeSA (13) (%)	TMTT (12) (%)
Mes 5 mM pH 6	0	0	0
Mes 5 mM pH 6	11	28	6
Mes 5 mM pH 6	42	85	51
Mes 5 mM pH 9	20	10	6
Mes 5 mM pH 9	23	48	20
Mes 5 mM pH 9	15	18	9
Mes 5 mM pH 10	16	60	29
Mes 5 mM pH 10	2	92	40
Mes 5 mM pH 11	24	55	38
Mes 5 mM pH 10	0	0	0
Mes 50 mM pH 6	31	128	57
Mes 50 mM pH 6	23	84	39
Mes 50 mM pH 7	5	43	11
Mes 50 mM pH 7	29	122	55
Mes 50 mM pH 9	4	9	3
Mes 50 mM pH 9	6	11	9
Mes 50 mM pH 10	27	17	29
Mes 50 mM pH 10	9	47	7

Bei allen pH Werten konnten bei 50 mM Pufferkonzentration die Bildung beträchtlicher Mengen an Methylsalicylat (**13**), DMNT (**11**) und TMTT (**12**) nachgewiesen werden. Beim Mes (**87**) Puffer wurde bei pH 6 und 7 viel

Methylsalicylat (**13**) gefunden, bei pH 11 besonders große Mengen an TMTT (**12**) (siehe Tabelle 19).

Bei den Inkubationsversuchen mit abgeschnittenen Limabohnen und Tris-Puffer wurden insbesondere bei einer Konzentration von 50 mM im Vergleich zum Mes-Puffer eine wesentlich höhere Duftstoffproduktion festgestellt.

Bei allen Versuchen wurde immer nur ein reduziertes Duftspektrum mit DMNT (**11**), TMTT (**12**) und MeSA (**13**) erhalten. Die Menge der durch Puffer induzierten Duftstoffe lag auch bei einer Konzentration von 5 mM und geeignetem pH-Wert mindestens im Bereich der durch Raupenfraß induzierten flüchtigen Stoffe.

Tabelle 20: Duftstoffe der Limabohne nach Inkubation mit Tris-Puffer (Einheit: % Peakfläche Duftstoff/Standard).

Inkubationslösung	DMNT (11) (%)	MeSA (13) (%)	TMTT (12) (%)
Tris 5 mM pH7	2	4	1
Tris 5 mM pH7	1	11	3
Tris 5 mM pH9	0	0	0
Tris 5 mM pH9	0	0	0
Tris 5 mM pH 11	14	49	6
Tris 5 mM pH 11	14	51	0
Tris 50 mM pH 6	265	302	648
Tris 50 mM pH 6	114	92	406
Tris 50 mM pH 7	169	288	338
Tris 50 mM pH 9	205	267	667
Tris 50 mM pH9			
Tris 50 mM pH11	78	166	64
Tris 50 mM pH11	167	222	585

6.14.4 Inkubation von Limabohnen mit BHI-Medium

Abgeschnittene Limabohnen wurden in 5 ml 100 mg/ml BHI-Medium Lösungen gestellt und in einen 750 ml Exsikkator zur Sammlung von Duftstoffen mit der „closed loop stripping“ Technik überführt. Nach 1 d wurde der Versuch abgebrochen. Die Kohlefilter wurden 3-mal mit je 10 µl Dichlormethan (versetzt mit 200 µg/ml Bromdecan als Standard) eluiert und die Proben per GC-MS analysiert. Die Bohnenpflanzen reagierten auf das BHI-Medium mit der Bildung von Duftstoffen. Die Menge der gebildeten Duftstoffe ist in % im Vergleich zum Standard angegeben:

Tabelle 21: Produktion von Duftstoffen nach Inkubation von Limabohnen mit 100 mg/ml BHI-Medium (Einheit: % Peakfläche Duftstoff/Standard).

Hexenylacetat (16)	Ocimen (9)	Linalool (10)	DMNT (11)	MeSA (13)	TMTT (12)
0 %	0	20 %	56 %	15 %	196 %
10 %	2 %	15 %	158 %	13 %	300 %

6.15 Tenseideigenschaften von *N*-Acyl-aminosäuren

Zur Charakterisierung ihrer Tenseideigenschaften wurde die Oberflächenspannung von wässrigen *N*-Acyl-aminosäure Lösungen mit Hilfe eines Lauda TC1 Tensiometer nach der Du Noüy Ringmethode^[289] bestimmt (siehe Tabelle 22). Durch Messung von unterschiedlich konzentrierten *N*-Linolenoyl-L-glutamin Lösungen konnte für *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21) eine kritische Micellbildungskonstante (cmc) von etwa 10 µg/ml bestimmt werden.

Tabelle 22: Oberflächenspannung von *N*-Acyl-aminosäuren

Verbindung	Oberflächenspannung mN/m	Konzentration µg/ml
<i>N</i> -Oleoyl-L-glutamin (23)	31	100
<i>N</i> -Oleoyl-L-glutamat (27)	30	100
<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin (21)	30	200
	30	100
	31	10
	57	1
	61	0.1
<i>N</i> -Palmitoleoyl-L-glutamin	29	100
<i>N</i> -Palmitoyl-L-glutamin	51	100
<i>N</i> -Myristoyl-L-glutamin	52	100
Wasser	72	-

Parallel dazu wurden die Tenseideigenschaften des Regurgitates von Lepidoptera Larven (*S. exigua*, *S. littoralis*, *S. fugiperda* und *H. virescens*) mit einer *N*-Linolenoyl-L-glutamin Lösung (100 µg/ml) verglichen. Dazu wurden 3 µl der zu untersuchenden Lösung auf Parafilm getropft und die Tropfengröße unter einem Stereomikroskop mit skaliertem Okular bestimmt.^[73] Regurgitattropfen und Tropfen der *N*-Linolenoyl-L-glutamin Lösung (100 µg/ml) wiesen identische Tropfendurchmesser auf (siehe Tabelle 8).

6.16 Black-Lipid-Membrane Assay

Der Black-Lipid-Membrane Assay dient der Untersuchung von Leitfähigkeitsphänomenen an Membranen. Dazu wird die Bohrung einer Doppelkammerküvette mit einer künstlichen Lipidmembran verschlossen. Beide Seiten der Küvette sind über Salzbrücken mit Ag/AgCl Elektroden verbunden, die über einen hochempfindlichen Verstärker an ein Oszilloskop angeschlossen sind. Nach Applikation einer Substanz in die mit Pufferlösung gefüllten Küvetten und Anlegen von Spannung wird untersucht, ob ein Stromfluss auftritt (siehe Abbildung 32).

Vor Beginn eines Experimentes wurde die Doppelkammerküvette mit Wasser, Ethanol und Hexan gründlich gespült. Für jeden Versuch wurden frische KCl-Salzbrücken verwendet. Die Küvetten wurden nach jedem Versuch mit Helmanex, Methanol und Hexan gewaschen. Bei Bedarf wurde mit Chromschwefelsäure gereinigt.

Zu Versuchsbeginn wird die Umgebung der Bohrung der Doppelkammerküvette mit 0.5 % Dioleoylphosphatidylethanolamin in Hexan imprägniert. Nach dem Trocknen werden Magnetrührer in die Küvette eingesetzt und beide Kammern mit 3 ml 100 mM KCl/20 mM Hepes-Lösung (pH 7) gefüllt. Die Küvette wird in den Halter des Faradayschen Käfigs eingesetzt und beide Kammern mit Salzbrücken mit je einer 100 mM NaCl Lösung, in die die Ag/AgCl Salzbrücken eintauchen, leitend verbunden. Mit einer im 90 °C Winkel gebogenen Spitze einer Eppendorfpipette wird in die Bohrung der Doppelkammerküvette eine 1.5 % Lösung des Lipids in Decan aufgetragen. Die Ausbildung der Lipiddoppelschicht (Schwarzfärbung) wird durch ein Okular verfolgt.

Nach Schließen des Faradayschen Käfigs, Rühren und ca. 5 min Wartezeit wird die Leitfähigkeit und Kapazität der Membran bestimmt.

Nach diesen Vorbereitungen wurde *S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda* Larven Regurgitat abgenommen. 2-10 µl des frischen Regurgitates wurden in eine Kammer der Doppelküvette gegeben.^[162]

Nach Anlegen von ±60 mV Spannung wurden etwaige Veränderungen in der Leitfähigkeit oder Kanalöffnungsereignisse am Oszilloskop verfolgt und per Software gespeichert. Regurgitat aller untersuchten Lepidoptera Larven führte reproduzierbar zur deutlicher Änderung der Leitfähigkeit und zu Kanalöffnungsereignissen.

Ähnliche Reaktionen wie mit Regurgitat von Raupen wurden auch nach Applikation von Alamethicin,^[59] einem bekannten Ionophor und Elicitor der Duftstoffbiosynthese von Pflanzen, sowie mit gemörserter Blattmasse von *Phaseolus lunatus*, beobachtet.

6.17 Ein Alkaloid aus dem Regurgitat von *Spodoptera*

Larven: 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90)

Bei der Untersuchung von Regurgitat mittels LC-MS wurde eine Verbindung, die bei 19.3 min kurz vor Volicitin eluierte, untersucht. Die Verbindung zeichnete sich durch ein UV-Spektrum mit Absorptionsmaximum bei 258 nm aus. Im APCI-MS wies sie 2 Peaks bei $m/z = 162$ (30) und 190 (100) auf. Nach Sammeln der Verbindung per HPLC wurde sie für die GC-MS Analyse mit Diazomethan methyliert.

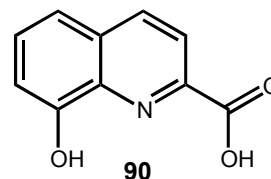
HPLC Bedingungen:

HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 3 μm ; Laufmittel: A: H_2O 0.5 % AcOH; B: CH_3CN 0.5 % AcOH, Flussrate: 0.2 ml/min; Gradient: 0 % B 3 min, in 27 min 100 % B, 100 % B 15 min.

8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (90):

Retentionszeit: 19.35

APCI-MS m/z (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 190 (100), 162 (30).



GC-MS Bedingungen:

GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 μm ; Trägergas: Helium; konstanter Druck: 30 kPa; sp; Injektortemperatur 280 °C; Splitless Modus; Temperaturprogramm: 50 °C in 10 °C/min 100 °C in 5 °C/min 300 °C isotherm 5 min.

EI-MS des methylierten Produktes:

8-Hydroxychinolin-2-carbonsäuremethylester:

Retentionszeit: 16.32 min

EI-MS m/z (%): $\text{M}^{+\bullet}$ 203 (87), 171 (53), 143 (100), 115 (58), 89 (36), 63 (23).

HR-EI-MS: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3$ gefunden: $\text{M}^{+\bullet}$ 203.0573 berechnet: 203.0582.

Mit Hilfe von Vergleichspektren und Referenzsubstanzen konnte die Verbindung als 8-Hydroxy-2-chinolincarbonsäuremethylester identifiziert werden.

6.18 Untersuchungen zur Desaktivierung von Benzoesäure in Antennen von *Bombyx mori*

6.18.1 Herkunft und Haltung von *B. mori*

B. mori Puppen wurden von verschiedenen Züchtern bezogen: Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Via de Colli 28, I-35143 Padua, Italien; INRA-Unité nationale séricicole, 25 Quai Jean-Jacques Rousseau, F-69350 La Mulatière, Frankreich; Worldwide Butterflies and Lullingstone Silk Farm, Sherborne, Dorset DT9 4QN und von Neil Naish, 51 Justins Avenue, Stratford upon Avon, Warks CV37 0DF, England. Zum Schlüpfen wurden die Kokons bei 65 % relativer Luftfeuchtigkeit und 22 °C gehalten. Die Adulten wurden bei 12 °C aufbewahrt. Die Versuche wurden bei 20 ± 2 °C mit frisch abgeschnittenen Antennen 1 bis 3 d alter Motten durchgeführt. Abgeschnittene Antennen blieben bis zu 24 h aktiv, da man Signale einzelner Rezeptorzellen aufnehmen konnte (Kaisling unpubliziert).

6.18.2 Beblasen von *B. mori* Antennen mit Benzoesäure

10 mg Baumwolle wurde mit 100 µg [¹⁴C]-Benzoesäure ([¹⁴C]-**92**) getränkt und in ein Glasröhrchen gegeben (Länge 5.5 cm, Innendurchmesser 7 mm). Durch das Röhrchen wurden kurze Luftstöße (10 s) mit einer Flussrate von 100 ml/s geblasen, am Auslass des Röhrchens wurde so ein kontinuierlicher Fluss von 2.6 m/s erreicht. Das Glasrohr wurde mit einem zweiten Glasrohr, in dem 20 Antennen plaziert waren, verbunden. Die Menge der adsorbierten Benzoesäure (**92**) pro Antenne betrug 250 pg (s. d. = 64 pg, n = 4), was 1.2 x 10¹² Molekülen entspricht.

6.18.3 Inkubation der Antennen von *B. mori* mit Benzoesäure

In ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen wurde 1 µg [²H₅]-Benzoesäure ([²H₅]-**92**) bzw. [¹⁴C]-Benzoesäure ([¹⁴C]-**92**) gelöst in 5 µl Aceton gegeben. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurden 20 frisch abgeschnittene Antennen dazugegeben und die

Antennen 30 min bzw. 20 h im geschlossenen Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Danach wurden die Antennen mit Chloroform Methanol 2:1 extrahiert.

6.18.4 Kontrollversuche

Als Kontrollen wurden 2 h auf 120 °C erhitzte oder auf –25 °C abgekühlte Antennen mit [¹⁴C]-Benzoessäure (**[¹⁴C]-92**) (1 µg gelöst in 5 µl Aceton) inkubiert. Außerdem wurde untersucht, ob man mit frisch abgeschnittenen Beinen, Flügeln oder Baumwollstücken eine Umsetzung von Benzoessäure (**92**) beobachtet. Eine Umsetzung war nicht nachweisbar.

6.18.5 Identifikation von Metaboliten

Das Lösungsmittel der Extrakte von Antennen, die mit [²H₅]-Benzoessäure (**[²H₅]-92**) behandelt worden waren, wurde im Argonstrom entfernt. Die Proben wurden mit 1 ml etherischer Diazomethanlösung methyliert. Nach 1 min wurde überschüssiges Diazomethan und der Ether im Argonstrom entfernt. Der Rückstand wurde in 10 µl Methanol aufgenommen. Vom Methanolextrakt wurde 1 µl in das GC-MS System injiziert.

GC-MS-Bedingungen:

GC-Säule: Alltech EC5 (15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas Helium, Flussrate 1 ml/min) Temperaturprogramm: 50 °C, 10 °C min⁻¹ bis 100 °C, mit 5 °C min⁻¹ bis 300 °C, 5 min isotherm 300 °C, Injektortemperatur: 280 °C, splitless Modus.

GC-HR-MS-Bedingungen:

Hochauflösende GC-MS wurde mit einem Micromass MasSpec - verbunden mit einem Hewlett Packard HP6890 II Gas Chromatographen und ausgestattet mit einer DB-5 (J&W Scientific) Kapillarsäule (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) - durchgeführt.

Temperaturprogramm: 30°C isotherm 2 min, von 30°C bis 100 °C mit 10 °C/min, dann mit 5 °C/min bis 300 °C, 300 °C isotherm 5 min, Injektortemperatur: 220 °C, Transferlinie: 270 °C, Trägergas: Helium, Flussrate: 1 ml/min, splitless Modus.

Die EI-Massenspektren (70 eV) wurden bei einer Quellentemperatur von 200 °C aufgenommen (Beschleunigungsspannung 8 kV und Auflösung von 5000 im Massenbereich m/z = 35 bis m/z = 300).

Nach möglichen Metaboliten wurde mit Hilfe der Ionenspuren $m/z = 105$ (für unmarkierte Benzoylfragmente) bzw. $m/z = 110$ (für $[^2\text{H}_5]$ -Benzoylfragmente) gesucht.

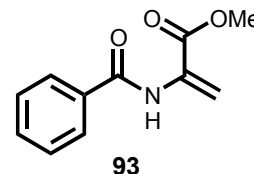
N-Benzoylserin als Referenzverbindung wurde ebenfalls mit Diazomethan verestert und anschließend per GC-MS vermessen.

EI-MS des methylierten Metaboliten nach Inkubation mit Benzoesäure (**92**):

2-Benzoylamino-acrylsäuremethylester (93):

Retentionszeit: 15.85 min

EI-MS m/z (%): $\text{M}^{+\bullet}$ 205 (18), 173 (22), 105 (100), 77 (37), 51 (6).



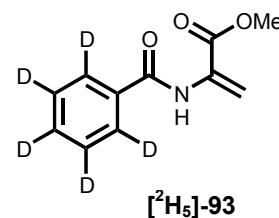
HR-EI-MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ beobachtet: 205.0745, berechnet: 205.0739.

EI-MS des methylierten Metaboliten nach Inkubation mit $[^2\text{H}_5]$ -Benzoesäure ($[^2\text{H}_5]$ -**92**):

$[^2\text{H}_5]$ -2-Benzoylamino-acrylsäuremethylester ($[^2\text{H}_5]$ -93):

Retentionszeit: 15.85 min

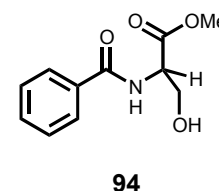
EI-MS m/z (%): $\text{M}^{+\bullet}$ 210 (19), 178 (22), 110 (100), 82 (43).



***N*-Benzoylserinmethylester (94):**

Retentionszeit: 20.13 min

EI-MS m/z (%): $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ 205 (4), 193 (10), 173 (2), 164 (9), 161 (10), 146 (16), 133 (3), 122 (9), 105 (100), 77 (37), 51 (8).



Für die LC-MS Untersuchungen wurde der Extrakt der Antennen im Argonstrom getrocknet und anschließend in 50 μl Methanol wieder aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 20 μl injiziert.

HPLC-Bedingungen:

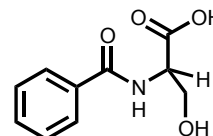
HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 3 μm ; Laufmittel: A: H_2O 0.5 % AcOH; B: CH_3CN 0.5 % AcOH, Flussrate: 0.2 ml/min; Gradient: 0 % B 3 min, in 27 min 100 % B, 100 % B 15 min

Thermoquest LCQ mit APCI Ionenquelle (Verdampfertemperatur: 450 °C)

Die Referenzverbindung *N*-Benzoylserin (**95**) zeigte gleiches chromatographisches Verhalten und ein identisches APCI-Massenspektrum wie der untersuchte Metabolit.

***N*-Benzoylserin (**95**):**

APCI-MS *m/z* (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 210 (63), 192 (16), 164 (4), 136 (6), 118 (10), 105 (100).



95

6.19 Untersuchungen zur Geosminbiosynthese in *Streptomyces* spp. und dem Lebermoos *Fossombronia pusilla*

6.19.1 Deuterierte Terpenbiosynthesevorstufen

[5,5- $^2\text{H}_2$]-1-Desoxy-D-xylulose (**[5,5- $^2\text{H}_2$]-104**), [2,2- $^2\text{H}_2$]-Mevalolacton (**[2,2- $^2\text{H}_2$]-105**) und [4,4,6,6,6- $^2\text{H}_5$]-Mevalolacton (**[$^2\text{H}_5$]-105**) wurden von Dr. Andreas Jux synthetisiert.^[156]

6.19.2 Kultivierung des Lebermooses *Fossombronia pusilla*

Fossombronia pusilla Kallus Kulturen waren ein Geschenk von Prof. Dr. Hans Becker (Universität Saarbrücken). Sie wurden auf B5-Agar (Sigma) in 100 ml Erlenmeyer Kolben bei 21 °C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14 h hell und 10 h dunkel angezogen. B5 Medium: 3.1 g B5 Salz, 1:1000 verdünntes B5 Vitamin Pulver, 1 l H_2O , 8 g Agar und 20 g Saccharose wurden verrührt und anschließend autoklaviert.

6.19.3 Kultivierung von *Streptomyces* sp. JP95 und „*Streptomyces maritimus*“

„*Streptomyces maritimus*“ wurde aus marinen Ablagerungen vom Wailupe Beach Park, Hawaii, isoliert. *Streptomyces* spp. JP95 stammte vom Ascidian *Aplidium lenticulum*, der am Great Barrier Reef in Australien gefunden wurde. Die Bakterien wurden in 50 ml A1 Flüssigmedium auf einem Schüttler (100 upm) bei 28 °C angezogen.

A1 Medium: 10 g Kartoffelstärke, 4 g Hefeextrakt, 2 g Pepton, 28 g Instant Ocean (Aquarium Systems) und 10 ml 1M Tris/HCl Puffer (pH 8) wurden in 1 l H₂O aufgelöst und autoklaviert.

6.19.4 Fütterung markierter Terpenbiosynthesevorstufen und Sammlung der Duftstoffe

1 ml einer wässrigen Lösung (1-4 mg/ml) der deuterierten Vorstufen Mevalolacton oder DOX wurden mit einer Spritze entweder ins Medium mit den Mikroorganismen oder auf das in 100 ml Erlenmeyer Kolben wachsende Lebermoos getropft. Die Kolben waren mit einem Septum luftdicht verschlossen. Flüchtige Verbindungen wurden mit einem Kohlefilter gesammelt, indem man mit einer Miniatur Pumpe kontinuierlich die Luft im Erlenmeyerkolben durchpumpte („closed loop stripping“).^[284] Nach 1 d, 2 d oder 3 d Sammelzeit wurden die am Kohlefilter adsorbierten Duftstoffe mit 3 x 10 µl Dichlormethan eluiert.

6.19.5 GC-MS Analyse der Duftproben

Die so erhaltenen Duftstoffproben wurden mit einen Finnigan Trace MS (70 eV) vermessen.

GC-Bedingungen:

GC-Säule: Alltech EC 5 Säule 15m x 0.25 mm, 0,25 µm; Injektortemperatur: 280 °C; Splitless Modus; Temperaturprogramm: 50 °C 2min, 10 °C/min 200 °C, 30°C/min 280 °C 1min; Trägergas: Helium Fluss: 3 ml/min; Injektionsvolumen 1-2 µl.

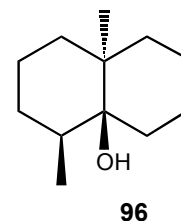
Bei den Deuteriumausstauschexperimenten wurde zur Probe D₂O/CD₃OD gegeben. Vor Injektion der Geosminproben wurden Wasserspuren im Liner und der Säule

durch 3-malige Injektion von CD₃OD beseitigt, um so einen Rücktausch aktiver Deuteriumatome gegen Wasserstoffatome im GC-MS System zu reduzieren.

6.19.6 EI-MS Spektren von Geosmin (96)

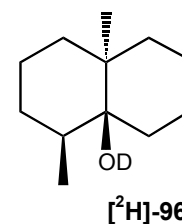
Geosmin (96):

EI-MS m/z (%): M⁺ 182 (5), 167 (2), 149 (6), 126 (16), 125 (19), 112 (100), 111 (48), 97 (18), 95 (12), 83 (11), 81 (9), 69 (15), 67 (14), 55 (18), 43 (18).



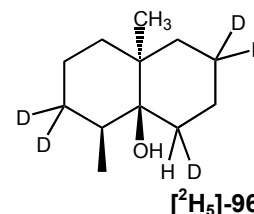
Geosmin nach H²H-Austausch ([²H]-96):

EI-MS m/z (%): M⁺ 183 (4), 168 (2), 149 (4), 127 (6), 126 (27), 113 (77), 112 (100), 111 (12), 98 (13), 96 (12), 95 (9), 84 (10), 83 (10), 67 (13), 55 (25), 43 (18).



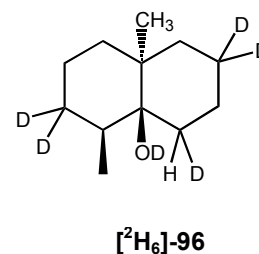
[²H₅]-Geosmin ([²H₅]-96) von *Streptomyces* sp. JP95 nach Applikation von [²H₂]-DOX ([²H₂]-104):

EI-MS m/z (%): M⁺ 187 (4), 172 (2), 154 (4), 129 (13), 128 (10), 127 (15), 117 (9), 116 (100), 115 (31), 114 (29), 100 (10), 99 (13), 86 (12), 84 (10), 72 (5), 71 (6), 57 (15), 56 (12), 43 (16).



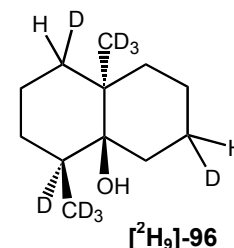
[²H₆]-Geosmin [²H₆]-96 von *Streptomyces* sp. JP95 nach Applikation von [²H₂]-DOX ([²H₂]-104) und H²H-Austausch:

EI-MS m/z (%): M⁺ 188 (6), 173 (3), 154 (8), 130 (7), 129 (20), 128 (17), 117 (43), 116 (100), 115 (49), 114 (20), 99 (18), 86 (13), 70 (13), 69 (11), 57 (15), 56 (14), 43 (16).



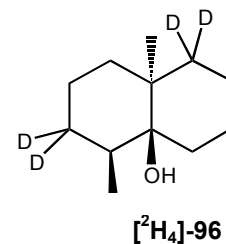
[²H₉]-Geosmin ([²H₉]-96) von *F. pusilla* nach Applikation von [²H₅]-MVA ([²H₅]-105):

EI-MS m/z (%): M⁺ 191 (59), 173 (3), 155 (5), 134 (10), 117 (19), 116 (100), 115 (37), 55 (12), 43 (9).



[²H₄]-Geosmin ([²H₄]-96) von *F. pusilla* nach Applikation von [²H₂]-MVA ([²H₂]-105):

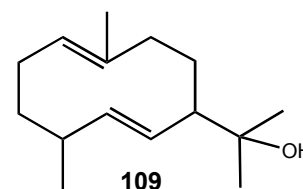
EI-MS *m/z* (%): M⁺ 186 (4), 171 (2), 153 (4), 128 (13), 127 (19), 115 (15), 114 (100), 113 (25), 99 (18), 83 (9), 69 (15), 57 (14), 43 (20).



1(10)*E*,5*E*-Germacradien-11-ol (109) aus *Streptomyces* spp.:

Strukturvorschlag nach Spektrenvergleich mit der Terpendatenbank von Prof. Dr. König, Hamburg.^[279]:

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 222 (3), 204 (6), 189 (9), 175 (2), 164 (12), 161 (12), 149 (32), 135 (10), 121 (12), 108 (15), 107 (38), 105 (17), 93 (38), 91 (21), 82 (67), 81 (40), 79 (33), 67 (41), 59 (100), 43 (23).

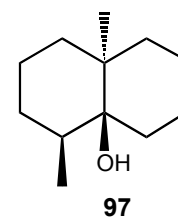


6.19.7 Inkubation von *Streptomyces* sp. JP95 mit [²H₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97)

Als die Farbe des Mediums anfing wegen der Produktion eines Sekundärmetaboliten von *Streptomyces* sp. JP95 lila zu werden, wurde zu der Kultur in 5 ml A1 Medium eine wässrige Lösung von (4*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,3,4,4*a*,5,8,8*a*-octahydro-4-methyl-8*a*-[²H₃]methylnaphthalin-4*a*-ol ([²H₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97), 100 µg in 1 ml H₂O) gegeben. [²H₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97) wurde nach Huber und Boland^[274] synthetisiert, wobei ein Überschuß CD₃-MgBr eingesetzt wurde. Die Duftstoffe wurden aus der Gasphase über dem Medium von *S.* sp. JP95 5 min mit SPME gesammelt.^[276, 277] Nach 3 h, 4 h, 6 h und 1 d wurden die Proben per GC-MS analysiert. Es wurde keine Umsetzung des markierten [²H₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97) durch *Streptomyces* sp. JP95 zu [²H₃]-Geosmin ([²H₃]-96) beobachtet.

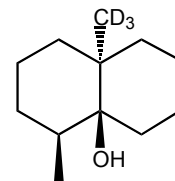
Dehydrogeosmin (97):

EI-MS *m/z* (%): M⁺ 180 (0.5), 162 (45), 147 (11), 126 (100), 119 (11), 111 (31), 109 (17), 105 (36), 91 (23).



[²H₃]-Dehydrogeosmin ([²H₃]-97):

EI-MS *m/z* (%): [$M^{+\bullet}-H_2O$] 165 (43), 150 (5), 147 (6), 129 (100), 122 (9), 114 (17), 111 (21), 109 (31), 108 (30), 91 (15).

[²H₃]-97

6.19.8 Stereochemie von Geosmin (96) aus *Streptomyces* spp. und *Fossombronia pusilla*

Die Stereoisomere von Geosmin (**96**) wurden an einer chiralen Kapillargaschromatographiesäule mit 20 % Heptakis-2,6-di-O-methyl-O-pentyl- β -cyclodextrin Belegung (Hydrodex β -3 P 25 m x 0.25 mm (Macherey & Nagel, D-52313 Düren, Deutschland) aufgetrennt^[272, 273] und per Massenspektrometrie und synthetischen Referenzverbindungen identifiziert.

GC-Bedingungen:

Temperaturprogramm: 90 °C 20 min, 5 °C /min 160 °C 2 min; Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml/min.

Die Elutionsreihenfolge der Geosmin-Enantiomeren wurde mit synthetischen Referenzen bestimmt:

(+)-Geosmin [(+)-96]:

Retentionszeit: 18.22 min

(-)-Geosmin [(-)-96]:

Retentionszeit: 20.17 min

Geosmin (**96**) von *Streptomyces* sp. JP 95, "*Streptomyces maritimus*" und *Fossombronia pusilla* ist zu 100 % ee (-)-Geosmin [(-)-96].

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. Merian, S., *Der Raupen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung*, **1679**.
- [2] H. Schildknecht, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1981**, *20*, 164-84.
- [3] A. J. Mordue, A. Blackwell, *J. Insect Physiol.* **1993**, *39*, 903-24.
- [4] H. S. Engler, K. C. Spencer, L. E. Gilbert, *Nature* **2000**, *406*, 144-45.
- [5] T. Hartmann, D. Ober, *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* **2000**, *209*, 207-43.
- [6] C. Naumann, T. Hartmann, D. Ober, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 6085-90.
- [7] J. L. Bi, J. B. Murphy, G. W. Felton, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 97-117.
- [8] K. Maleck, K. Lawton, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 208-13.
- [9] C. P. Constabel, C. A. Ryan, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 507-11.
- [10] E. E. Farmer, C. A. Ryan, *Plant Cell* **1992**, *4*, 129-34.
- [11] T. C. J. Turlings, J. H. Tumlinson, W. J. Lewis, *Science* **1990**, *250*, 1251-53.
- [12] T. C. J. Turlings, J. H. Loughrin, P. J. McCall, U. S. R. Röse, W. J. Lewis, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4169-74.
- [13] T. C. J. Turlings, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 8399-402.
- [14] M. Dicke, P. Van Baarlen, R. Wessels, H. Dijkman, *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 581-99.
- [15] R. Frutos, C. Rang, F. Royer, *Crit. Rev. Biotechnol.* **1999**, *19*, 227-76.
- [16] G. W. Felton, K. L. Korth, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 309-14.
- [17] G. L. de Bruxelles, M. R. Roberts, *Crit. Rev. Plant Sci.* **2001**, *20*, 487-521.
- [18] T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 153-62.
- [19] B. A. Vick, D. C. Zimmerman, *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 458-61.
- [20] M. Hamberg, H. W. Gardner, *Biochimica et Biophysica Acta* **1992**, *1165*, 1-18.
- [21] E. Demole, E. Lederer, D. Mercier, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 675-85.

- [22] G. Sembdner, B. Parthier, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1993**, *44*, 569-89.
- [23] A. Meyer, O. Miersch, C. Buttner, W. Dathe, G. Sembdner, *J. Plant Growth Regul.* **1984**, *3*, 1-8.
- [24] J. Ueda, J. Kato, *Plant Physiol.* **1980**, *66*, 246-49.
- [25] J. Hopke, J. Donath, S. Blechert, W. Boland, *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 146-50.
- [26] W. Boland, J. Hopke, J. Donath, J. Nüske, F. Bublitz, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1995**, *34*, 1600-02.
- [27] S. Blechert, W. Brodschelm, S. Holder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Müller, Z. Q. Xia, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4099-105.
- [28] H. Gundlach, M. J. Müller, T. M. Kutchan, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 2389-93.
- [29] J. N. Siedow, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1991**, *42*, 145-88.
- [30] R. Imbusch, M. J. Müller, *Free Radic. Biol. Med* **2000**, *28*, 720-26.
- [31] S. Vollenweider, H. Weber, S. Stolz, A. Chletelat, E. E. Farmer, *Plant J.* **2000**, *24*, 467-76.
- [32] B. A. Stelmach, A. Müller, P. Hennig, S. Gebhardt, M. Schubert-Zsilavec, E. W. Weiler, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12832-38.
- [33] M. E. Alvarez, *Plant Mol. Biol.* **2000**, *44*, 429-42.
- [34] S. Zimmermann, T. Ehrhardt, G. Plesch, B. Müller-Rober, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 183-203.
- [35] T. Jabs, M. Tschöpe, C. Colling, K. Hahlbrock, D. Scheel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4800-05.
- [36] B. W. Poovaiah, A. S. N. Reddy, *Crit. Rev. Plant Sci.* **1993**, *12*, 185-211.
- [37] P. Reymond, E. E. Farmer, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, *1*, 404-11.
- [38] H. Koiwa, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 379-84.
- [39] J. R. Ecker, *Science* **1995**, *268*, 667-75.
- [40] M. K. Stowe, T. C. J. Turlings, J. H. Loughrin, W. J. Lewis, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 23-28.
- [41] T. C. J. Turlings, P. J. McCall, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 411-25.

- [42] A. Kessler, I. T. Baldwin, *Science* **2001**, *291*, 2141-44.
- [43] G.-I. Arimura, R. Ozawa, T. Shimoda, T. Nishioka, W. Boland, J. Takabayashi, *Nature* **2000**, *406*, 512-15.
- [44] G.-I. Arimura, R. Ozawa, T. Nishioka, W. Boland, T. Koch, F. Kühnemann, J. Takabayashi, *Plant J.* **2002**, *29*, 87-98.
- [45] T. Tschardtke, S. Thiessen, R. Dolch, W. Boland, *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 1025-47.
- [46] M. Dicke, R. Gols, D. Ludeking, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1907-22.
- [47] W. Boland, A. Gaebler, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 247-53.
- [48] T. C. J. Turlings, *Dissertation* **1990**.
- [49] J.-S. Huang, *Plant Pathogenesis and Resistance*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **2001**.
- [50] F. Greulich, T. Yoshihara, A. Ichihara, *J. Plant Physiol.* **1995**, *147*, 359-66.
- [51] J. S. Kenyon, J. G. Turner, *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 219-24.
- [52] A. Ichihara, K. Shiraishi, H. Sato, S. Sakamura, K. Nishiyama, R. Sakai, A. Furusaki, T. Matsumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 636-37.
- [53] E. W. Weiler, T. M. Kutchan, T. Gorba, W. Brodschelm, U. Niesel, F. Bublitz, *FEBS Lett.* **1994**, *345*, 9-13.
- [54] T. Krumm, K. Bandemer, W. Boland, *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 523-29.
- [55] G. Schüler, H. Görls, W. Boland, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1663-68.
- [56] L. G. M. Gordon, D. A. Haydon, *Biochimica et Biophysica Acta* **1972**, *255*, 1014-18.
- [57] R. Nagaraj, P. Balaram, *Accounts Chem. Res.* **1981**, *14*, 356-62.
- [58] J. Engelberth, T. Koch, F. Kuhnemann, W. Boland, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000**, *39*, 1860-62.
- [59] J. Engelberth, T. Koch, G. Schuler, N. Bachmann, J. Rechtenbach, W. Boland, *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 369-77.
- [60] L. Mattiacci, M. Dicke, M. A. Posthumus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 2036-40.
- [61] H. T. Alborn, T. C. J. Turlings, T. H. Jones, G. Stenhagen, J. H. Loughrin, J. H. Tumlinson, *Science* **1997**, *276*, 945-49.
- [62] M. Frey, C. Stettner, P. W. Paré, E. A. Schmelz, J. H. Tumlinson, A. Gierl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14801-06.

- [63] B. Shen, Z. Zheng, H. K. Dooner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14807-12.
- [64] T. Koch, *Dissertation* **2001**.
- [65] P. W. Paré, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13971-75.
- [66] G. Pohnert, V. Jung, E. Haukioja, K. Lempa, W. Boland, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11275-80.
- [67] R. Halitschke, U. Schittko, G. Pohnert, W. Boland, I. T. Baldwin, *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 711-17.
- [68] Y. H. Cheong, H. S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, S. Luan, *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 661-77.
- [69] B. N. Kunkel, D. M. Brooks, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5*, 325-31.
- [70] R. O. Musser, S. M. Hum-Musser, H. Eichenseer, M. Peiffer, G. Ervin, J. B. Murphy, G. W. Felton, *Nature* **2002**, *416*, 599-600.
- [71] K. Konno, S. Okada, C. Hirayama, *J. Insect Physiol.* **2001**, *47*, 1451-57.
- [72] K. G. Collatz, T. Mommsen, *Journal of Comparative Physiology* **1974**, *94*, 339-52.
- [73] P. A. Gorin, J. F. T. Spencer, A. P. Tulloch, *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne De Chimie* **1961**, *39*, 846-&.
- [74] A. P. Tulloch, J. F. T. Spencer, P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **1962**, *40*, 1326-38.
- [75] Y. Miura, A. J. Fulco, *Biochimica et Biophysica Acta* **1975**, *388*, 305-17.
- [76] P. R. Ortiz de Montellano, J. J. De Voss, *Natural Products Reports* **2002**, *19*, 477-93.
- [77] K. G. Ravichandran, S. S. Boddupalli, C. A. Hasemann, J. A. Peterson, J. Deisenhofer, *Science* **1993**, *261*, 731-36.
- [78] W. Adam, Z. Lukacs, C. R. Saha-Möller, B. Weckerle, P. Schreier, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2923-26.
- [79] A. C. Lanser, R. D. Plattner, M. O. Bagby, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 363-66.
- [80] E. H. Oliw, *Prog. Lipid. Res.* **1994**, *33*, 329-54.
- [81] H. L. Holland, H. K. Weber, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 547-53.
- [82] M. J. Ryle, R. P. Hausinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 193-201.

- [83] E. Skrzypczak-Jankun, R. A. Bross, R. T. Carroll, W. R. Dunham, M. O. Funk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10814-20.
- [84] G. Pohnert, T. Koch, W. Boland, *Chem. Commun.* **1999**, 1087-88.
- [85] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543-49.
- [86] D. B. Weibel, T. R. Walker, F. C. Schroeder, J. Meinwald, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2381-83.
- [87] M. Hamberg, J. Björkhem, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 7411-16.
- [88] I. Björkhem, M. Hamberg, *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 7417-20.
- [89] J. M. L. Mee, J. Korth, B. Halpern, L. B. James, *Biomedical Mass Spectrometry* **1977**, *4*, 178-81.
- [90] D. Spiteller, G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1483-85.
- [91] A. P. Tulloch, J. F. T. Spencer, P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 1326-38.
- [92] D. L. Kroetz, D. C. Zeldin, *Curr. Opin. Lipidology* **2002**, *13*, 273-83.
- [93] E. H. Oliw, J. Bylund, C. Herman, *Lipids* **1996**, *31*, 1003-21.
- [94] S. Sloan, D. J. Harvey, P. Vouros, *Org. Mass Spectrom.* **1971**, *5*, 789-99.
- [95] G. H. Draffan, Stillwel.Rn, McCloske.Ja, *Org. Mass Spectrom.* **1968**, *1*, 669-85.
- [96] G. Eglinton, D. H. Hunneman, A. McCormic, *Org. Mass Spectrom.* **1968**, *1*, 593-611.
- [97] T. Kato, T. Hirukawa, K. Namiki, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1475-78.
- [98] E. J. Corey, H. Niwa, J. R. Falck, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1586-87.
- [99] M. S. Cooper, H. Heany, A. Newbold, W. R. Sanderson, *Synlett* **1990**, *9*, 533-35.
- [100] T. Krumm, *Dissertation Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **1998**.
- [101] J. F. Greene, J. W. Newman, K. C. Williamson, B. D. Hammock, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 217-26.
- [102] F. D. Gunstone, *Journal of the Chemical Society* **1954**, 1611-16.
- [103] A. Spinella, E. Zubia, E. Martinez, J. Ortea, G. Cimino, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5471-75.
- [104] F. J. Hidalgo, R. Zamora, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 501-08.
- [105] R. Zamora, M. Alaiz, F. J. Hidalgo, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 654-60.

- [106] J. E. Sinsheimer, E. Van den Eeckhout, B. H. Hooberman, V. G. Beylin, *Biolo. Interact.* **1987**, *63*, 75.
- [107] R. C. Murphy, S. Hammarstrom, B. Samuelsson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1979**, *76*, 4275-79.
- [108] B. Samuelsson, *Science* **1983**, *220*, 568-75.
- [109] T. Ozawa, M. Nishikimi, S. Sugiyama, F. Taki, M. Hayakawa, H. Shionoya, *Biochemistry International* **1988**, *16*, 369-73.
- [110] D. Salvail, M. Dumoulin, C. Benoit, B. Renaudon, E. Rousseau, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *159*, A396-A96.
- [111] J. H. Capdevila, J. R. Falck, R. W. Estabrook, *Faseb J.* **1992**, *6*, 731-36.
- [112] P. L. Li, W. B. Campbell, *Circ.Res.* **1997**, *80*, 877-84.
- [113] J. Y. Chen, J. H. Capdevila, D. C. Zeldin, R. L. Rosenberg, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 288-95.
- [114] M. Dumoulin, D. Salvail, S. B. Gaudreault, A. Cadieux, E. Rousseau, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **1998**, *19*, L423-L31.
- [115] D. Salvail, M. Dumoulin, E. Rousseau, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **1998**, *19*, L432-L41.
- [116] T. Kato, Y. Yamaguchi, T. Uyehara, T. Yokoyama, T. Namai, S. Yamanaka, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4715-18.
- [117] M. F. Moghaddam, D. F. Grant, J. M. Cheek, J. F. Greene, K. C. Williamson, B. D. Hammock, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 562-66.
- [118] J. F. Greene, K. C. Williamson, J. W. Newman, C. Morisseau, B. D. Hammock, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 420-32.
- [119] M. Beroza, B. A. Bierl, *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1131-35.
- [120] W. Boland, C. Frossl, M. Lorenz, *Synthesis-Stuttgart* **1991**, 1049-72.
- [121] G. Pohnert, W. Boland, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1821-26.
- [122] H. Gerlach, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 3039-44.
- [123] P. Sieber, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2711-16.
- [124] R. Kanazawa, T. Tokoroyama, *Synthesis* **1976**, *8*, 526-27.
- [125] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1978**, *17*, 522-24.
- [126] S. A. Bal, A. Marfat, P. Helquist, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5045-50.
- [127] T. Morishita, A. Sato, M. Hisamoto, T. Oda, K. Matsuda, A. Ishii, K. Kodama, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 457-68.

- [128] D. E. Minnikin, Abdolrah.H, *FEBS Lett.* **1974**, *43*, 257-60.
- [129] S. R. Smedley, F. C. Schroeder, D. B. Weibel, J. Meinwald, K. A. Lafleur, J. A. Renwick, R. Rutowski, T. Eisner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 6822-27.
- [130] F. C. Schröder, J. J. Farmer, A. B. Attygalle, S. R. Smedley, T. Eisner, J. Meinwald, *Science* **1998**, *281*, 428-31.
- [131] R. P. Doss, J. E. Oliver, W. M. Proebsting, S. W. Potter, S. R. Kuy, S. L. Clement, R. T. Williamson, J. R. Carney, E. D. DeVilbiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6218-23.
- [132] B. Boss, E. Richling, M. Herderich, P. Schreier, *Phytochemistry* **1999**, *50*, 219-25.
- [133] A. B. Attygalle, S. Garcia-Rubio, J. Ta, J. Meinwald, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **2001**, 498-506.
- [134] B. R. Sculimbrene, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10125-26.
- [135] T. Hunter, M. Karin, *Cell* **1992**, *70*, 375-87.
- [136] T. Hunter, *Cell* **1995**, *80*, 225-36.
- [137] H. Jayasuriya, G. F. Bills, C. Cascales, D. L. Zink, M. A. Goetz, R. G. Jenkins, K. C. Silverman, R. B. Lingham, S. B. Singh, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 2081-84.
- [138] J. Hurter, E. F. Boller, E. Städler, B. Blattmann, H. R. Buser, N. U. Bosshard, L. Damm, M. W. Kozlowski, R. Schöni, F. Raschdorf, R. Dahinden, E. Schlumpf, H. Fritz, W. J. Richter, J. Schreiber, *Experientia* **1987**, *43*, 157-64.
- [139] A. Gorchein, *Biochimica et Biophysica Acta* **1973**, *306*, 137-41.
- [140] K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *31*, 488-94.
- [141] J. Asselineau, in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Eds.: W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, C. Thamm), Springer, Wien, New York, **1991**, pp. 1-85.
- [142] G. Görgen, W. Boland, U. Preiss, H. Simon, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 917-28.
- [143] D. Spiteller, K. Dettner, W. Boland, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 755-62.
- [144] O. Schaaf, K. Dettner, *Microbiol. Res.* **1997**, *152*, 57-64.

- [145] *The Prokaryotes, Vol. 2*, 2. Auflage ed., Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, **1991**.
- [146] R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Microbiological Reviews* **1995**, *59*, 143-69.
- [147] B. Berger-Bachi, *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292*, 27-35.
- [148] H. Nikaido, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 516-23.
- [149] J. W. S. Domingo, M. G. Kaufman, M. J. Klug, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 752-55.
- [150] D. E. Richards, K. E. King, T. Ait-ali, N. P. Harberd, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **2001**, *52*, 67-88.
- [151] F. J. Gutierrez-Manero, B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo, M. Talon, *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 206-11.
- [152] M. C. M. Perombelon, *Plant Pathol.* **2002**, *51*, 1-12.
- [153] S. F. Brady, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12903-04.
- [154] K. R. Leimer, R. H. Rice, C. W. Gehrke, *Journal of Chromatography* **1977**, *141*, 355-75.
- [155] E. J. de Vries, G. Jacobs, J. A. J. Breeuwer, *J. Invertebr. Pathol.* **2001**, *77*, 129-37.
- [156] A. Jux, *Dissertation Friedrich Schiller Universität Jena* **2001**.
- [157] T. Murakawa, H. Sakamoto, S. Fukada, T. Konishi, M. Nishida, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 224-30.
- [158] T. Kuzuyama, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913-16.
- [159] H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, *285*, 1573-76.
- [160] J. Wiesner, M. Hintz, B. Altincicek, S. Sanderbrand, C. Weidemeyer, E. Beck, H. Jomaa, *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 182-86.
- [161] V. L. Healy, I. A. D. Lessard, D. I. Roper, J. R. Knox, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R109-R19.
- [162] V. Jung, *Diplomarbeit Friedrich Schiller Universität Jena* **1999**.
- [163] N. Mori, H. T. Alborn, P. E. A. Teal, J. H. Tumlinson, *J. Insect Physiol.* **2001**, *47*, 749-57.

- [164] T. Shida, Y. Homma, T. Misato, *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* **1975**, *49*, 409-15.
- [165] H. Murase, T. Kunieda, J. Terao, A. Nagao, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 854-55.
- [166] R. J. Dillon, A. K. Charnley, *J. Invertebr. Pathol.* **1996**, *67*, 11-14.
- [167] R. J. Dillon, C. T. Vennard, A. K. Charnley, *Nature* **2000**, *403*, 851-51.
- [168] B. C. Campbell, *On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects*, CRC Press, Boca Raton, **1990**.
- [169] D. L. Cruden, A. J. Markovetz, *Arch. Microbiol.* **1984**, *138*, 131-39.
- [170] A. E. Douglas, *Biol. Rev. Cambridge Philosophic. Soc.* **1989**, *64*, 409-34.
- [171] Y. K. Lee, J. H. Lee, H. K. Lee, *J. Microbiol.* **2001**, *39*, 254-64.
- [172] A. George, J. Modi, N. Jain, P. Bahadur, *Indian J. Chem. Sect A-Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem.* **1998**, *37*, 985-92.
- [173] K. Schäfer, J. Wirsching, H. Höcker, *Fett-Lipid* **1997**, *99*, 217-22.
- [174] M. R. Infante, A. Pinazo, J. Seguer, *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *123*, 49-70.
- [175] Y. Ishigami, M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro, M. Matsumoto, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1995**, *4*, 341-48.
- [176] A. Kretschmer, H. Bock, F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 864-70.
- [177] Y. Kawai, I. Yano, K. Kaneda, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *171*, 73-80.
- [178] L. Bunster, N. J. Fokkema, B. Schippers, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1340-45.
- [179] E. Z. Ron, E. Rosenberg, *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 229-36.
- [180] C. I. Ajinomoto, in *Japan Patent, Vol. 57*, **1982**, p. 129.
- [181] A. J. Clark, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2578-82.
- [182] M. Pirhonen, D. Flego, R. Heikinheimo, E. T. Palva, *Embo J.* **1993**, *12*, 2467-76.
- [183] W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269-75.
- [184] M. B. Miller, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 165-99.
- [185] A. Mukherjee, Y. Y. Cui, Y. Liu, A. K. Chatterjee, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, *10*, 462-71.

- [186] A. Mae, M. Montesano, V. Koiv, E. T. Palva, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 1035-42.
- [187] P. J. Landolt, J. H. Tumlinson, D. H. Alborn, *Environ. Entomol.* **1999**, *28*, 973-78.
- [188] L. Mattiacci, M. Dicke, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 2229-47.
- [189] S. Gouinguene, T. Degen, T. C. J. Turlings, *Chemoecology* **2001**, *11*, 9-16.
- [190] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature* **1962**, *194*, 979-&.
- [191] B. Klüsener, E. W. Weiler, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 263-66.
- [192] J. Piel, R. Atzorn, R. Gäbler, F. Kühnemann, W. Boland, *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 143-48.
- [193] L. E. M. Vet, M. Dicke, *Annu. Rev. Entomol.* **1992**, *37*, 141-72.
- [194] I. Singleton, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1994**, *59*, 9-23.
- [195] C. R. Currie, U. G. Mueller, D. Malloch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 7998-8002.
- [196] C. R. Currie, J. A. Scott, R. C. Summerbell, D. Malloch, *Nature* **1999**, *398*, 701-04.
- [197] G. W. Felton, S. S. Duffey, *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 1821-36.
- [198] P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, J. K. Zhu, H. J. Bohnert, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **2000**, *51*, 463-99.
- [199] T. Munnik, H. J. G. Meijer, *FEBS Lett.* **2001**, *498*, 172-78.
- [200] R. T. Coutts, K. W. Hindmars, *Org. Mass Spectrom.* **1969**, *2*, 681-95.
- [201] S. Al-Khalil, A. Alkofahi, D. El-Eisawi, A. Al-Shibib, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 262-63.
- [202] S. Breidingmack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953-60.
- [203] H. Schildknecht, H. Birringer, D. Krauss, *Zeitschrift für Naturforschung Part B* **1969**, *B 24*, 38-47.
- [204] J. P. Phillips, *Chem. Rev.* **1956**, *56*, 271-97.
- [205] W. C. Fang, C. H. Kao, *Plant Growth Regul.* **2001**, *33*, 87-93.
- [206] H. Fiedler, U. Kaben, *Pharmazie* **1966**, *21*, 233-38.
- [207] J. H. Fabre, *Souvenirs Entomologiques*, Delagrave, Paris, **1879**.
- [208] A. Forel, *Das Sinnesleben der Insekten*, Reinhard, München, **1910**.
- [209] R. Mell, *Biologie und Systematik der südchinesischen Sphingiden*, Friedländer, Berlin, **1922**.

- [210] A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, E. Hecker, *Zeitschrift für Naturforschung Teil B* **1959**, 14b, 283-84.
- [211] M. S. Mayer, J. R. Mc Laughlin, *Pheromones and Sex Attractants*, CRC, Boca Raton, Florida, **1991**.
- [212] J. N. McNeil, *Annu. Rev. Entomol.* **1991**, 36, 407-30.
- [213] D. Schneider, E. Hecker, *Zeitschrift Fur Naturforschung Teil B* **1956**, 11b, 121-24.
- [214] D. Schneider, K. E. Kaissling, *Zool. Jhb Anat.* **1957**, 76, 224-50.
- [215] R. Steinbrecht, *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* **1970**, 68, 93-126.
- [216] R. A. Steinbrecht, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **1973**, 139, 533-65.
- [217] R. A. Steinbrecht, M. Laue, G. Ziegelberger, *Cell Tissue Res.* **1995**, 282, 203-17.
- [218] D. Schneider, *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **1957**, 40, 8-41.
- [219] K. Kaissling, E. Priesner, *Naturwissenschaften* **1970**, 57, 23-28.
- [220] G. D. Prestwich, *Science* **1987**, 237, 999-1006.
- [221] R. G. Vogt, G. D. Prestwich, M. R. Lerner, *J. Neurobiol.* **1991**, 22, 74-84.
- [222] K. E. Kaissling, *Chem. Senses* **1998**, 23, 385-95.
- [223] J. Krieger, H. Breer, *Science* **1999**, 286, 720-23.
- [224] P. Pelosi, R. Maida, *Comp. Biochem. Physiol B-Biochem. Molec. Biol.* **1995**, 111, 503-14.
- [225] R. Maida, R. A. Steinbrecht, G. Ziegelberger, P. Pelosi, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 23, 243-53.
- [226] B. H. Sandler, L. Nikonova, W. S. Leal, J. Clardy, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 143-51.
- [227] H. Wojtasek, W. S. Leal, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 30950-56.
- [228] F. Damberger, L. Nikonova, R. Horst, G. H. Peng, W. S. Leal, K. Wüthrich, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1038-41.
- [229] R. Horst, F. Damberger, P. Luginbühl, P. Güntert, G. Peng, L. Nikonova, W. S. Leal, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 14374-79.
- [230] G. Kasang, M. Nicholls, L. Vonproff, *Experientia* **1989**, 45, 81-87.
- [231] R. Rybczynski, R. G. Vogt, M. R. Lerner, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 19712-15.

- [232] R. G. Vogt, L. M. Riddiford, G. D. Prestwich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 8827-31.
- [233] E. Priesner, *Annales De Zoologie Ecologie Animale* **1979**, *11*, 533-46.
- [234] T. Heinbockel, K. E. Kaissling, *J. Insect Physiol.* **1996**, *42*, 565-78.
- [235] C. Oldenburg, S. Kanaujia, D. Spiteller, N. J. Oldham, W. Boland, K. E. Kaissling, *Chemoecology* **2001**, *11*, 183-90.
- [236] H. W. Smith, N. Finkelstein, L. Aliminosa, B. Crawford, M. Graber, *J. Clin. Invest.* **1945**, *24*, 388-404.
- [237] M. B. Shyamala, *J. Insect Physiol.* **1964**, *10*, 385-91.
- [238] C. J. Reed, E. A. Lock, F. De Matteis, *Biochem. J.* **1986**, *240*, 585-92.
- [239] D. Lazard, K. Zupko, Y. Poria, P. Nef, J. Lazarovits, S. Horn, M. Khen, D. Lancet, *Nature* **1991**, *349*, 790-93.
- [240] N. N. Gerber, H. A. Lecheval, *Applied Microbiology* **1965**, *13*, 935-37.
- [241] N. N. Gerber, *Biotechnol. Bioeng.* **1967**, *9*, 321-27.
- [242] N. N. Gerber, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *25*, 2971-74.
- [243] T. Kikuchi, T. Mimura, K. Harimaya, H. Yano, T. Arimoto, Y. Masada, T. Inoue, *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, *21*, 2342-43.
- [244] T. Kikuchi, S. Kadota, H. Suehara, A. Nishi, K. Tsubaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1782-84.
- [245] J. P. Mattheis, R. G. Roberts, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 3170-72.
- [246] J. Bjurman, J. Kristensson, *Microbios* **1992**, *72*, 47-54.
- [247] J. Spörle, H. Becker, N. S. Allen, M. P. Gupta, *Z.Naturforsch.(C)* **1991**, *46c*, 183-88.
- [248] R. Kaiser, C. Nussbaumer, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 133-39.
- [249] H. P. Dupuy, G. J. Flick, A. J. Stangelo, G. Sumrell, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63*, 905-08.
- [250] G. Izaguirre, C. J. Hwang, S. W. Krasner, M. J. McGuire, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 708-14.
- [251] T. Ito, T. Okumura, M. Yamamoto, *Water Sci. Technol.* **1988**, *20*, 11-17.
- [252] K. E. Murray, P. A. Bannister, R. G. Buttery, *Chem. Ind.* **1975**, 973-74.
- [253] R. G. Buttery, D. G. Guadagni, L. C. Ling, *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 419-20.
- [254] P. Darriet, M. Pons, S. Lamy, D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4835-38.

- [255] R. Bentley, R. Meganathan, *FEBS Lett.* **1981**, *125*, 220-22.
- [256] Z. Feng, U. Huber, W. Boland, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2547-52.
- [257] U. Huber, *Dissertation Universität Karlsruhe* **1995**.
- [258] G. Popjak, J. W. Cornforth, *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **1960**, *22*, 281-335.
- [259] S. L. Spurgeon, J. W. Porter, *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1*, John Wiley and Sons, New York, **1981**.
- [260] K. Bloch, *Steroids* **1992**, *57*, 378-83.
- [261] J. Schwender, M. Seemann, H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer, *Biochem. J.* **1996**, *316*, 73-80.
- [262] M. K. Schwarz, *Dissertation*, ETH Zürich, **1994**.
- [263] S. T. J. Broers, *Dissertation ETH Zürich* **1994**.
- [264] D. Arigoni, S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10600-05.
- [265] K. P. Adam, R. Thiel, J. Zapp, H. Becker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *354*, 181-87.
- [266] U. Warmers, W. A. König, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 645-50.
- [267] W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 78-84.
- [268] H. Seto, H. Watanabe, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7979-82.
- [269] H. Seto, N. Orihara, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9497-500.
- [270] Y. Hamano, T. Dairi, M. Yamamoto, T. Kawasaki, K. Kaneda, T. Kuzuyama, N. Itoh, H. Seto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 1627-35.
- [271] R. Thiel, K. P. Adam, *Phytochemistry* **2002**, *59*, 269-74.
- [272] W. A. König, B. Gehrcke, D. Icheln, P. Evers, J. Donnecke, W. C. Wang, *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 367-72.
- [273] P. Darriet, S. Lamy, S. La Guerche, M. Pons, D. Dubourdieu, D. Blancard, P. Steliopoulos, A. Mosandl, *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 122-25.
- [274] U. Huber, W. Boland, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 87-93.
- [275] J. Piel, W. Boland, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6387-90.
- [276] T. Nilsson, T. O. Larsen, L. Montanarella, J. O. Madsen, *J. Microbiol. Methods* **1996**, *25*, 245-55.
- [277] S. B. Watson, B. Brownlee, T. Satchwill, E. McCauley, *Water Sci. Technol.* **1999**, *40*, 251-56.
- [278] J. Donath, W. Boland, *Phytochemistry* **1995**, *39*, 785-90.

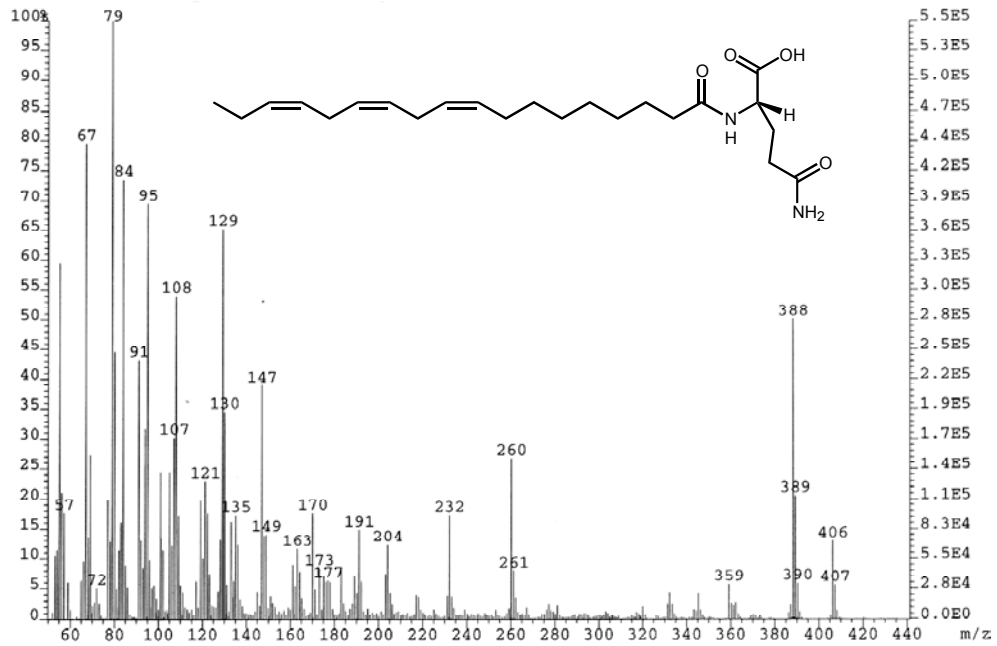
- [279] D. Joulain, W. A. König, D. H. Hochmuth, *Database: Terpenoids and related constituents of Essential Oils* **2001**.
- [280] S. Schulz, *persönliche Mitteilung*.
- [281] W. Boland, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1133-42.
- [282] V. Stanjek, M. Miksch, P. Lueer, U. Matern, W. Boland, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 400-02.
- [283] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, J. N. Lee, Y.-K. Paik, H. Glossmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 1899-902.
- [284] K. Grob, F. Zürcher, *Journal of Chromatography* **1976**, *117*, 285-94.
- [285] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-48.
- [286] R. Bergomaz, M. Boppré, *Journal Lepidopterist's Society* **1986**, *40*, 131-37.
- [287] K. Chatman, T. Hollenbeck, L. Hagey, M. Vallee, R. Purdy, F. Weiss, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2358-63.
- [288] E. Bast, *Mikrobiologische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1999**.
- [289] K. Lunkenheimer, K. D. Wantke, *Colloid Polym. Sci.* **1981**, *259*, 354-66.

8 Anhang

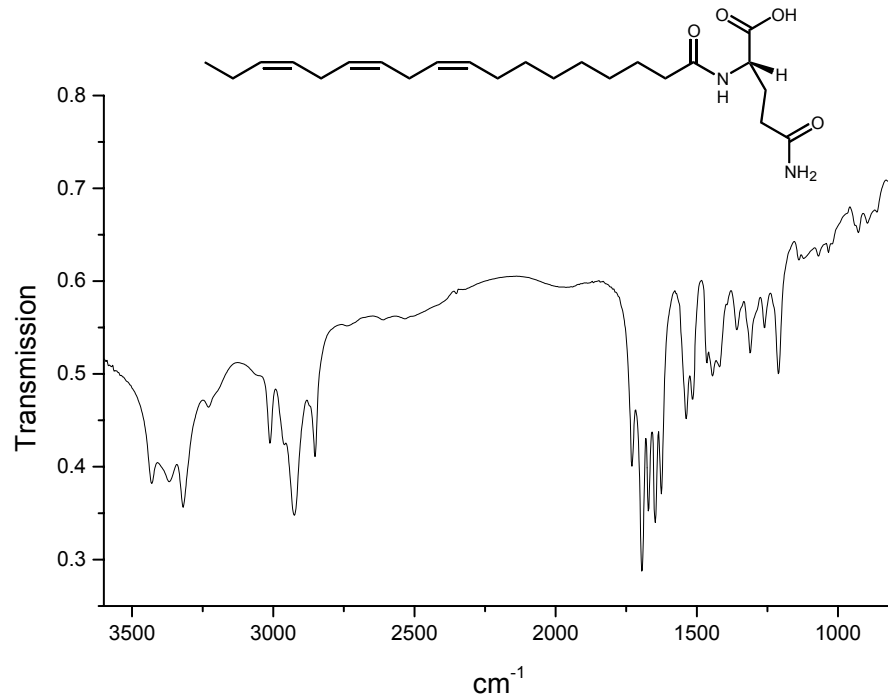
8.1 Spektren

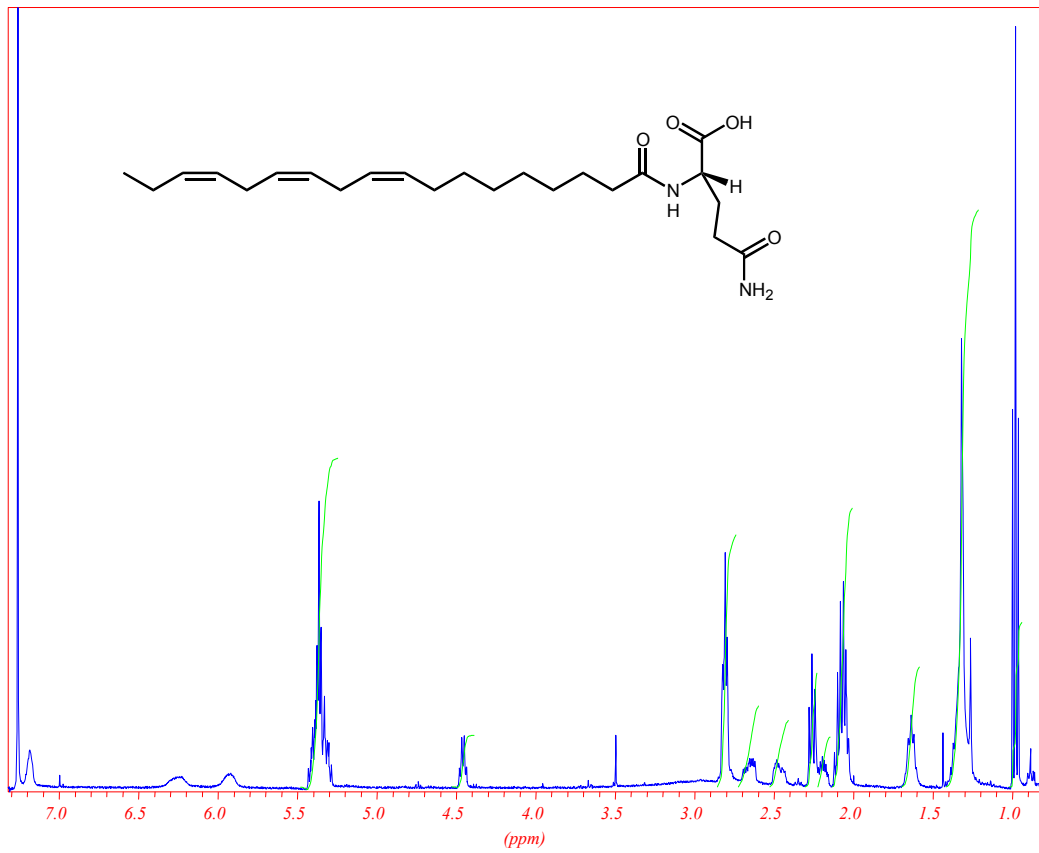
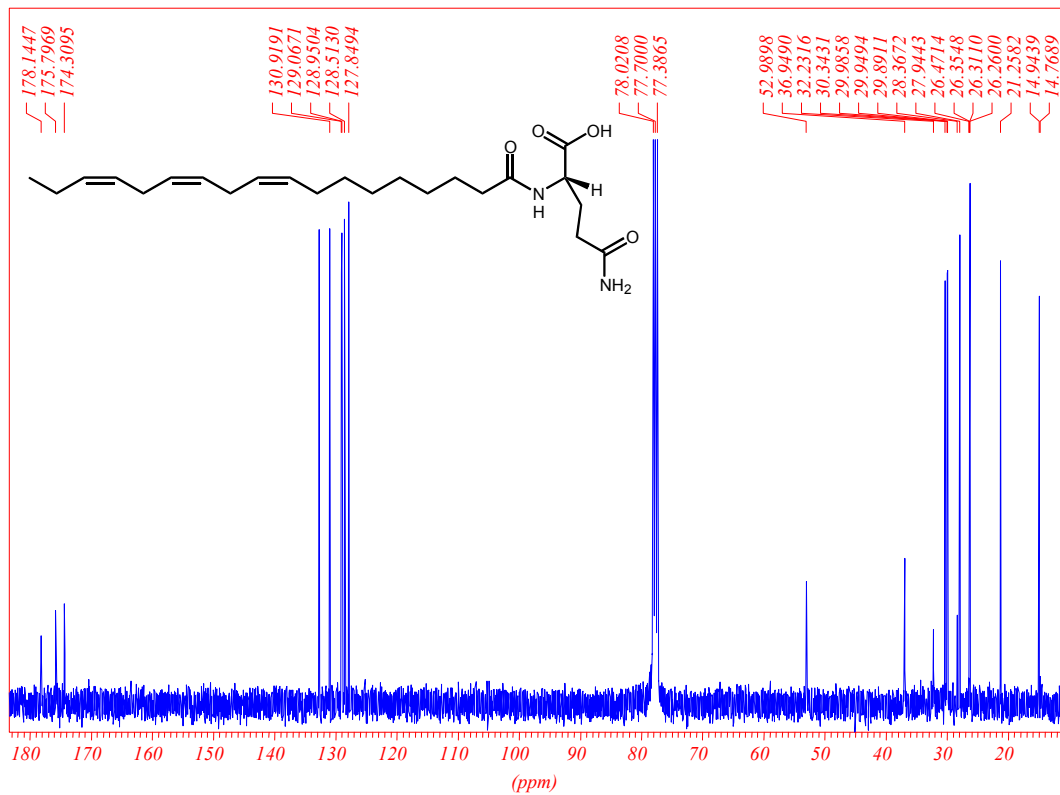
8.1.1 *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21)

8.1.1.1 EI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21)



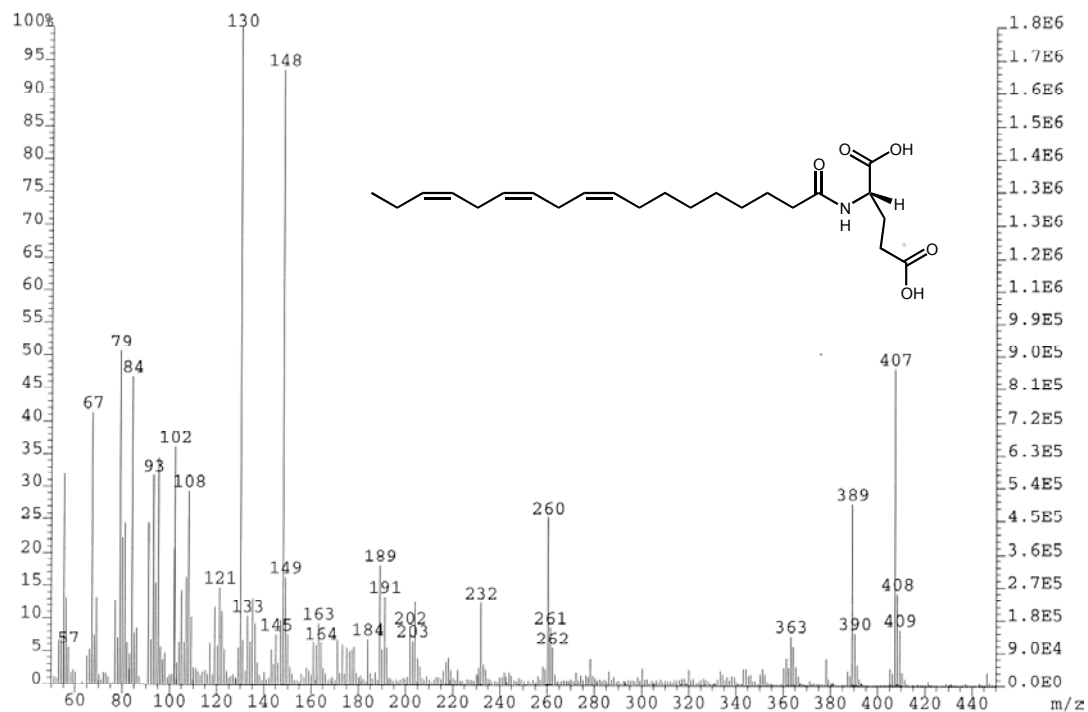
8.1.1.2 Infrarotspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21)



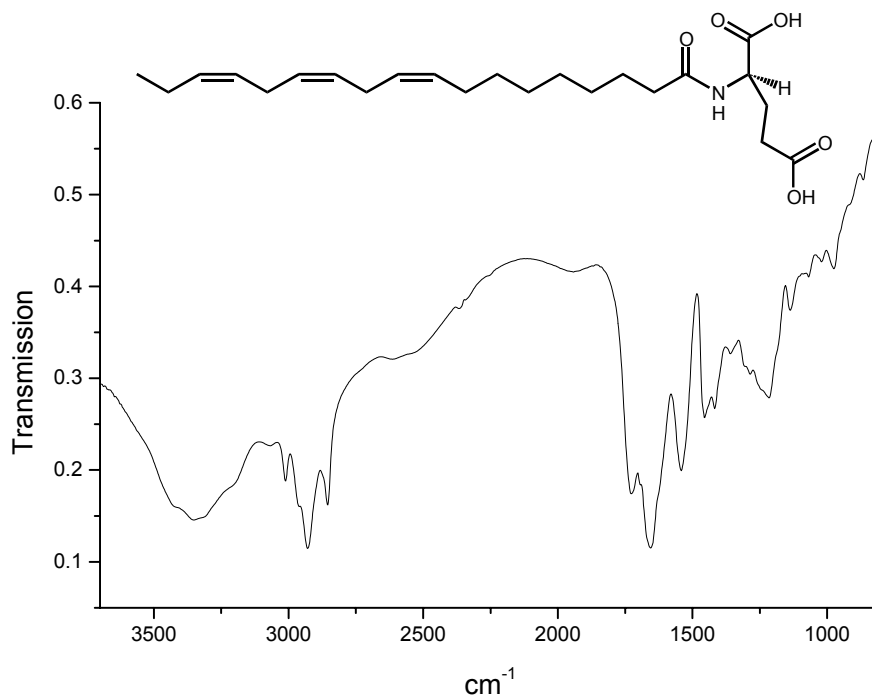
8.1.1.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21)8.1.1.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von *N*-Linolenoyl-L-glutamin (21)

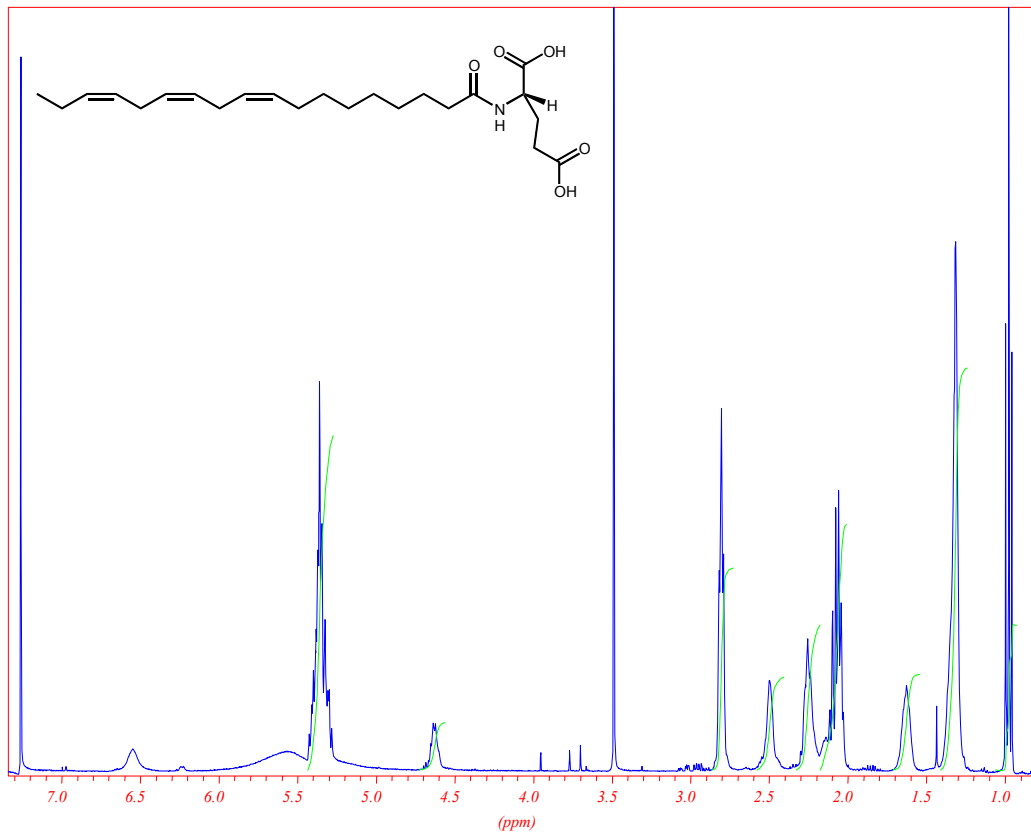
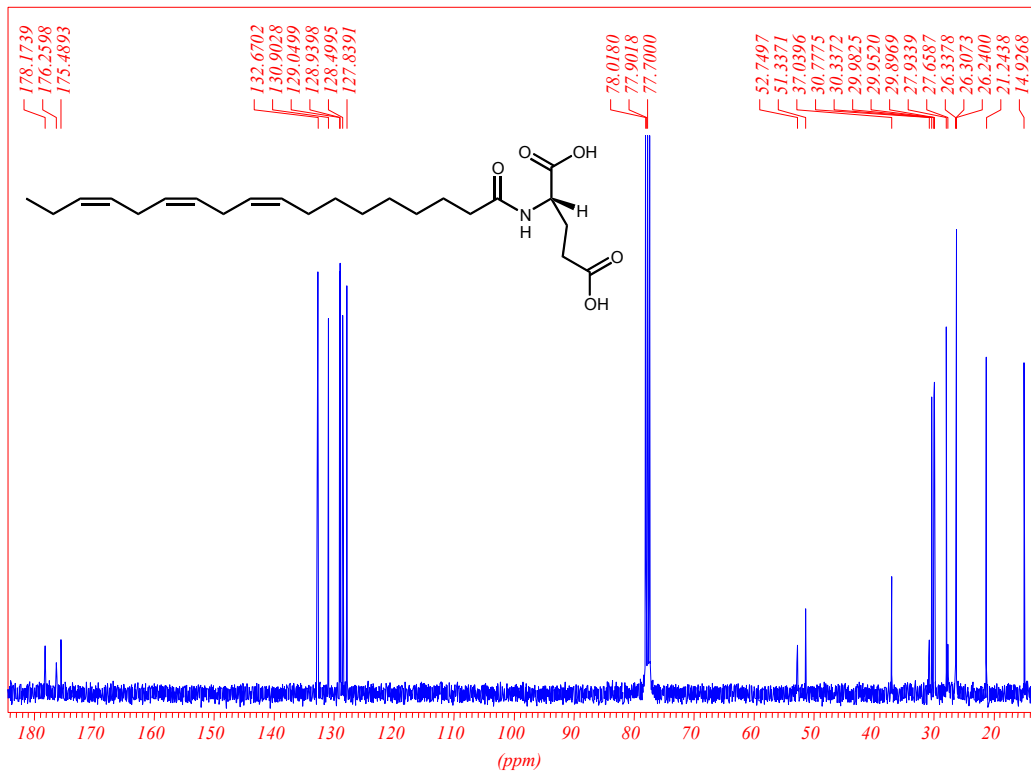
8.1.2 *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)

8.1.2.1 EI-Massenspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)

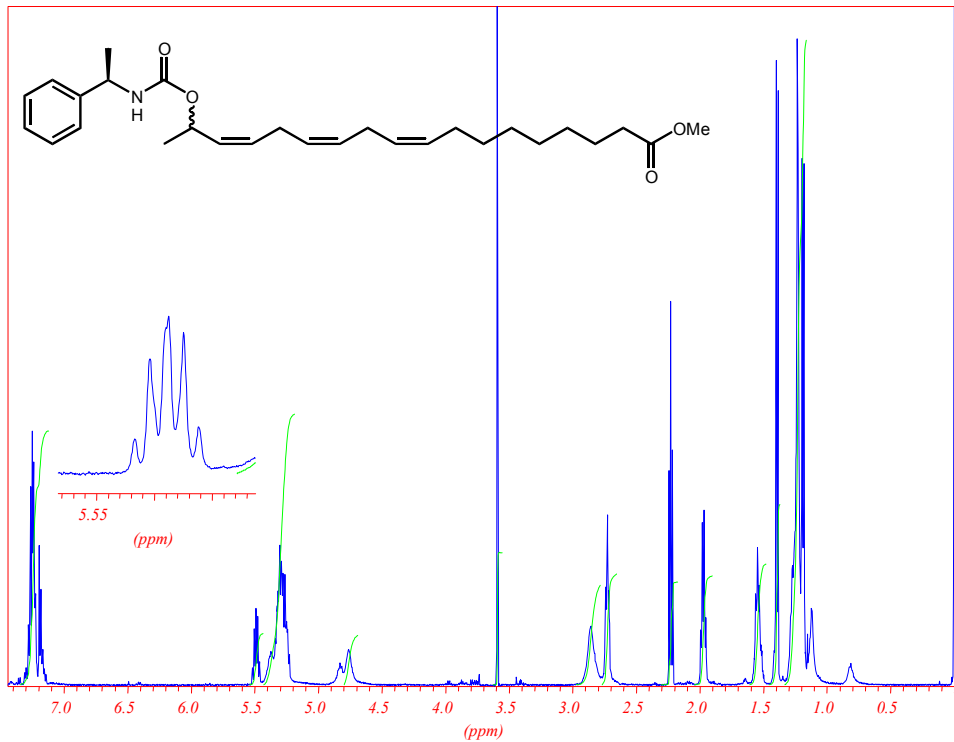


8.1.2.2 Infrarotspektrum von *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)

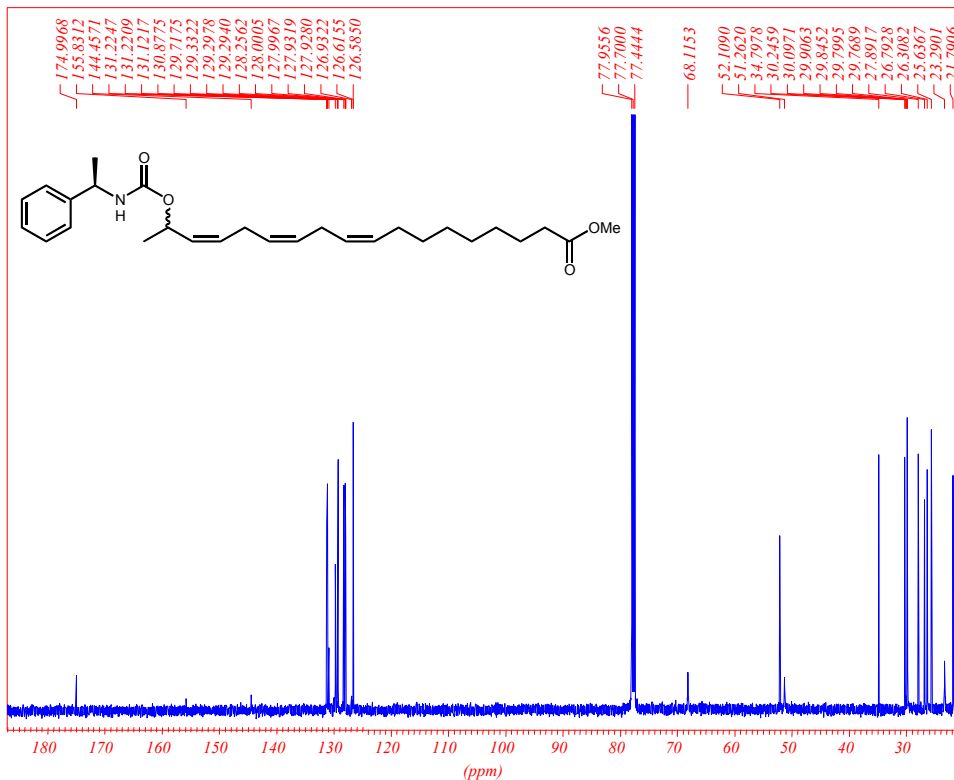


8.1.2.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)8.1.2.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von *N*-Linolenoyl-L-glutamat (25)

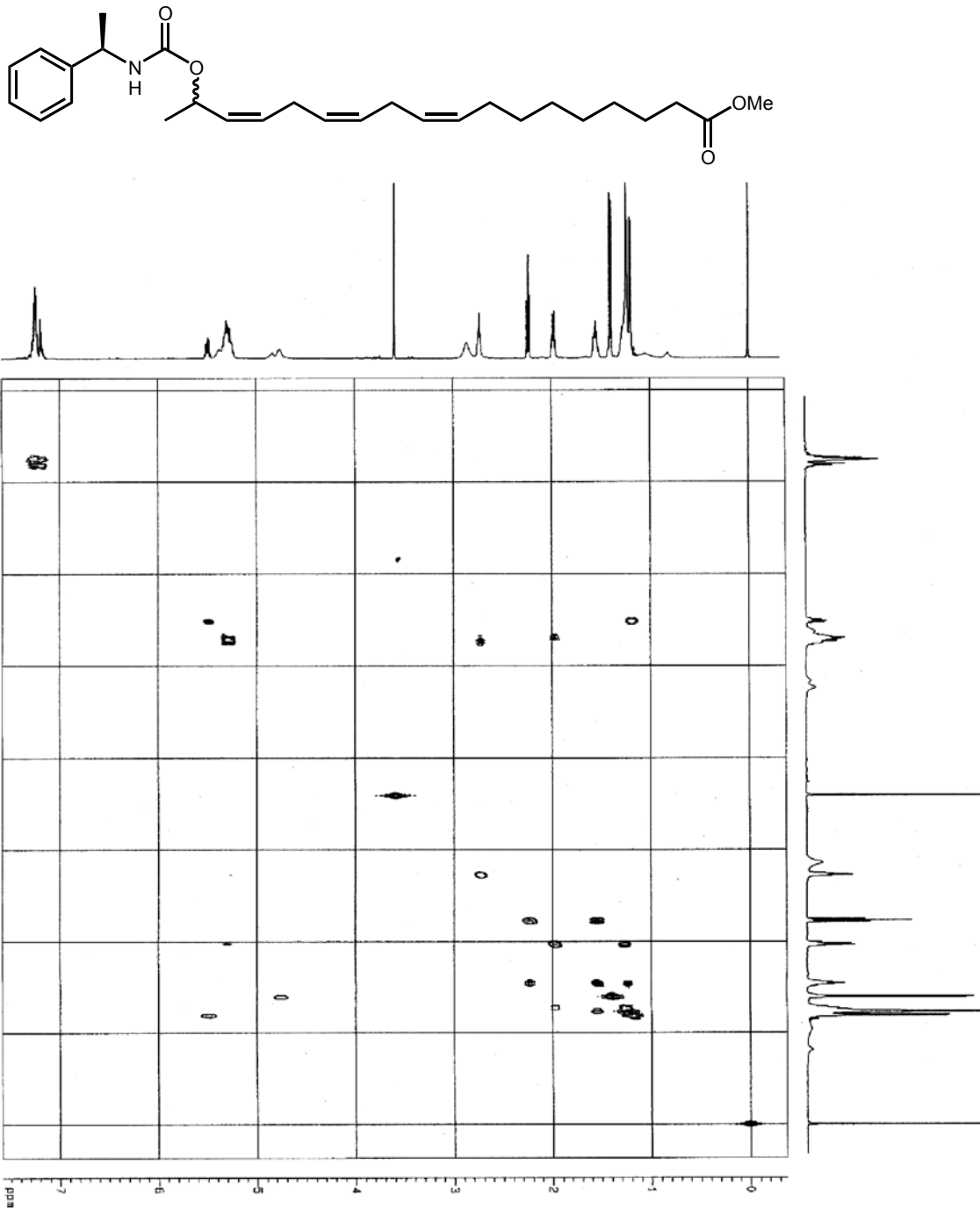
8.1.3.2 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (500 MHz) von (17*R*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethyl-carbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*R*)-31]



8.1.3.3 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (125 MHz) von (17*R*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethyl-carbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*R*)-31]

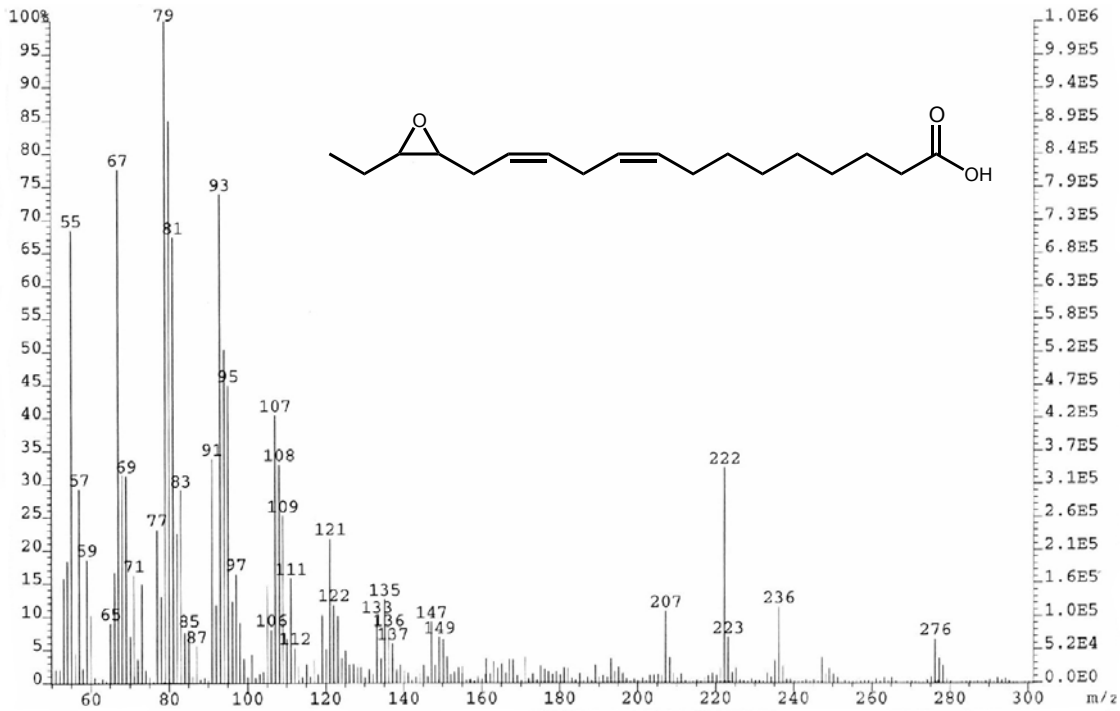


8.1.3.4 H,H-COSY NMR-Spektrum (500 MHz) von (17*R*,1'*R*)-17-(1'-Phenylethylcarbamoyloxy)-linolensäuremethylester [(17*R*)-31]

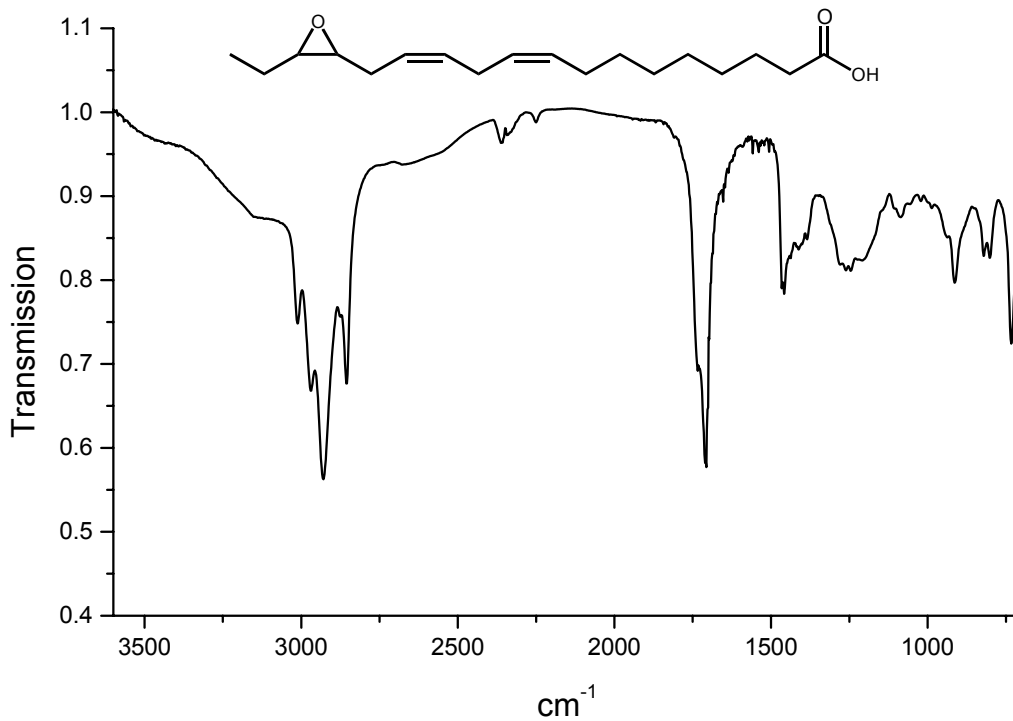


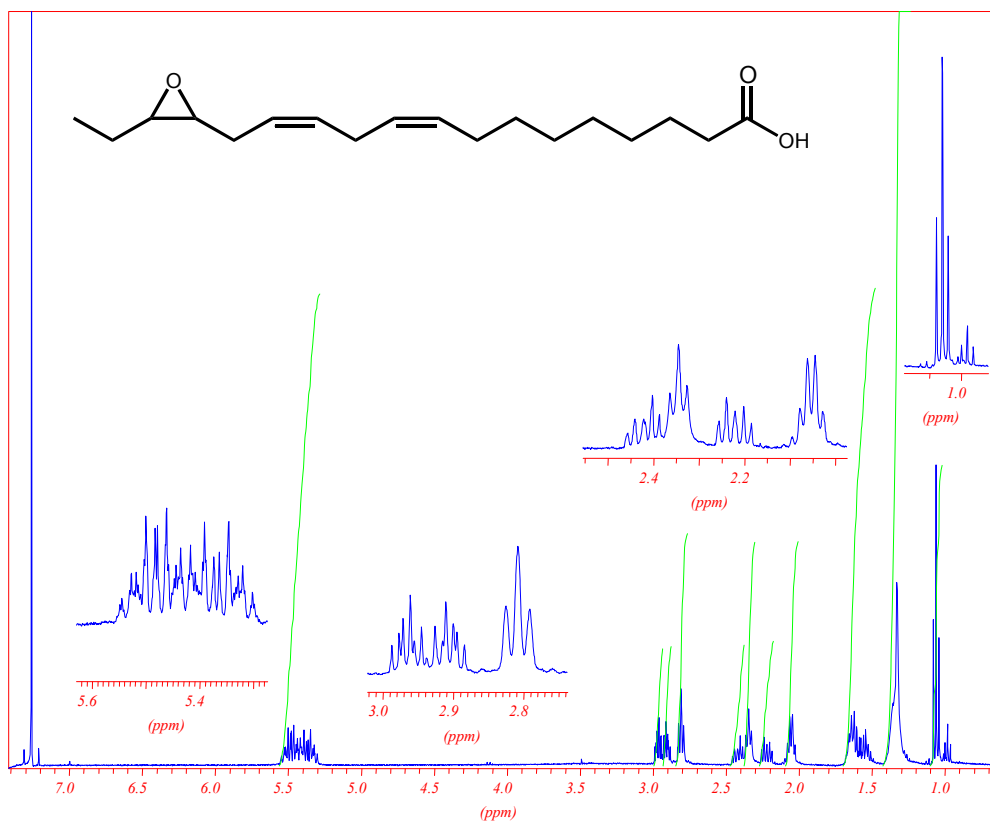
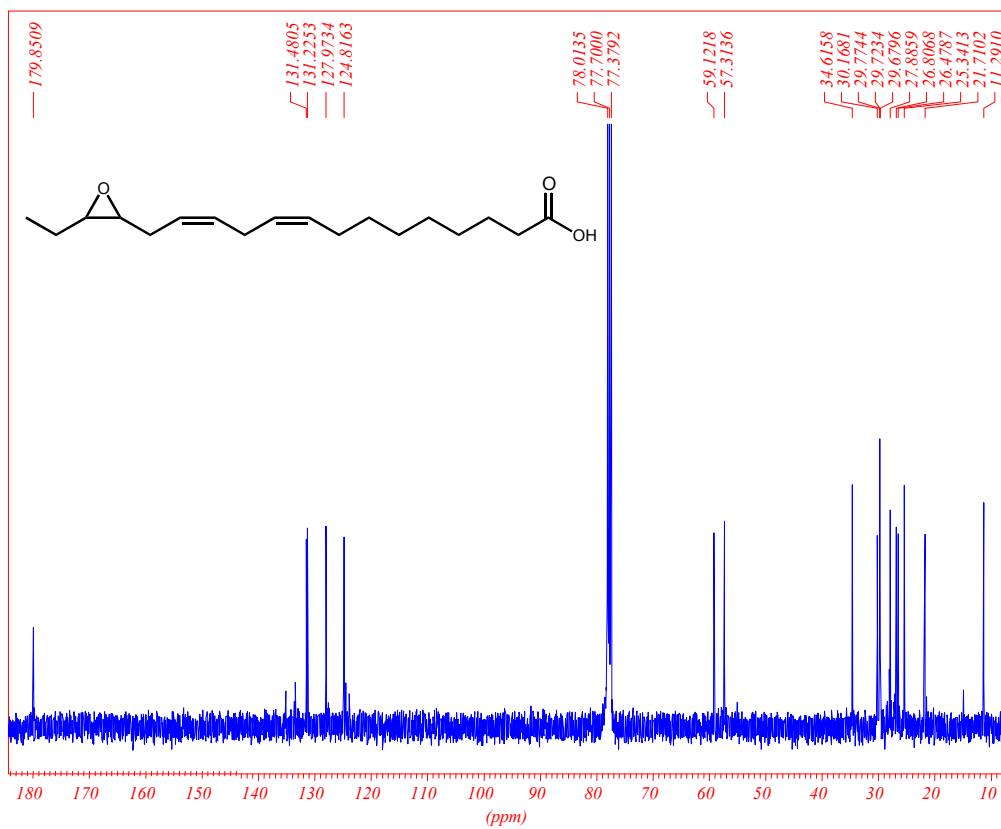
8.1.4 15,16-Epoxylinolsäure (38)

8.1.4.1 EI-Massenspektrum von 15,16-Epoxylinolsäure (38)

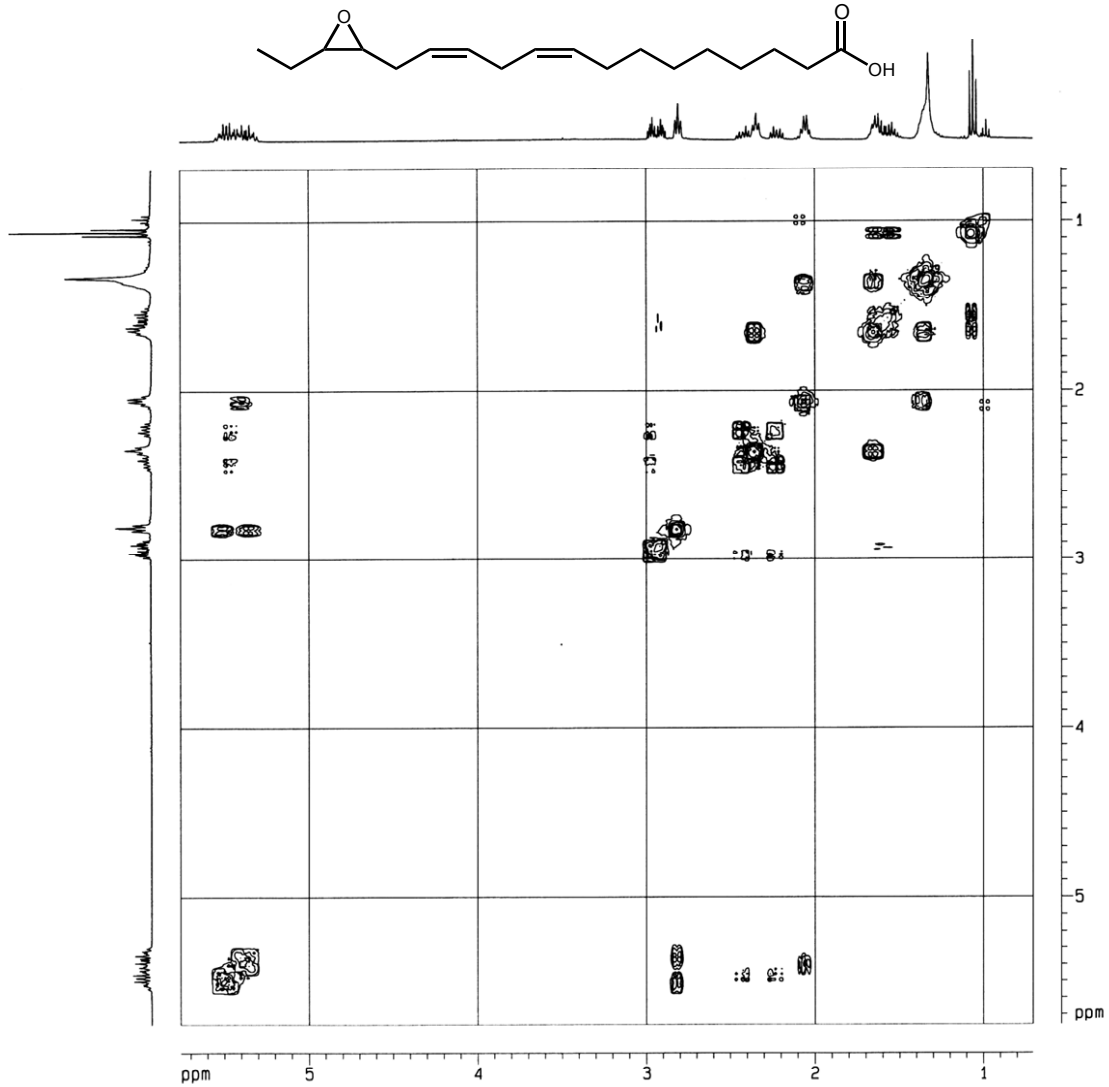


8.1.4.2 Infrarotspektrum von 15,16-Epoxylinolsäure (38)



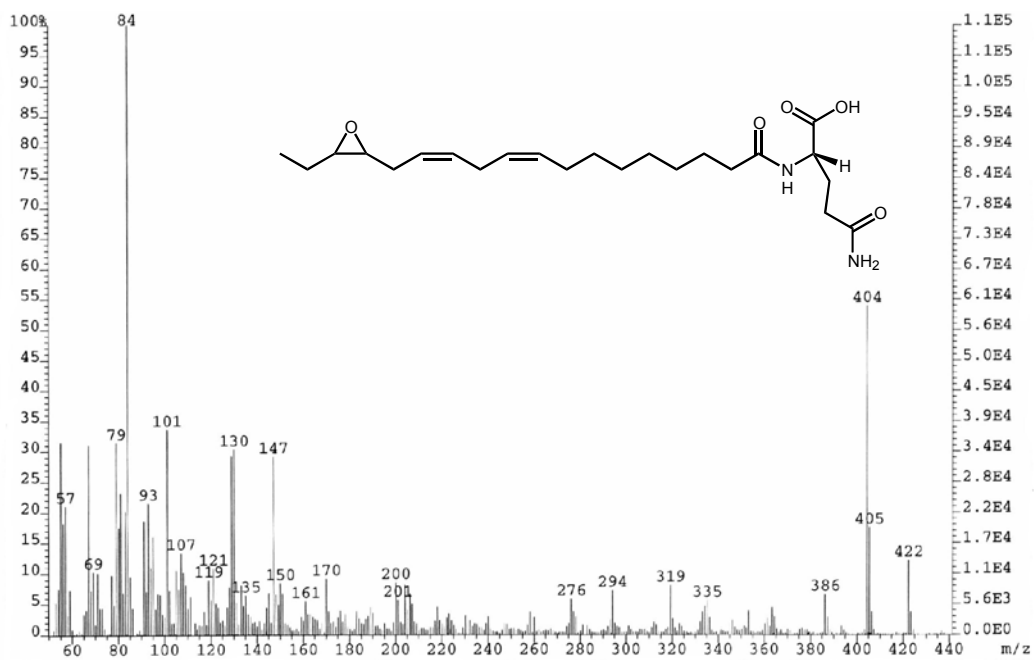
8.1.4.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von 15,16-Epoxylinolsäure (38)8.1.4.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von 15,16-Epoxylinolsäure (38)

8.1.4.5 H,H-COSY NMR-Spektrum (400 MHz) von 15,16-Epoxylinolsäure (38)

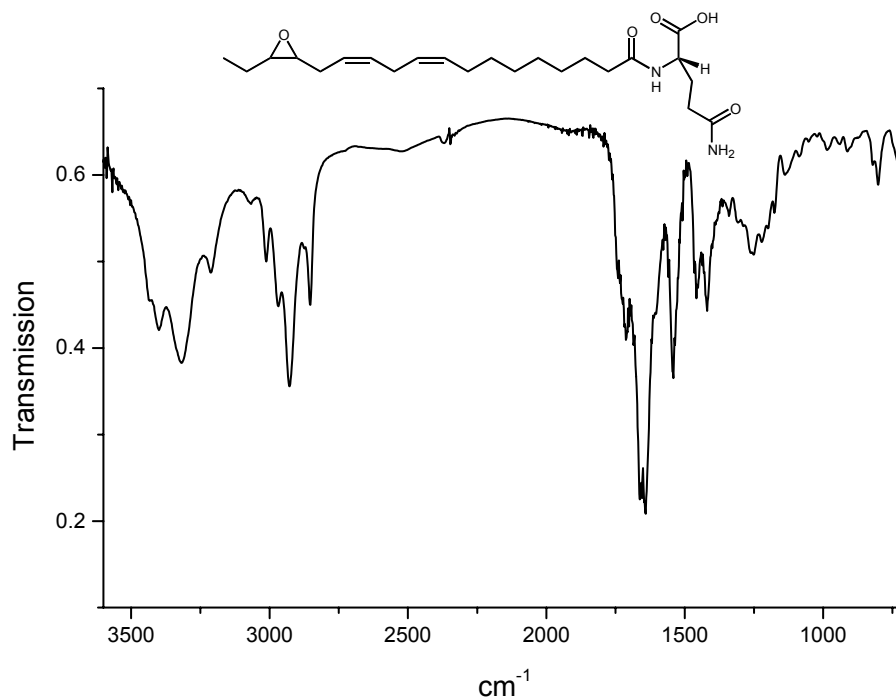


8.1.5 *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)

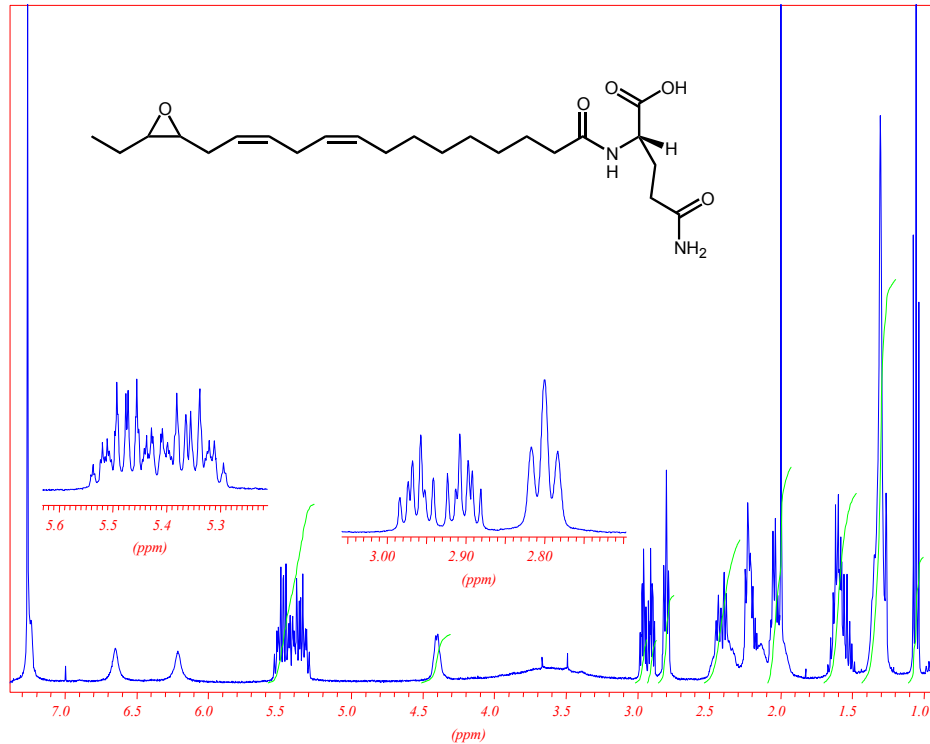
8.1.5.1 EI-Massenspektrum von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)



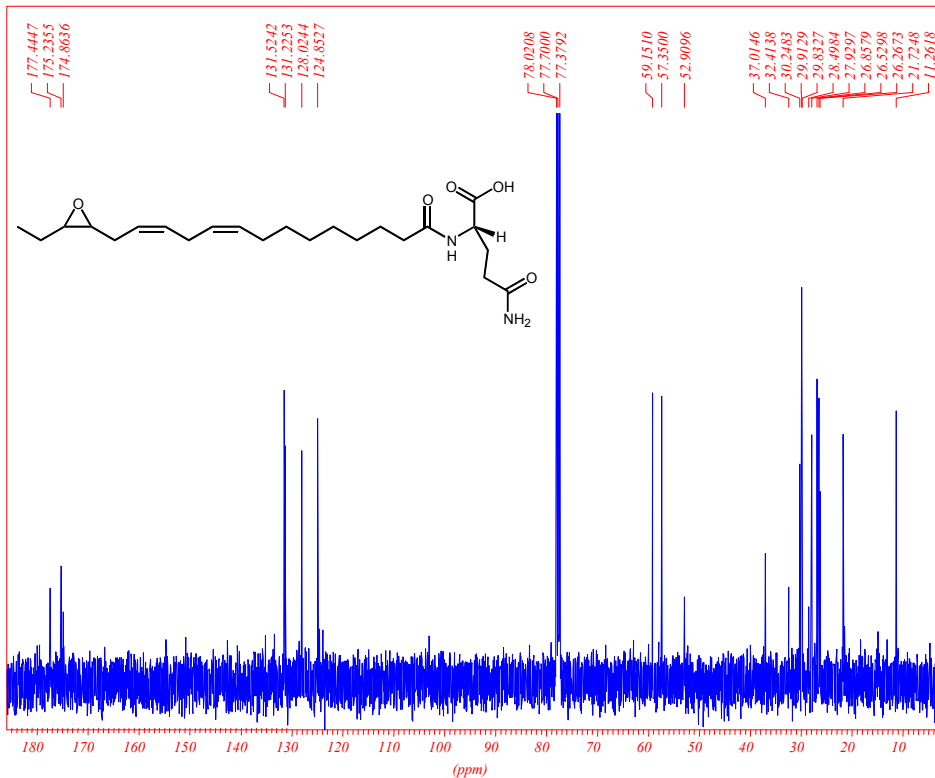
8.1.5.2 Infrarotspektrum von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)



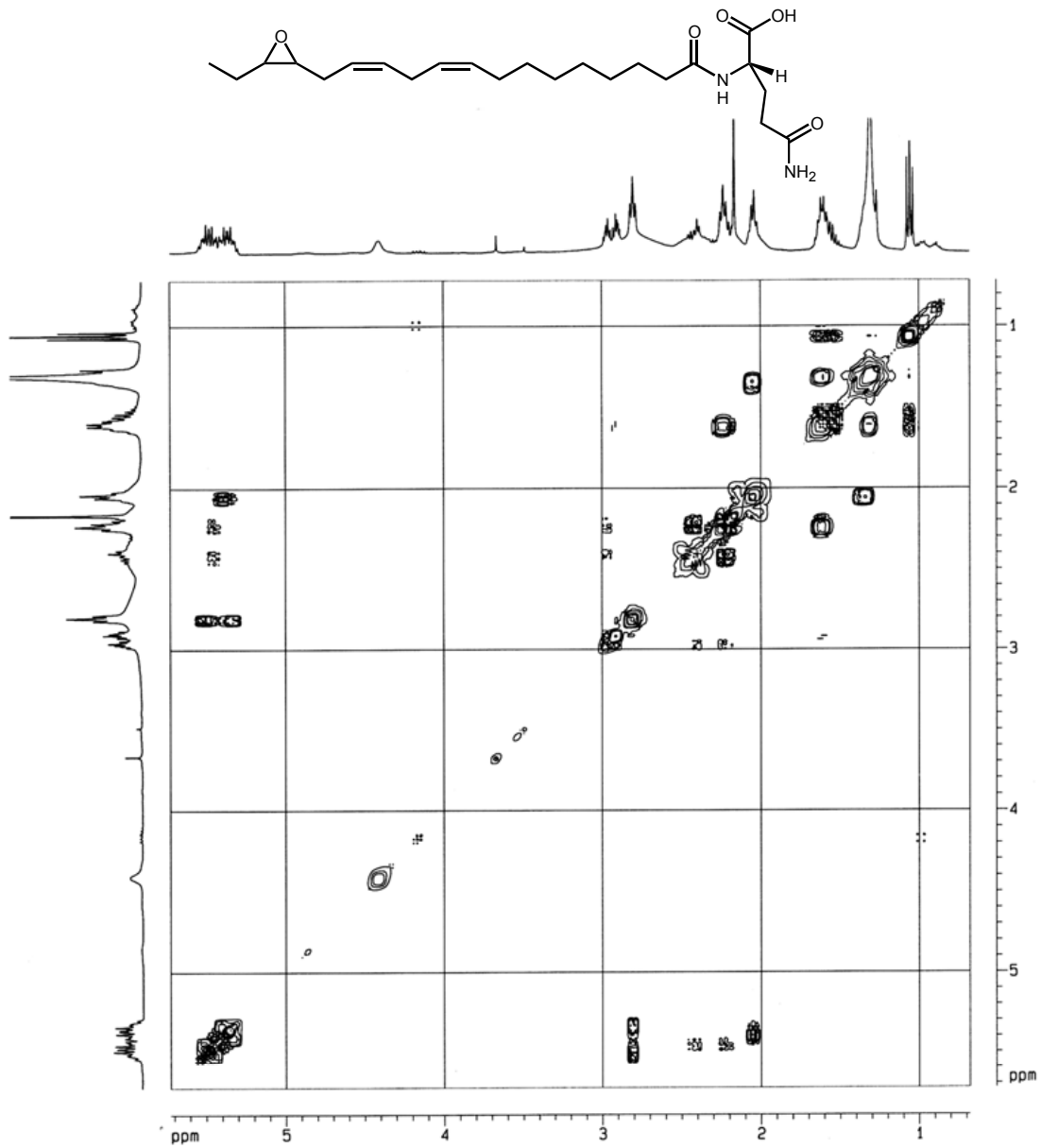
8.1.5.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 Mhz) von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)



8.1.5.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von *N*-(15,16-Epoxy-linoleoyl)-L-glutamin (32)

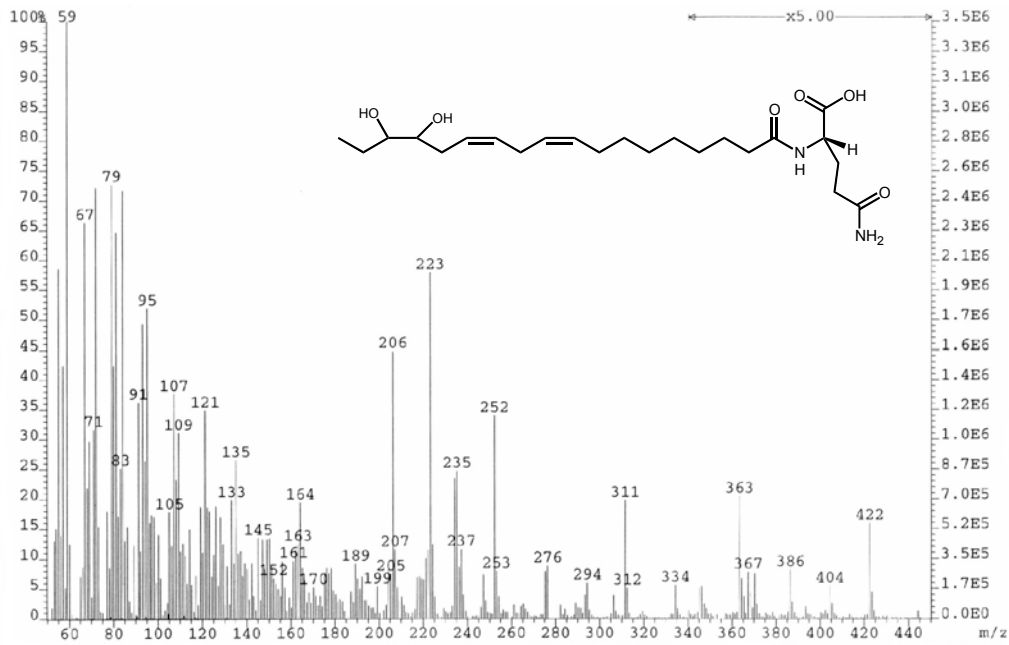


8.1.5.5 H,H-Cosy NMR Spektrum (400 MHz) von *N*-(15,16-Epoxylinoleoyl)-L-glutamin (32)

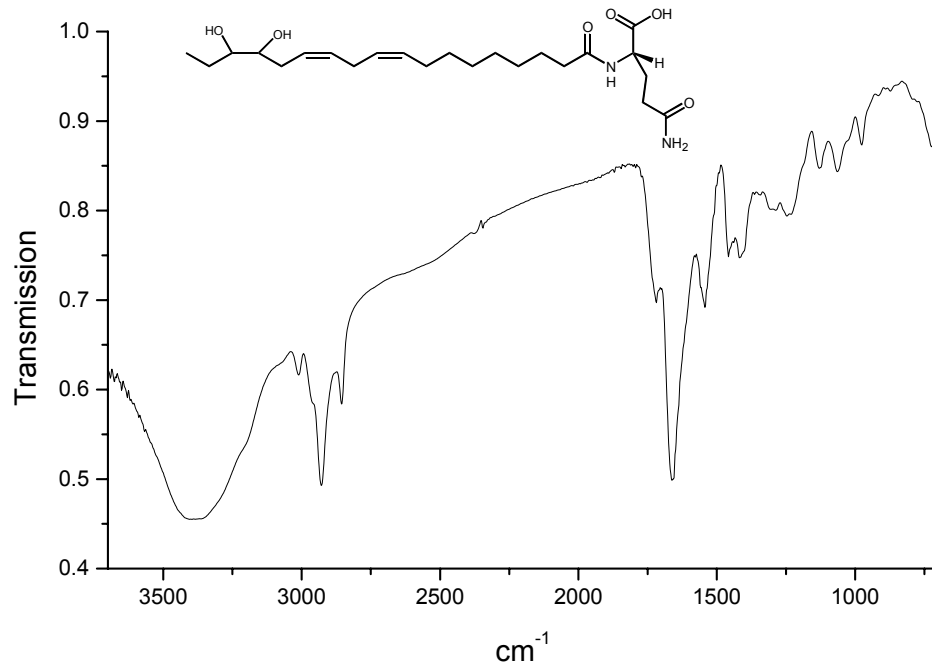


8.1.6 *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)

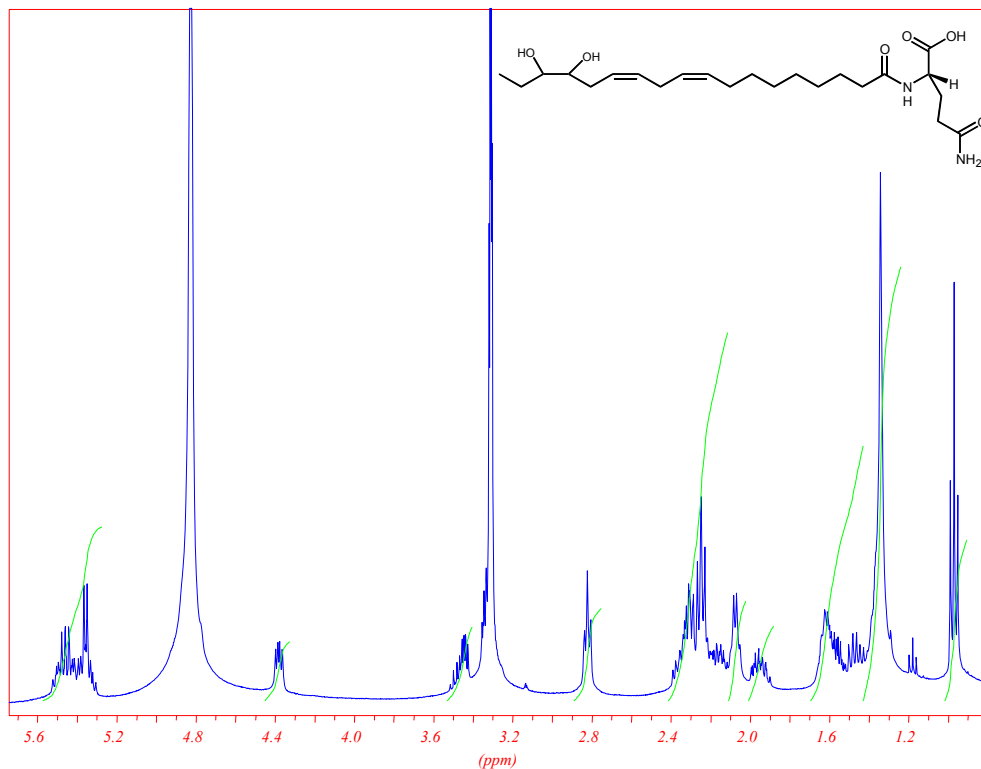
8.1.6.1 EI-Massenspektrum von *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)



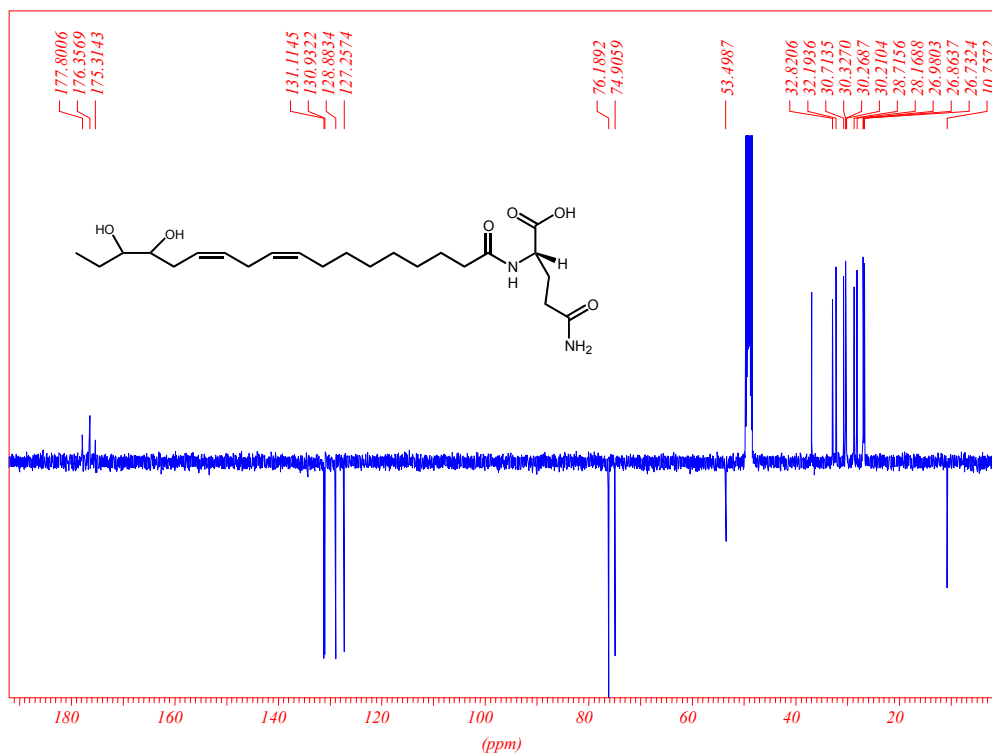
8.1.6.2 Infrarotspektrum von *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)



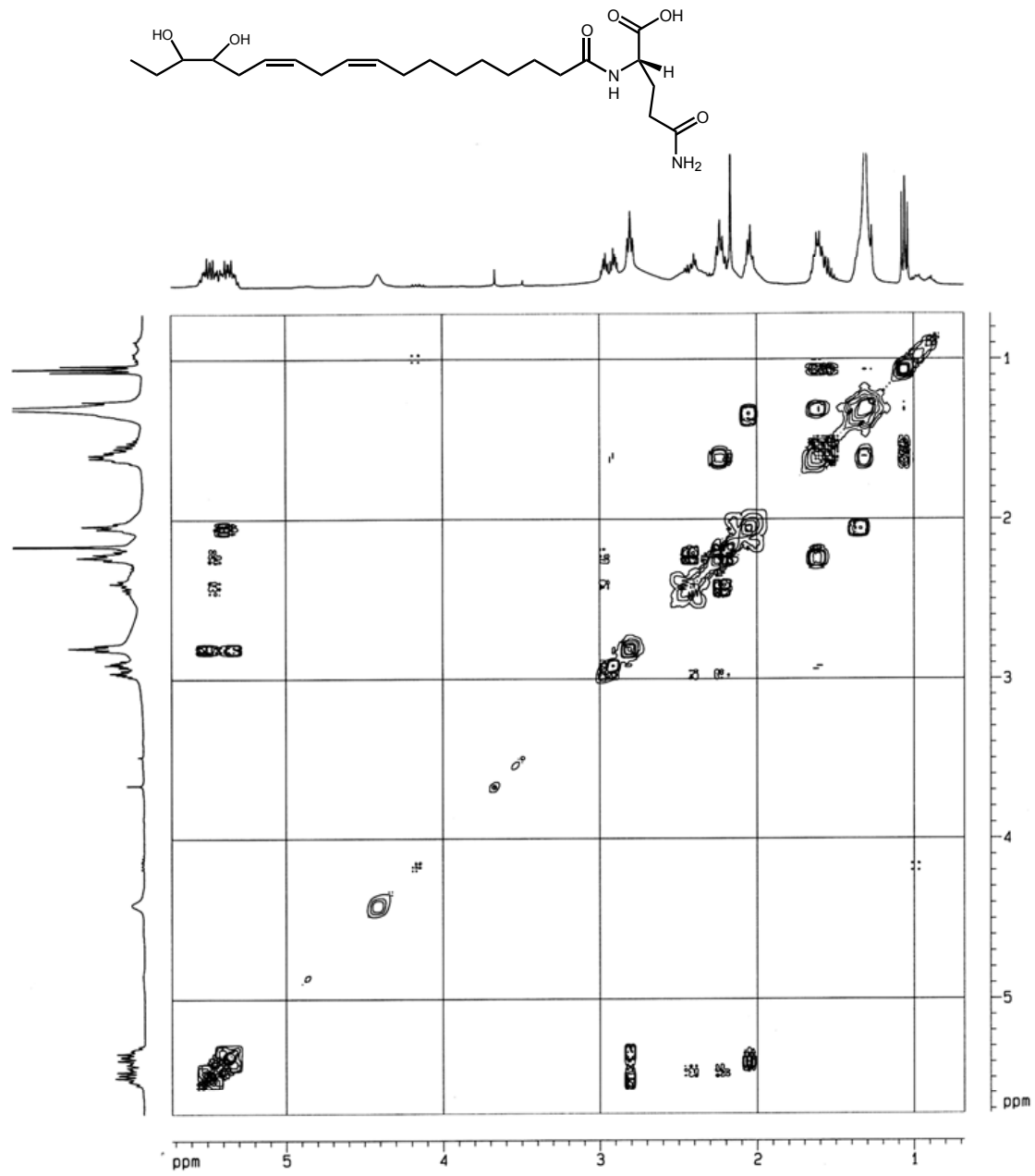
8.1.6.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)



8.1.6.4 APT-NMR Spektrum (100 MHz) von *N*-(15,16-Dihydroxy-linoleoyl)-L-glutamin (33)

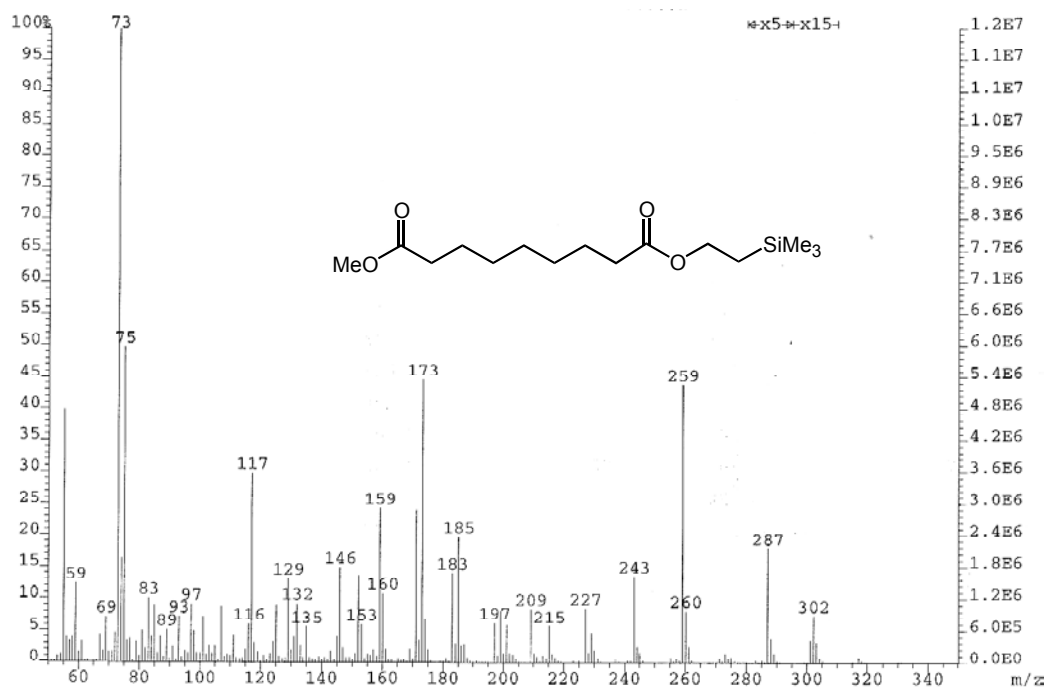


8.1.6.5 ^1H -Cosy NMR Spektrum (400 MHz) von *N*-(15,16-Dihydroxylinoleoyl)-L-glutamin (33)

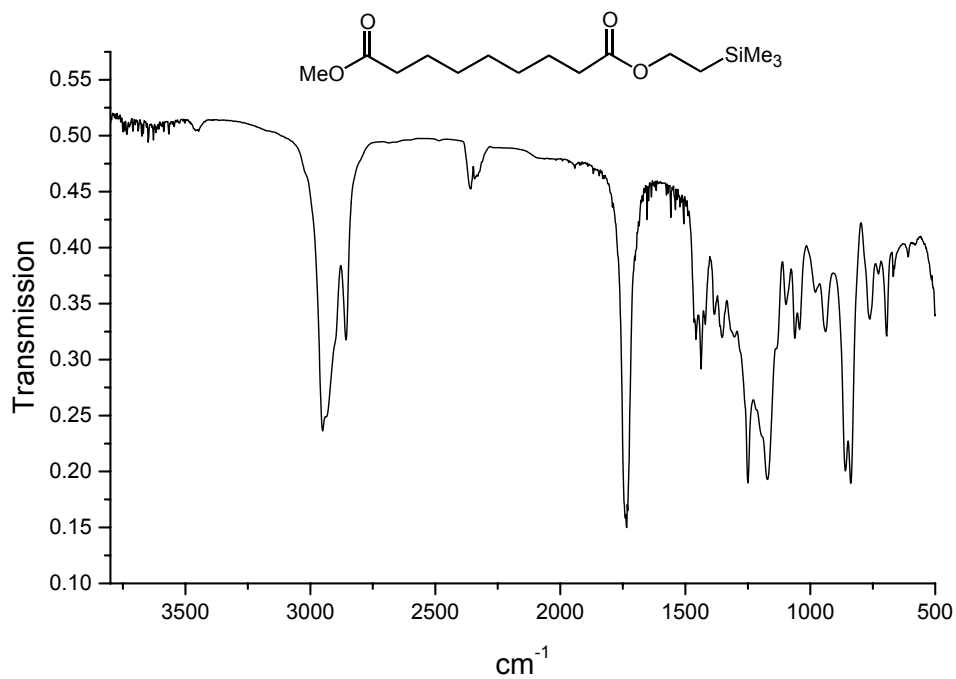


8.1.7 Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)

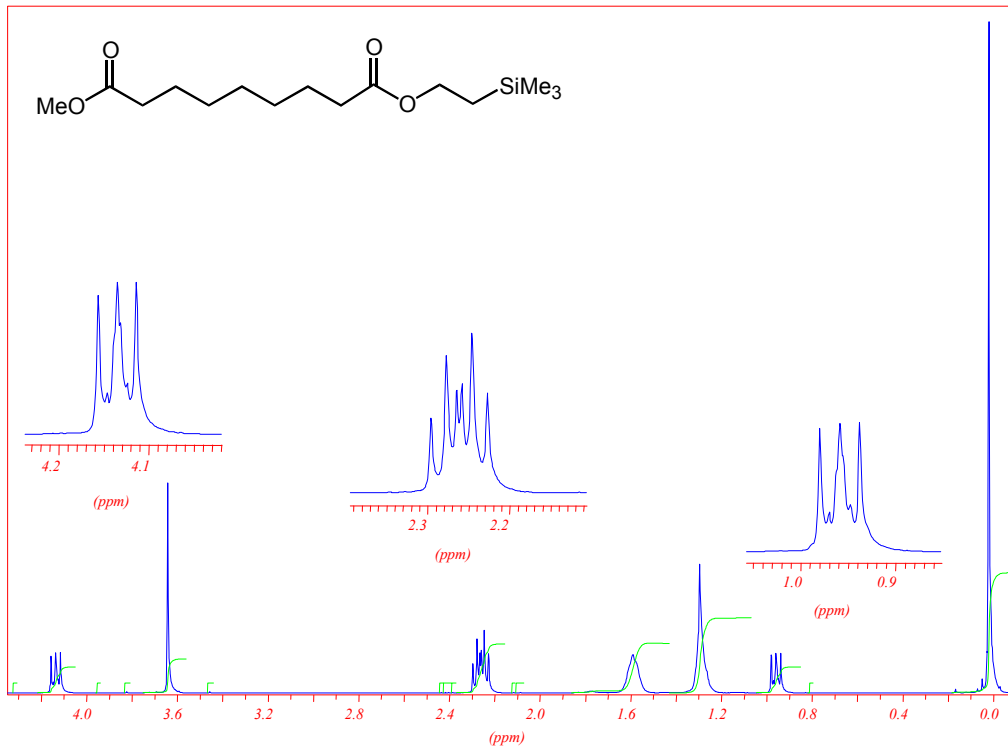
8.1.7.1 EI-Massenspektrum von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)



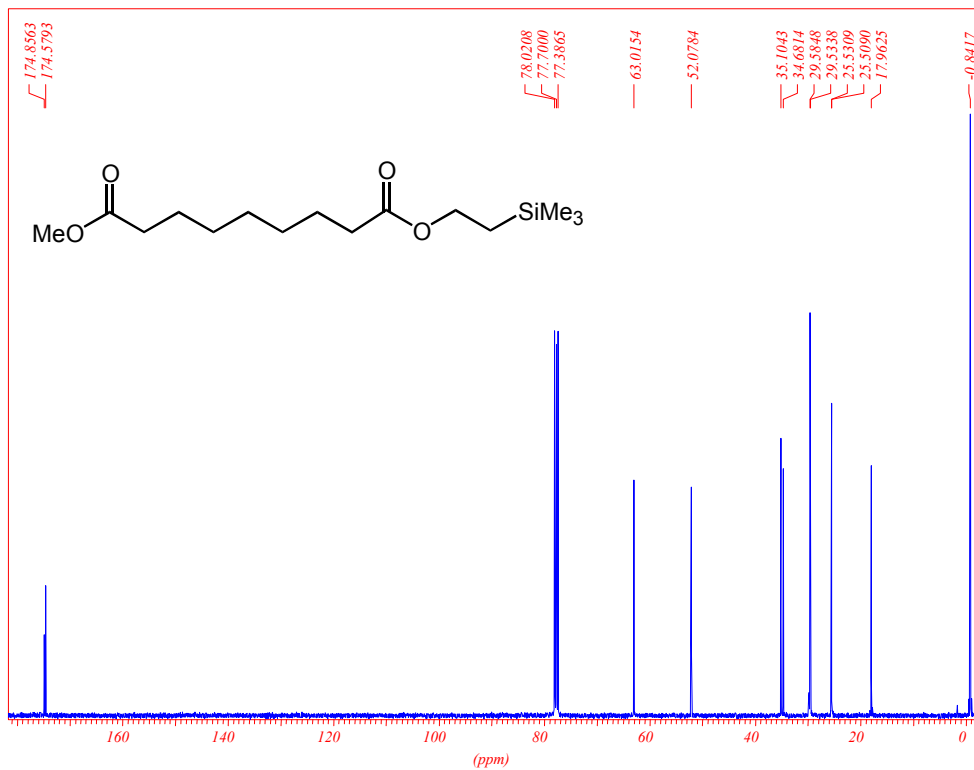
8.1.7.2 Infrarotspektrum von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)



8.1.7.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)

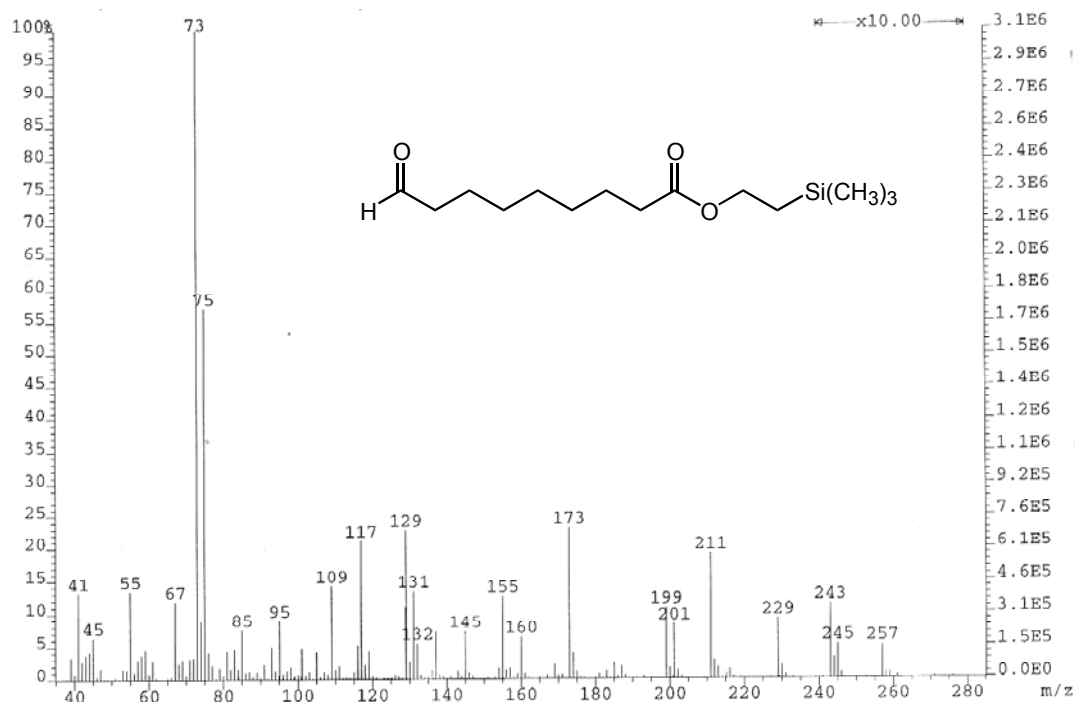


8.1.7.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von Nonandisäure-methylester-(2-trimethylsilylethyl)-ester (65)

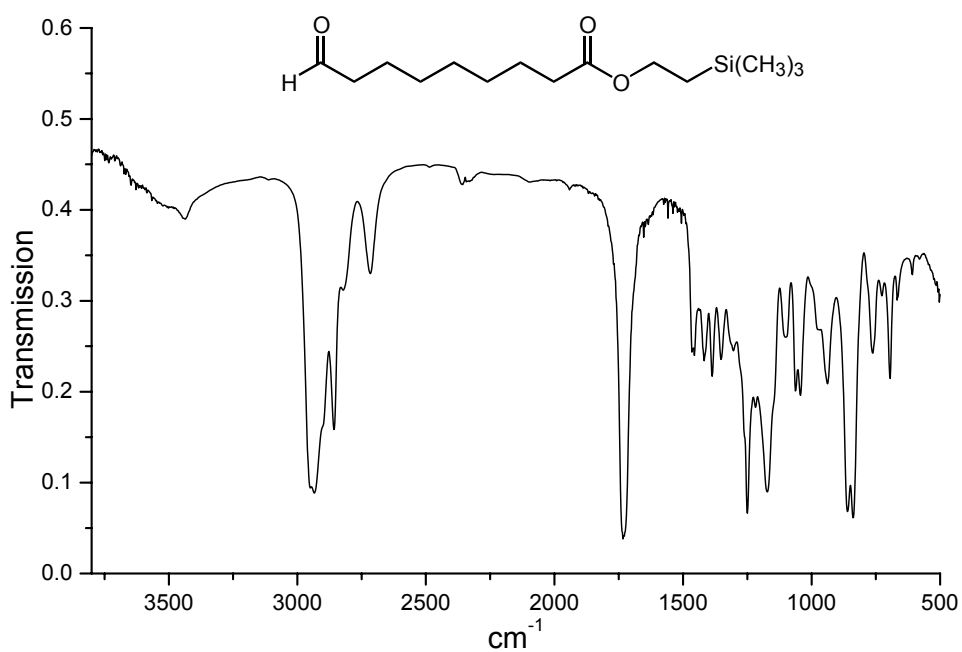


8.1.8 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)

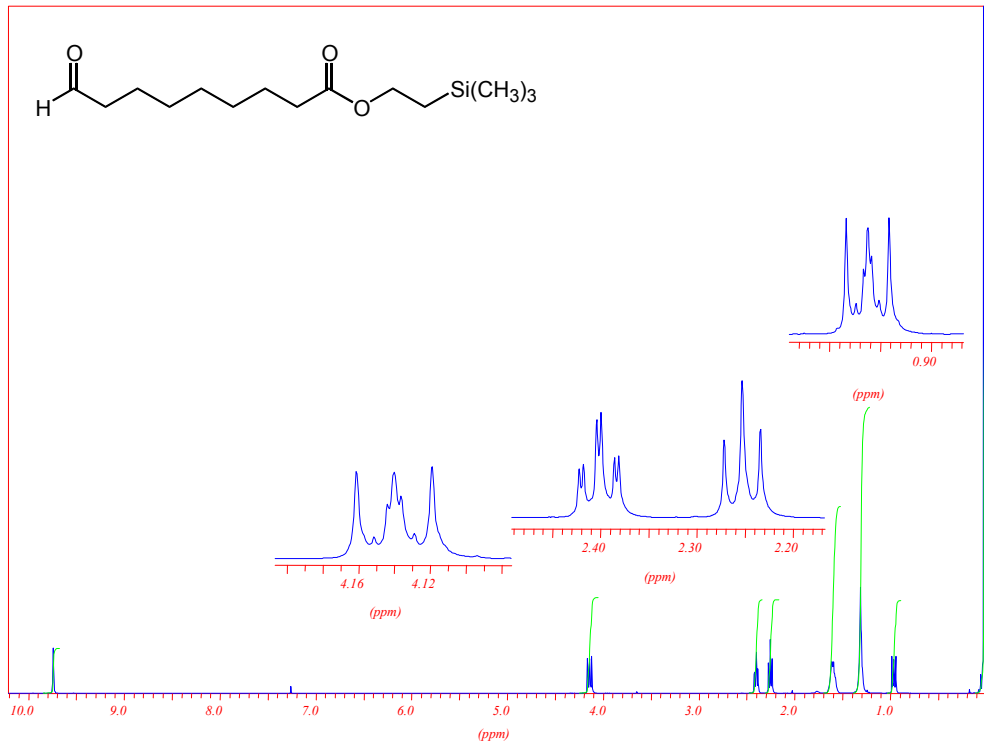
8.1.8.1 EI-Massenspektrum von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)



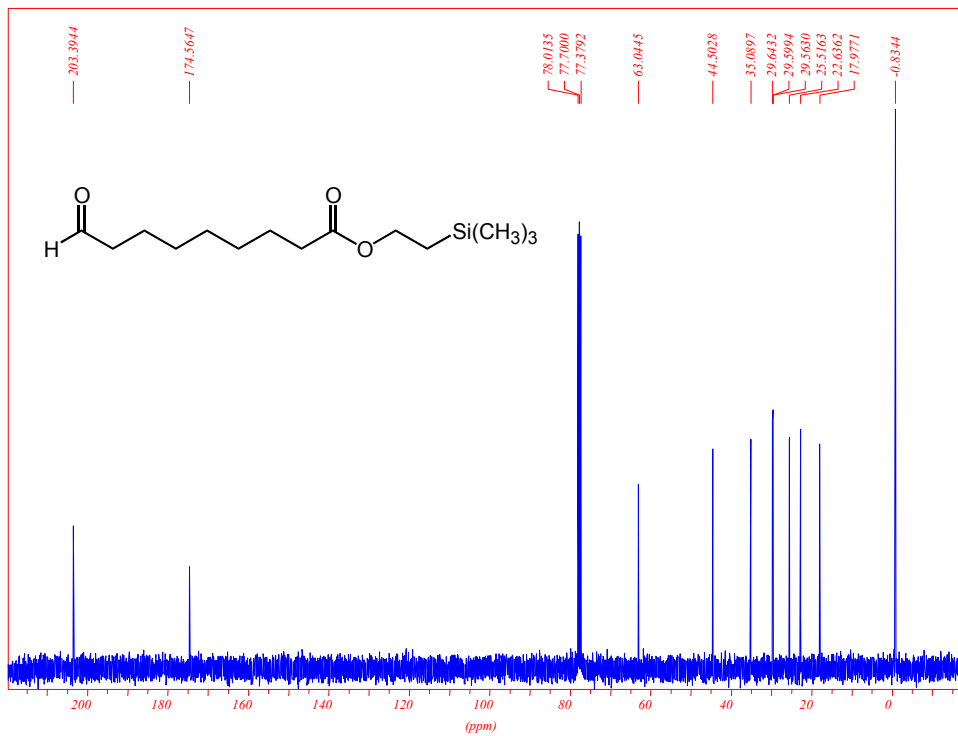
8.1.8.2 Infrarotspektrum von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)

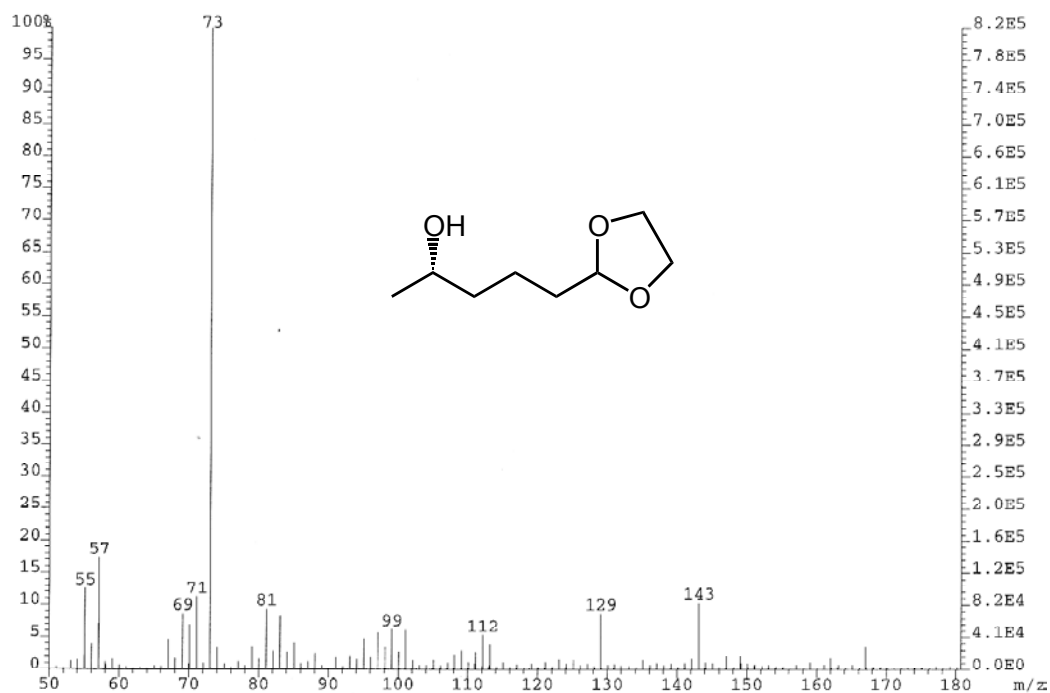
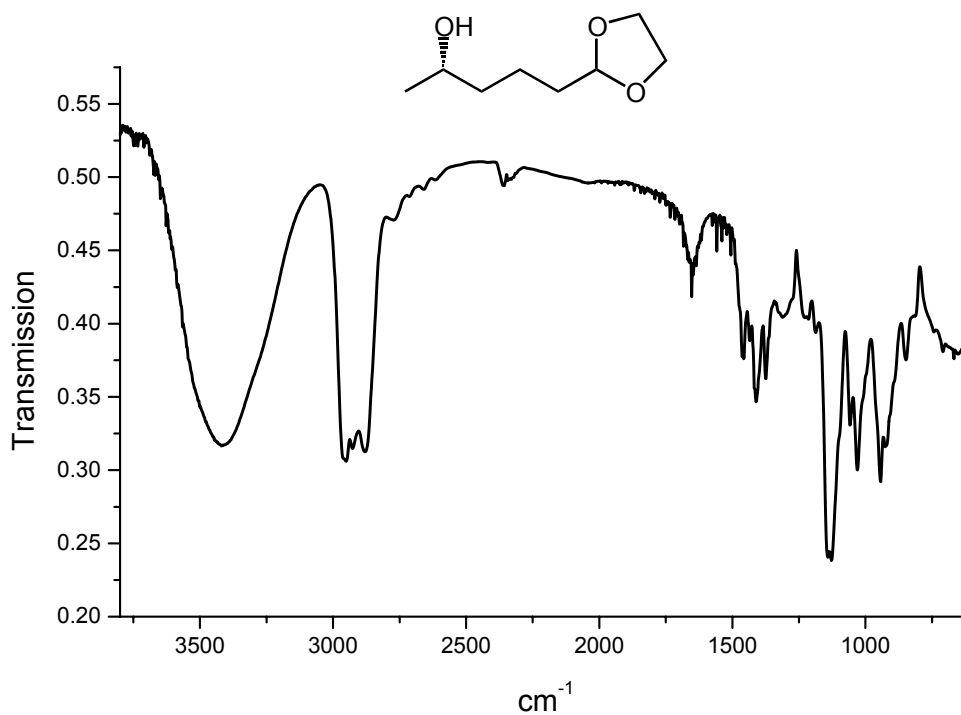


8.1.8.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)

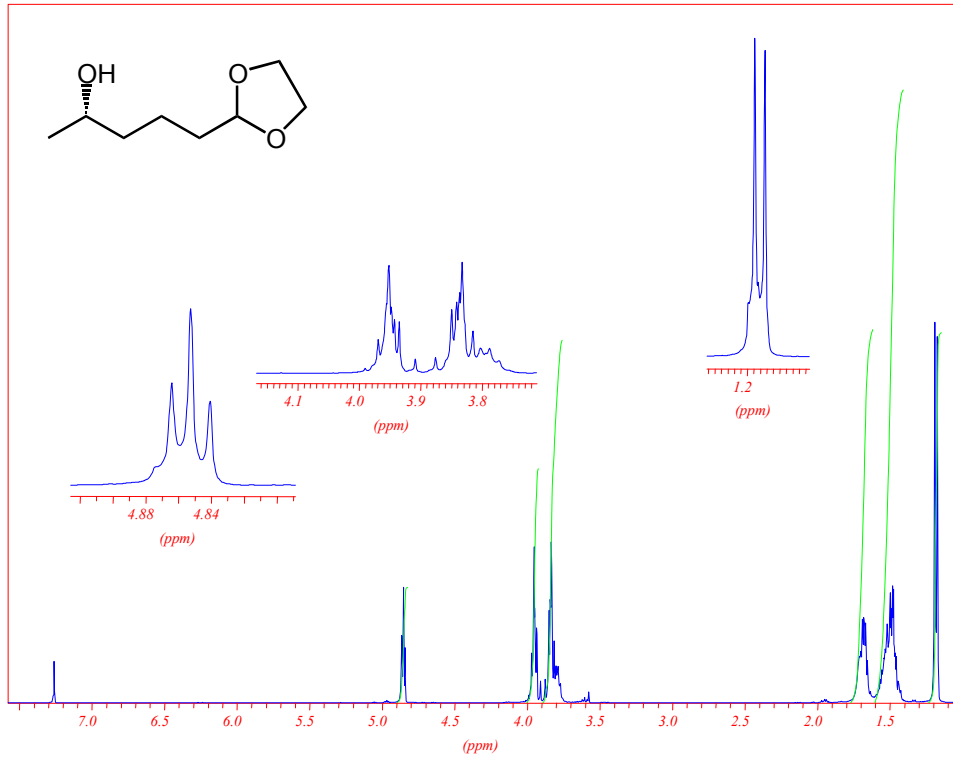


8.1.8.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von 9-Oxononansäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (64)

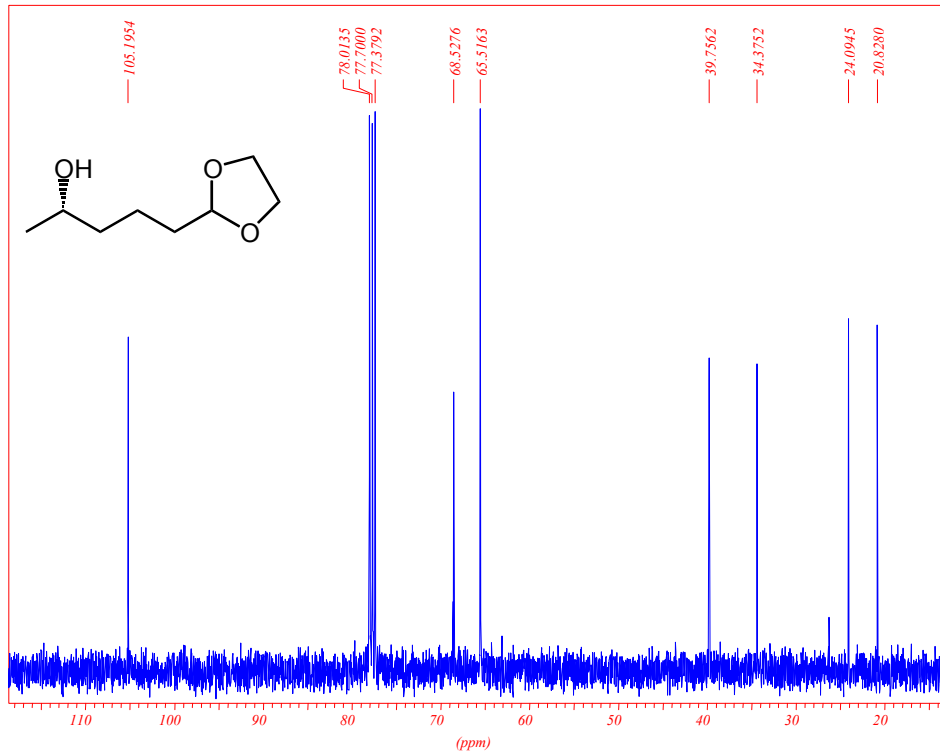


8.1.9 (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)**8.1.9.1 EI-Massenspektrum von (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)****8.1.9.2 Infrarotspektrum von (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)**

8.1.9.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)

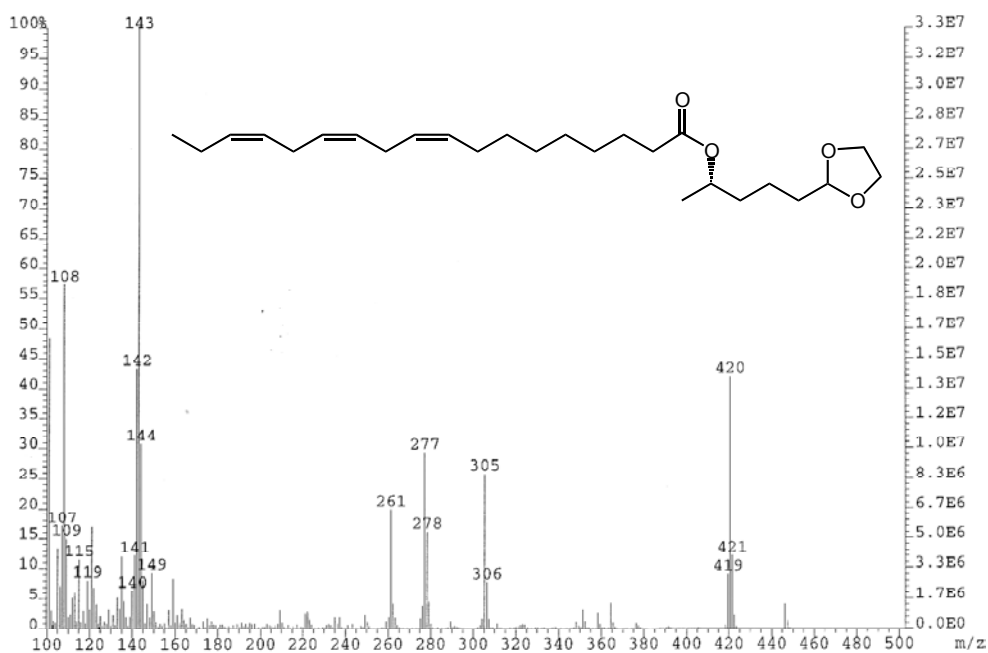


8.1.9.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von (2S)-5-(1,3-Dioxolan-2-yl)-pentan-2-ol (69)

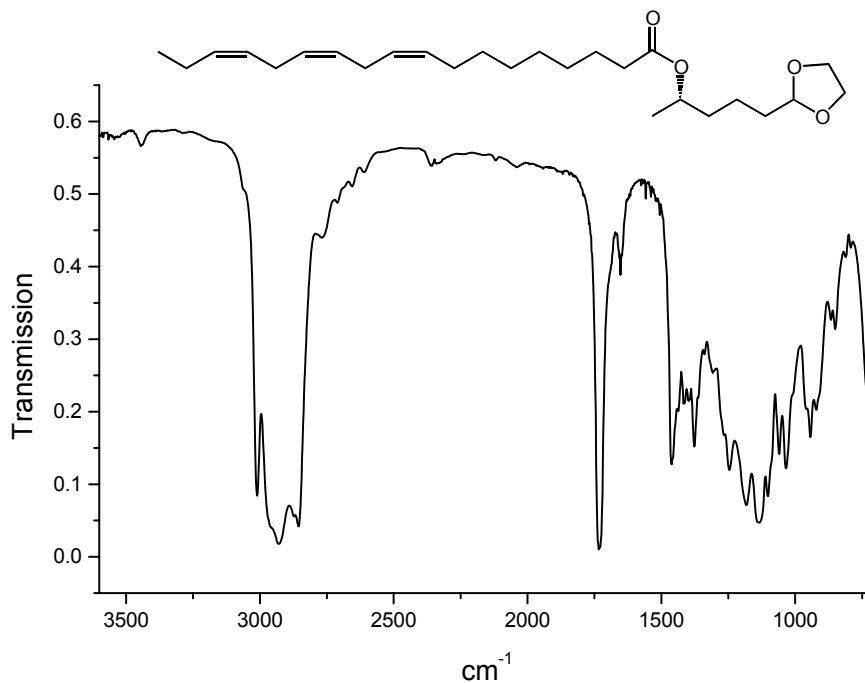


8.1.10 (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)

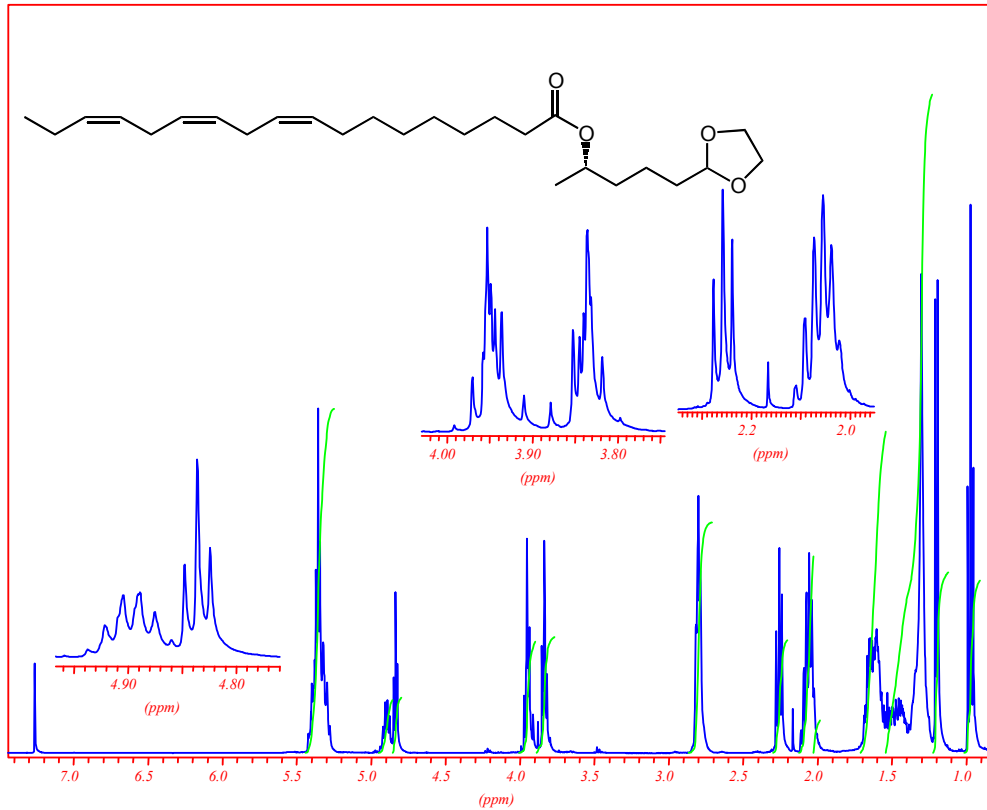
8.1.10.1 EI-Massenspektrum von (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)



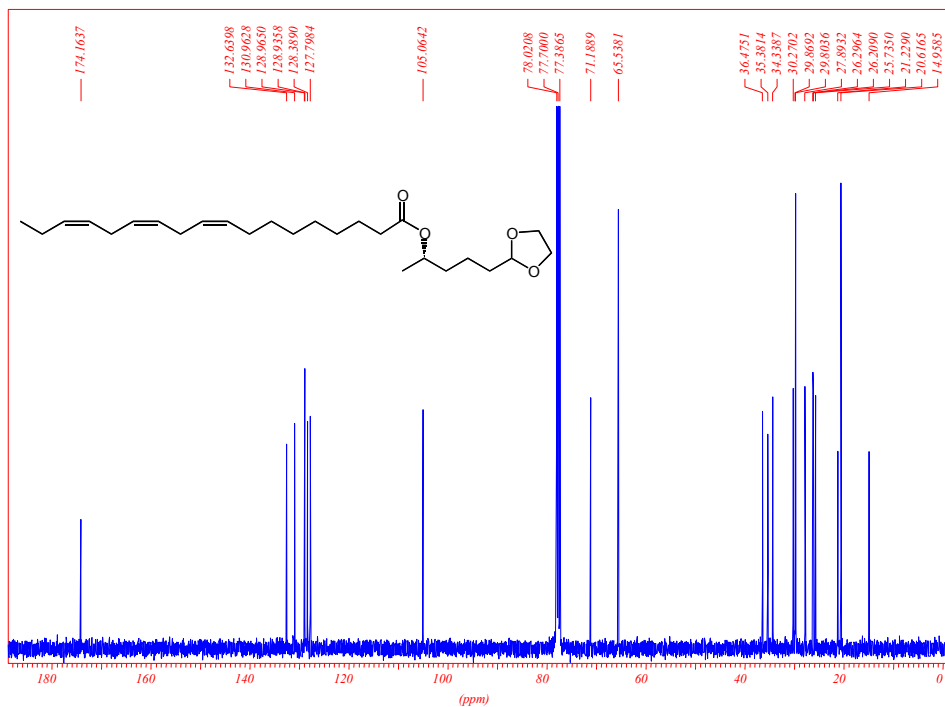
8.1.10.2 Infrarotspektrum von (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)

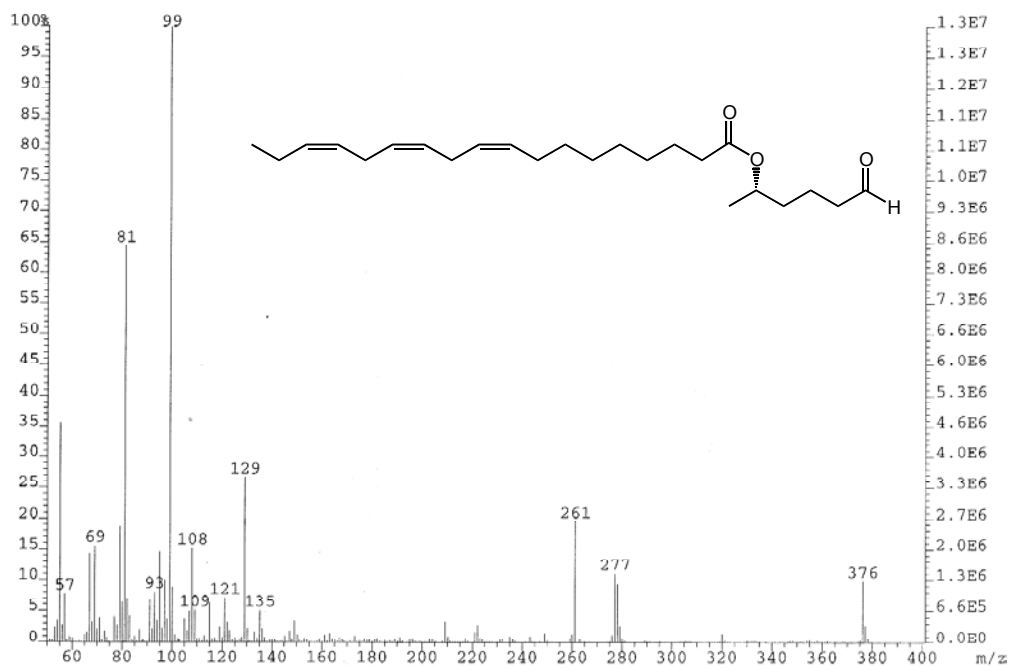
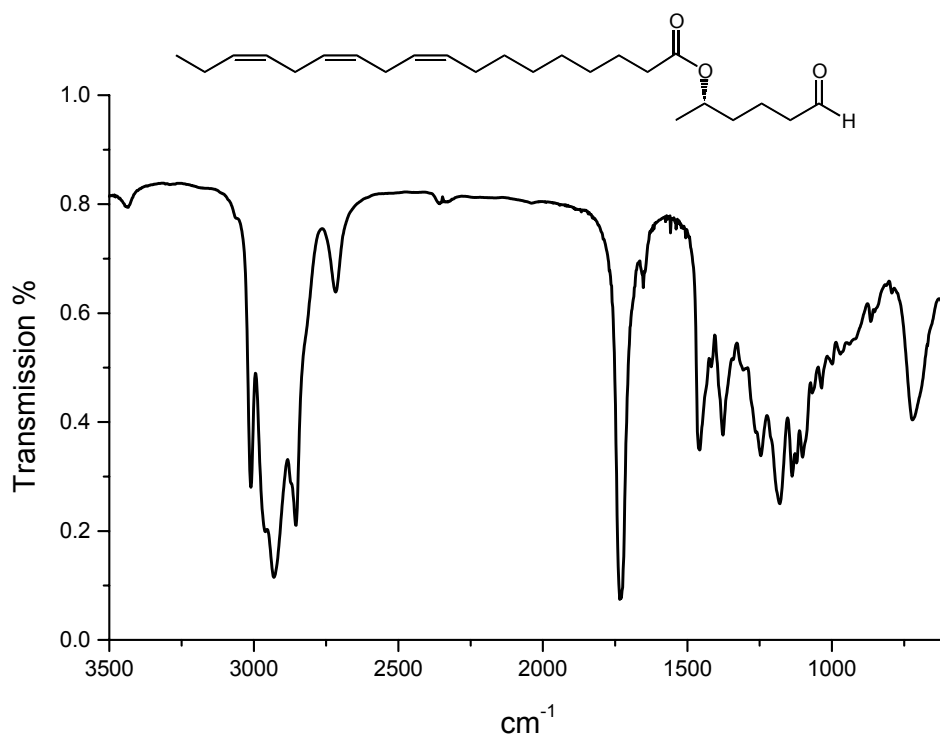


8.1.10.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)

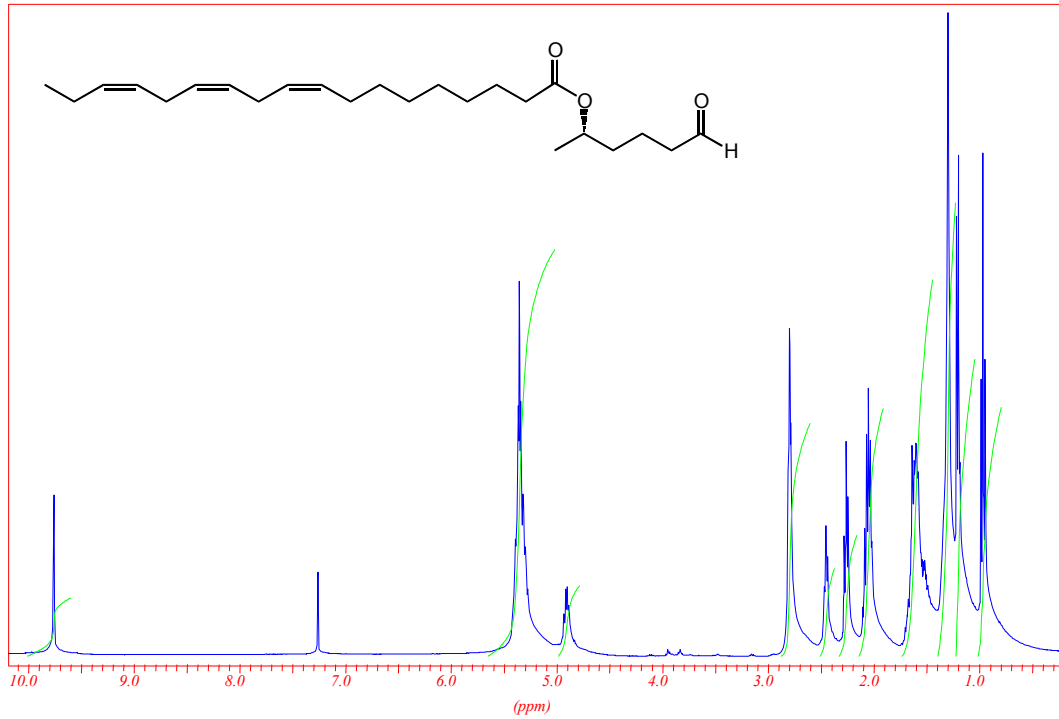


8.1.10.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von (4S)-Linolensäure-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-methyl-butylester (70)

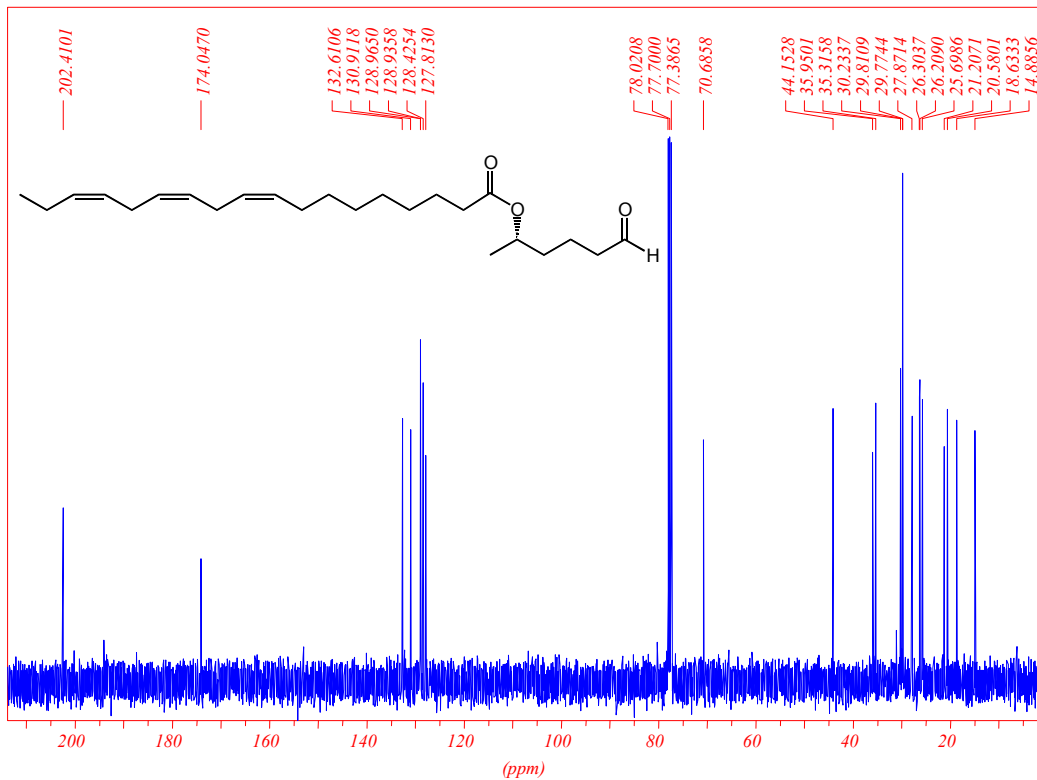


8.1.11 (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)**8.1.11.1 EI-Massenspektrum von (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)****8.1.11.2 Infrarotspektrum von (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)**

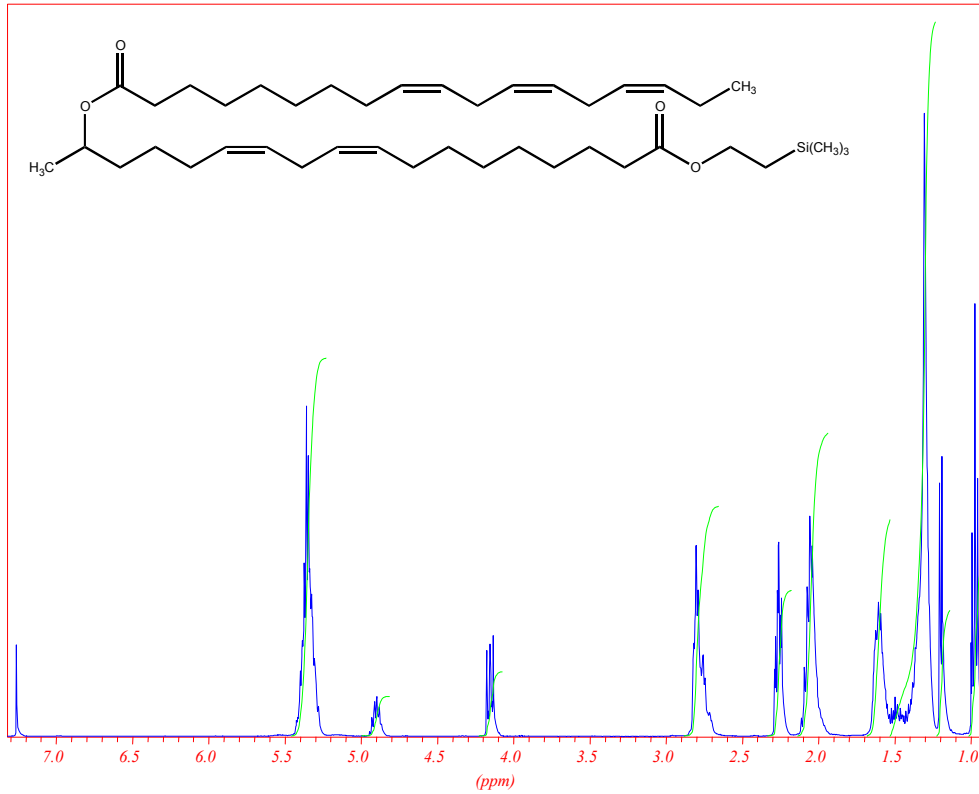
8.1.11.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)



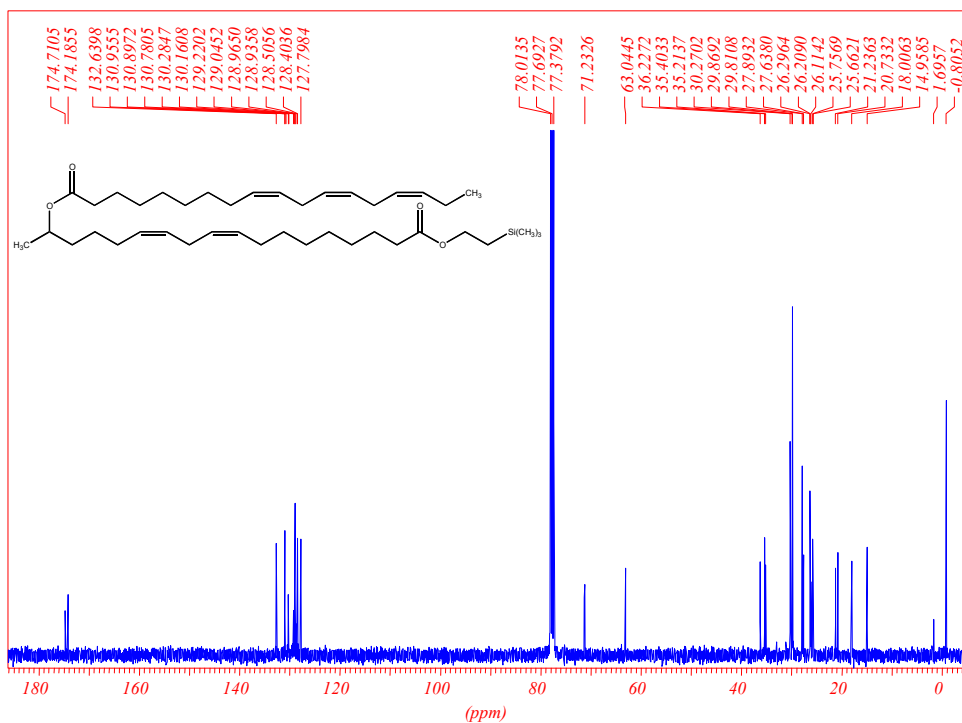
8.1.11.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von (1S)-Linolensäure-1-methyl-5-oxopentylester (59)

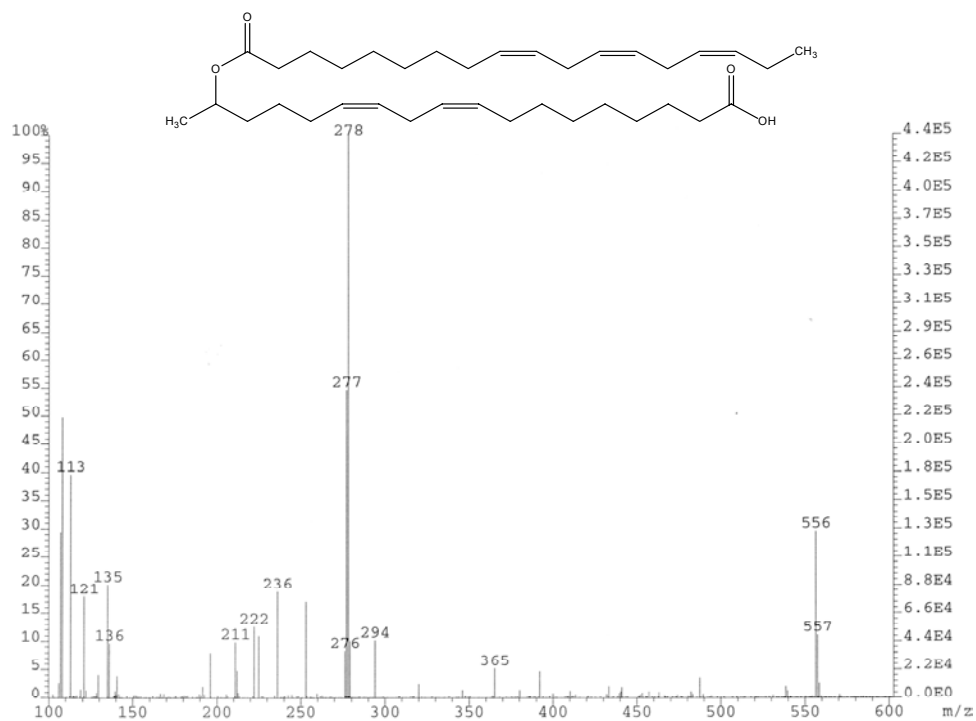
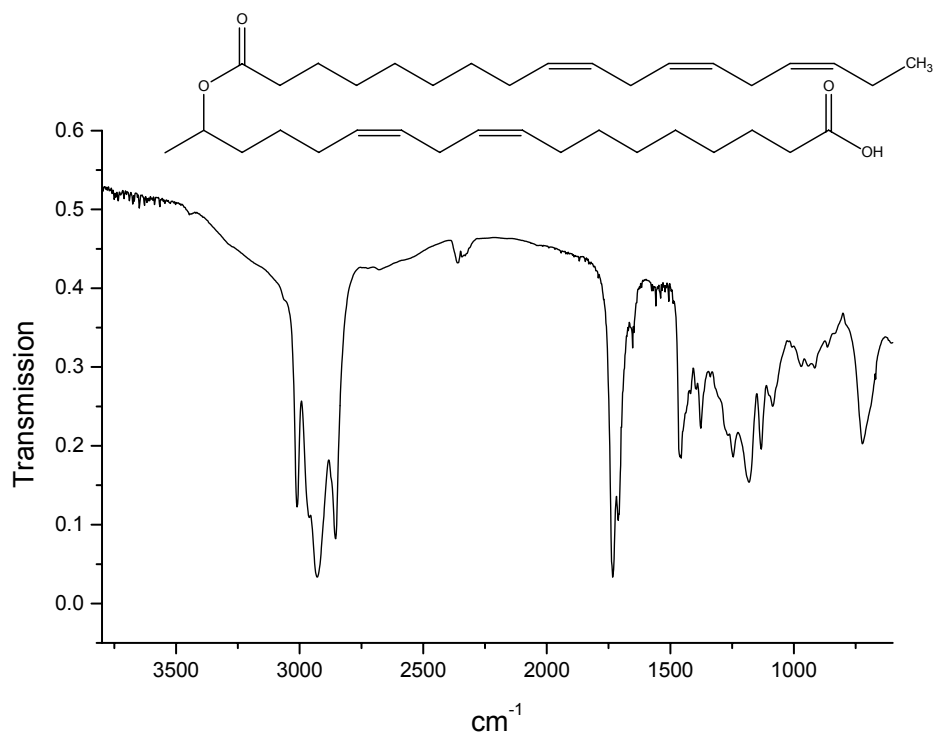


8.1.12.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von (17S)-17-Linolenoyloxylinolsäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (62)

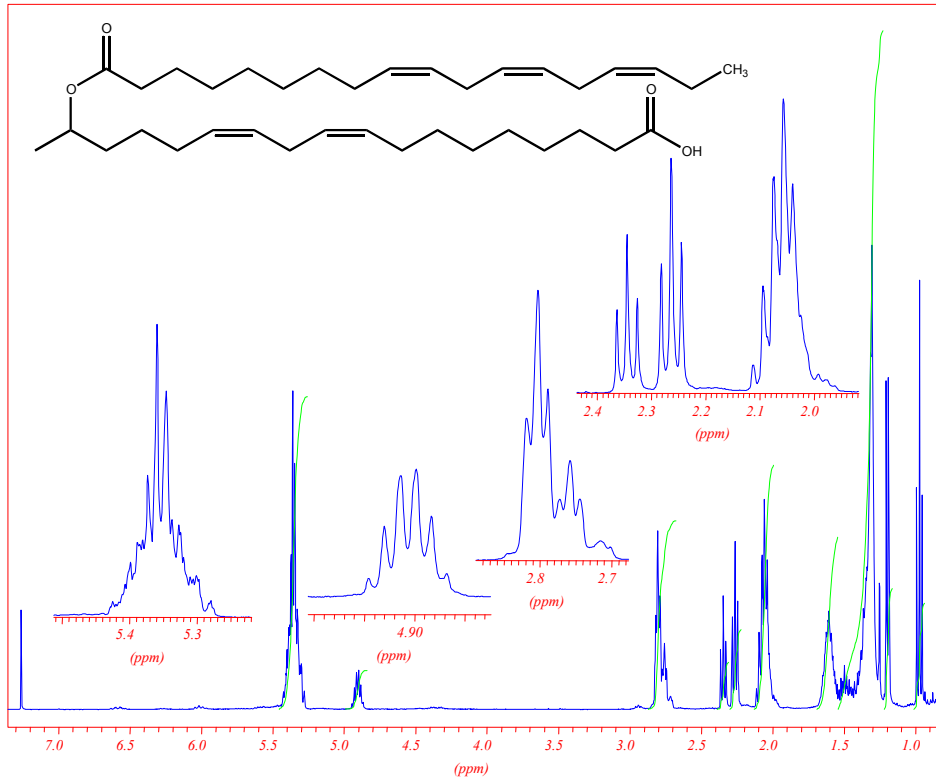


8.1.12.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von (17S)-17-Linolenoyloxylinolsäure-(2-trimethylsilylethyl)-ester (62)

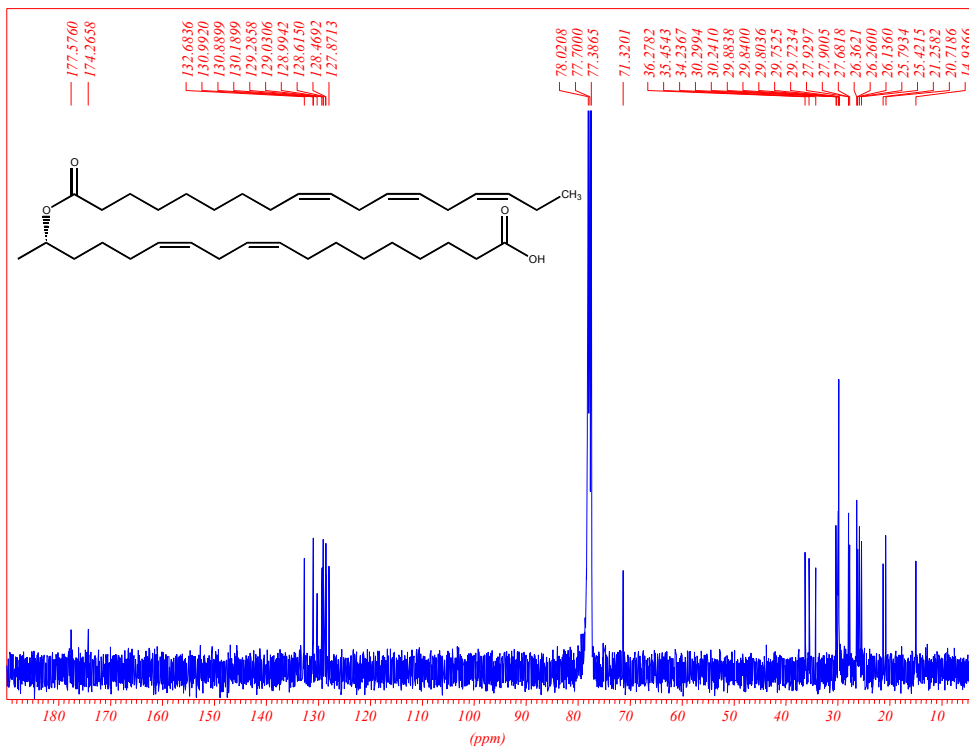


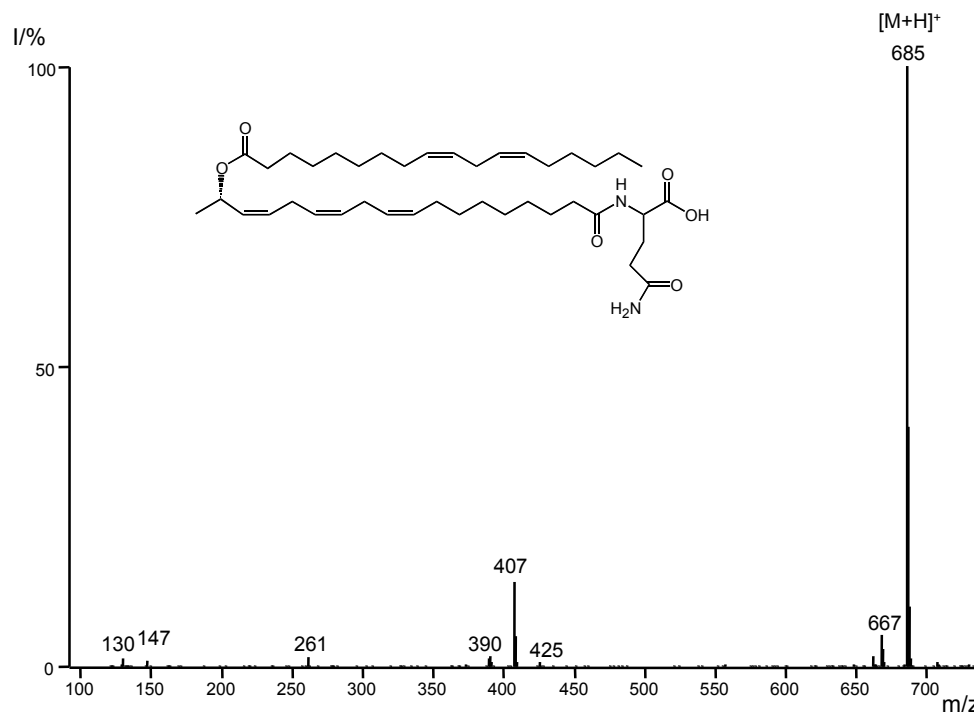
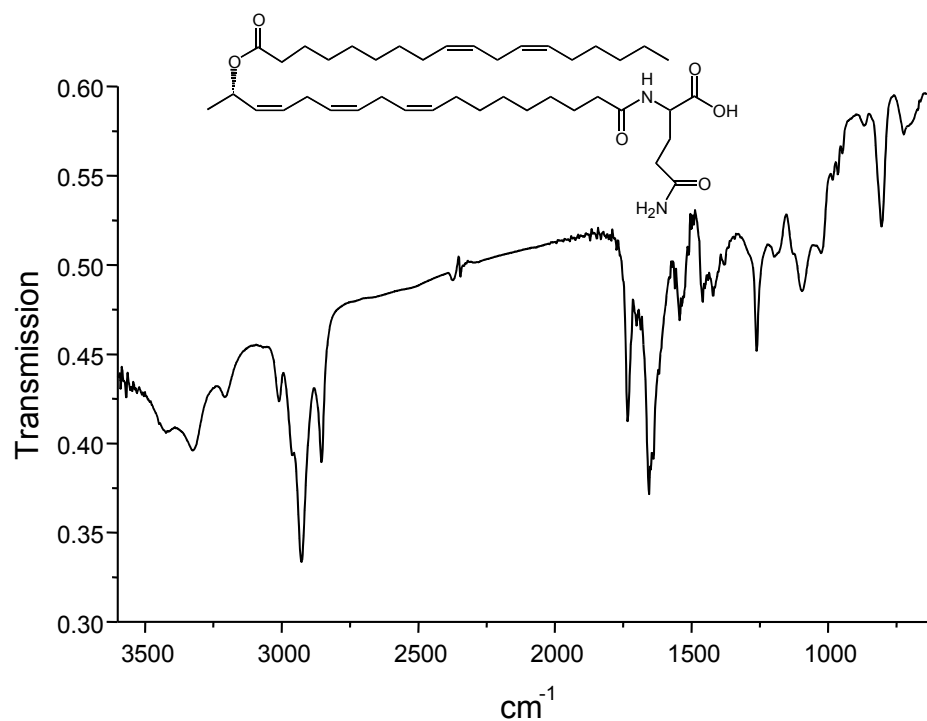
8.1.13 (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (63)**8.1.13.1 EI-Massenspektrum von (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (63)****8.1.13.2 Infrarotspektrum von (17S)-17-Linolenoyloxy-linolsäure (63)**

8.1.13.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz) von (17S)-17-Linolenoyloxylinolsäure (63)

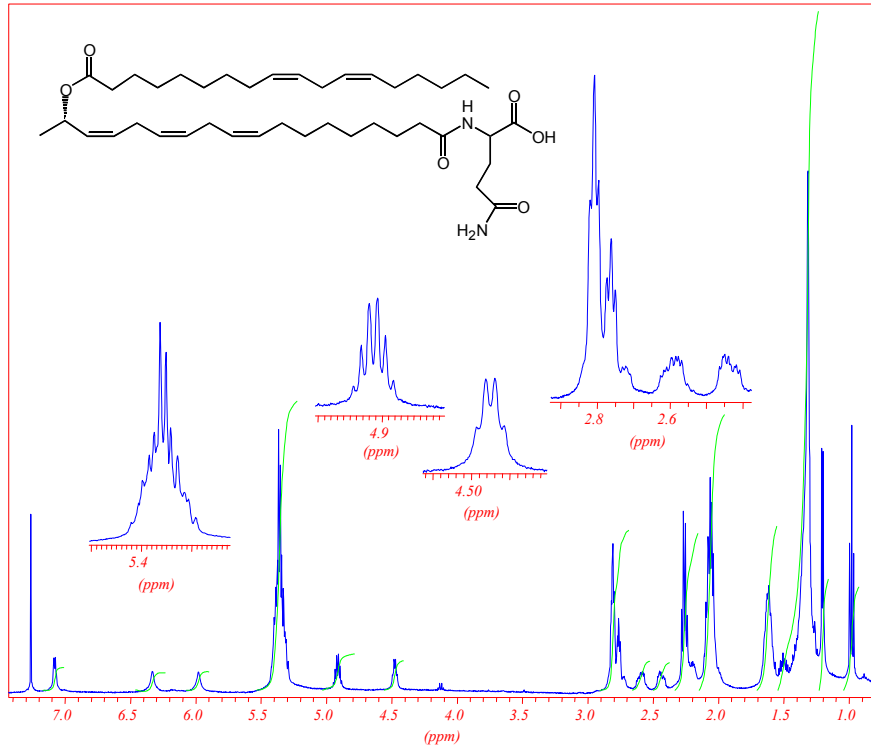


8.1.13.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (100 MHz) von (17S)-17-Linolenoyloxylinolsäure (63)

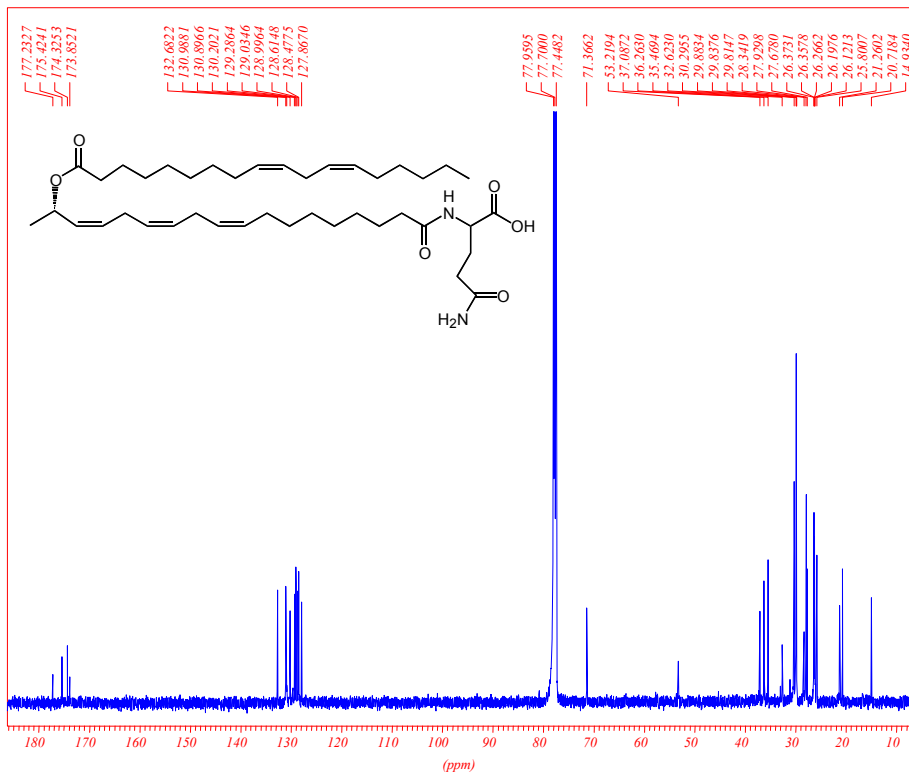


8.1.14 (17S)-N-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)**8.1.14.1 APCI-Massenspektrum von (17S)-N-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)****8.1.14.2 Infrarotspektrum von (17S)-N-(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-L-glutamin (48)**

8.1.14.3 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (500 MHz) von (17S)-N-(17-Linolenyloxylinoleoyl)-L-glutamin (48)



8.1.14.4 $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (125 MHz) von (17S)-N-(17-Linolenyloxylinoleoyl)-L-glutamin (48)



8.2 Abkürzungsverzeichnis

8.2.1 Allgemeine Abkürzungen

Ac	Acetyl
AcOH	Eisessig
AcylGln	<i>N</i> -Acyl-glutamin
AcylGlu	<i>N</i> -Acyl-glutamat
amu	atomare Masseneinheit
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
BHI	Brain Heart Infusion (Mikroorganismen-Medium)
CI	chemische Ionisation
CLS	closed loop stripping (Sammlung flüchtiger Stoffe im geschlossenen system)
cmc	kritische Micellbildungskonzentration
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMNT	4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Desoxy-D-xylulose
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstossionisation (electron impact)
EpoxyLAGln	<i>N</i> -(15,16-Epoxy-linoleoyl)-glutamin
ESI	Elektrosprayionisation
FDP	Farnesyldiphosphat
g	Gramm
GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
GC-HR-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit hochauflösendem Massenspektrometer
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
Gln	L-Glutamin

Glu	L-Glutamat
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-ESI-MS	Hochauflösende Elektrospraymassenspektroskopie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IR	Infrarotspektrometrie/meter
<i>i</i> -	iso-
JA	Jasmonsäure
JAMe	Methyljasmonat
l	Liter
LA	Linolsäure
LEA	Linolensäure
LEAOLAGln	<i>N</i> -(17-Linolenoyloxy-linoleoyl)-glutamin
LEAOLEAGln	<i>N</i> -(17-Linolenoyloxy-linolenoyl)-glutamin
LEAGln	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamin
LEAGlu	<i>N</i> -Linolenoyl-L-glutamat
LEAPhe	<i>N</i> -Linolenoyl-L-phenylalanin
LEATyr	<i>N</i> -Linolenoyl-L-tyrosin
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
M	Molar
M ⁺	Molekülion
MCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MEP	Methylerythritolphosphat
Mes	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MeSA	Methylsalicylat
MEV	Mevalonat/Mevalolacton
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Stoffmenge $6 \cdot 10^{23}$ Teilchen

MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrum
MS-MS	Massenspektrum eines Ions vom 1. Massenspektrum
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
ng	Nanogramm
NMR	magnetische Kernresonanz
N/m	Newton/Meter
NP	Normalphase
OHAcylGln	<i>N</i> -(Hydroxy-acyl)-glutamin
OHLAGln	<i>N</i> -(17-Hydroxy-linoleoyl)-L-glutamin
OHLEAGln	<i>N</i> -(17-Hydroxy-linolenoyl)-L-glutamin
PBP	Pheromon Bindeprotein (pheromone binding protein)
PC	Dioleoylphosphatidylethanolamin
Ph	Phenyl
PP	Pyrophosphat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP	Umkehrphase (reversed phase)
SA	Salicylat
SIM	selected ion modus
16S-rRNA	charakteristische RNA-Sequenz zur Bestimmung von Mikroorganismen
SPME	Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction)
<i>t</i>	Zeit
<i>t</i> -	tris-
TBAF	tertiär-Butylaluminiumfluorid
TBDMS	tertiär-Butyldimethylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom (total ion count)
TMS	Trimethylsilyl
TMTT	4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridyldiphosphat

UV	Ultraviolett-spektroskopie
δ	chemische Verschiebung
μg	10^{-6} Gramm

8.2.2 Abkürzungen bei NMR-Spektren

br	breit
d	Dublett
m	Multiplett
pt	pseudo-Triplett
q	Quartett
s	Singulett
se	Sextett
t	Triplett

8.2.3 Abkürzungen bei IR-Spektren

m	mittel
s	stark
w	schwach

8.3 Publikationen und Vorträge

8.3.1 Publikationen

D. Spiteller, W. Boland, Identification and Synthesis of (17S)-17-Acyloxyacylglutamine; Novel Surfactants from Oral Secretions of Lepidopteran Larvae. In Vorbereitung.

D. Spiteller, W. Boland, 15,16-Epoxylinoleoyl-L-glutamine and 15,16-Dihydroxylinoleoyl-L-glutamine Isolated from Oral Secretions of Lepidopteran Larvae. *Tetrahedron*, im Druck.

D. Spiteller, A. Jux, J. Piel, W. Boland, Feeding of [5,5-²H₂]-1-desoxy-D-xylulose and [4,4,6,6,6-²H₅]-mevalolactone to geosmin-producing *Streptomyces* spp. and *Fossombronina pusilla*. *Phytochemistry*, im Druck.

W. Boland, D. Spiteller, Mikrobielle Symbionten von Insekten und ihre Bedeutung für die Pflanzen. Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Bayerische Akademie der Wissenschaften, **2002**, 23, 111-122.

C. Oldenburg, S. Kanaujia, D. Spiteller, N. J. Oldham, W. Boland, K.-E. Kaissling, Benzoic acid a stimulant of odorant receptors of *Bombyx mori*, is rapidly metabolized to N-benzoylserine on the antennae. *Chemoecology* **2001**, 11, 183-190.

W. Boland, D. Spiteller, Electronic Noses, in Bioresponse-Linked Instrumental Analysis, Editor: B. Hock, Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, **2001**, 57-78.

D. Spiteller, G. Pohnert, W. Boland, Absolute configuration of volicitin, an elicitor of plant volatile biosynthesis from lepidopteran larvae. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1483-1485.

D. Spiteller, K. Dettner, W. Boland, Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: Microbial biosynthesis of *N*-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 755-762.

8.3.2 Vorträge und Poster

22.10. 1999: Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemiker-Treffen in Bayreuth

Vortrag: Chemie der Salivarsekrete von Lepidopteren

28.3.-30.3. 2000: Kurt-Mothes-Treffen in Halle

Vortrag: *N*-Acylamino Acid Conjugates from Insects

5.5. 2000: Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemiker-Treffen in Leipzig

Vortrag: Endosymbiontische Bakterien als Produzenten von duftinduzierenden *N*-Acylaminosäurederivaten

28.2.-2.3.2001: Irsee Tagung

Vortrag/Poster: Mikroorganismen im Raupendarm – verräterische Symbionten ?

7.8.-12.8.2001: ISCE-Meeting Lake Tahoe, USA

Vortrag: Biosynthesis of *N*-acyl amino acids by gut bacteria

12.4.2002: Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemiker-Treffen in Leipzig

Vortrag: Neue *N*-Acyl-aminosäurekonjugate von herbivoren Insekten

24.7.-28.7.2002 Leopoldina Meeting in Würzburg

Poster: Gut bacteria of lepidopteran larvae are involved in the synthesis of elicitor-active *N*-acyl-glutamine conjugates

5.8.-8.8.2002: ISCE Meeting in Hamburg

Poster: Biosynthesis of Geosmin

8.4 Lebenslauf

Name: Dieter Stefan Spitteller
geboren: 23.10.1974 in Göttingen
Nationalität: österreichisch
Eltern: Prof. Dr. Gerhard Spitteller
Dr. Margot Spitteller (geborene Friedmann)
Geschwister: Prof. Dr. Michael Spitteller, Dr. Peter Spitteller

Schulbildung:

September 1980-Juli 1984 Besuch der Grundschule Meyernberg in Bayreuth
September 1984- Juni 1993 Besuch des Graf-Münster-Gymnasiums in Bayreuth
9. Juli 1993 Erhalt des Abiturzeugnisses

Studium:

Wintersemester 1993 Chemiestudium an der Universität Bayreuth
15. November 1995 Diplomvorprüfung
Juli 1996-Ende 1998 Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
April-Mai 1997 Praktikum in organischer Chemie an der ETH Zürich bei Prof. Dr. Andrea Vasella
13. Mai 1998 Diplomhauptprüfung
Juni 1998-März 1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Karlheinz Seifert
Thema: Lipidperoxidationsprodukte des Low Density Lipoproteins

Dissertation:

1. Mai 1999-Dezember 2002 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Wilhelm Boland am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena.
Thema: Charakterisierung von *N*-Acyl-glutamin-konjugaten aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven

Tätigkeiten:

August 1998-Januar 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für organische Chemie der Universität Bayreuth
1. Mai 1999- Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena

9 Dank

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland, danke ich ganz besonders herzlich für die grenzenlose Freiheit bei der Gestaltung meiner Doktorarbeit und für seine uneingeschränkte Unterstützung. Durch höchst anregende Diskussionen weckte er meine Begeisterung für chemische Ökologie.

Herrn Prof. Dr. Rainer Beckert gebührt ein ganz besonderer Dank dafür, dass er die Betreuung dieser Arbeit übernahm und mir somit die Promotion an der Friedrich Schiller Universität in Jena ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Konrad Dettner von der Universität Bayreuth danke ich für eine fruchtbare und stimulierende Zusammenarbeit bei der Isolierung der Darmbakterien.

Herrn Dr. Elbert von der BAYER AG bin ich zu Dank verpflichtet, da er die kontinuierliche Versorgung mit *S. exigua*, *S. frugiperga* und *H. virescens* Gelegen veranlasste. Herrn Dr. Horst Bathon von der Biologischen Bundesanstalt in Darmstadt sei für die Gelege von *S. littoralis* und *A. segetum* gedankt.

Herrn Prof. Dr. Karl-Ernst Kaissling und Frau Dr. Corinna Oldenburg danke ich für die Zusammenarbeit bei der Suche nach Metaboliten der Benzoesäure in den Antennen von *B. mori*.

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Rod Dillon und Dr. Keith Charnely von der Bath University für ihre Bemühungen, Raupen steril aufzuziehen.

Herrn Prof. Dr. Massimo Maffei und Simone Bossi von der Universität Turin danke ich für die elektrophysiologischen Untersuchungen der *N*-Acyl-glutaminkonjugate an der Limabohne.

Dr. Georg Pohnert möchte ganz herzlich für Vieles danken: für Volicitin, für Rat und manchmal Kritik, für Hilfe bei den Bis-Wittig Synthesen, für gemeinsame Reparaturen der Massenspektrometer, für kulinarische Köstlichkeiten, fürs Korrekturlesen und vor allem für die Kinoeinladungen in gute und schlechte Filme.

Dr. Jörn Piel sei für 16S-rRNA Analysen der Mikroorganismen, die Kultivierung der Streptomyceten für die Untersuchungen zur Geosminbiosynthese und vielerlei Hilfe und Beratung bei mikrobiologischen Angelegenheiten gedankt.

Birgit Schulze sei besonders herzlich gedankt, dass sie es fertig brachte, mich aus dem Labor zu locken und mir die Schönheit der Natur rund um Jena zu zeigen. Außerdem sei ihr für kritisches Lesen der Arbeit gedankt.

Verena Jung danke ich für die Hilfestellung beim Erlernen des Umganges mit Raupen und die nette Labornachbarschaft.

Grit Winnefeld, unserer Sekretärin, bin ich sehr dankbar, dass sie mir allerlei Zeit- und Nerven-raubende Verwaltungsangelegenheiten abgenommen hat.

Christoph Beckmann danke ich für Diskussionen, seine anregenden Fragen und für Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ryan Lauchli sei für nette amerikanische Abzugsnachbarschaft, Lösungsmittel“verleih“ und language polishing gedankt.

Dr. Andreas Jux gebührt Dank für Fosmidomycin für die Antibiotikaversuche mit *S. frugiperda* Larven und deuteriertes Mevalonat und deuterierte Desoxy-D-xylulose für die Geosminbiosyntheseversuche.

Dr. Stefan Bartram danke ich für Hilfe bei Computerproblemen und Tips und Tricks beim Basteln an defekten Geräten.

Dr. Sabine Thiessen danke ich, dass sie mir das Sezieren von Raupen beibrachte und für ihre große Geduld beim Fotografieren der Raupen.

Angelika Berg kümmerte sich intensiv um die Haltung und Pflege meiner Raupen. Ganz besonders danken möchte ich ihr, dass sie das drohende Chaos im Labor durch Abwaschen unzähliger Kolben erfolgreich bekämpfte.

Anja Biedermann danke ich für die liebevolle Pflege des Lebermooses.

Christiane Schnee danke ich für ihre Bioassays mit *N*-Acyl-aminosäurekonjugaten an Maispflanzen.

Ulrike Krause, Linda Müller, Simone Bieniek und Dr. Werner Marx schulde ich Dank für die prompte Hilfe bei Bibliotheksproblemen und für Literaturrecherchen.

Dr. Neil Oldham möchte ich besonders für die virtuose Erfüllung meiner komplizierteren Messwünsche und die deliziosen Eiskreationen danken. Dr. Ales Svatos danke ich für hochaufgelöste ESI-Massenspektren. Janine Rattke gebührt großer Dank für die Aufnahme der vielen hochaufgelösten Massenspektren.

Dr. Renate Ellinger danke ich für die Aufnahme ungezählter NMR-Proben.

Herrn Dr. Bernd Schneider gilt ein herzliches Dankeschön dafür, dass er mich in die Bedienung des NMR Gerätes einwies.

Bei allen weiteren gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich dafür bedanken, dass sie alle dazubeitrugen, dass ich so gern hier gearbeitet habe: Sven Adolph, Zafar Ahmad, Birgit Baumann, Nicolas Delaroque, Sabine Greiner, Dr. Rita Büchler, Dr. Jürgen Engelberth, Dr. Birte Feld, Dr. Oliver Fietz, Dr. Nathalie Gatto, Dr. Martin Heil, Dr. Dequan Hui, Dr. Thomas Koch, Jürgen Kuhn, Dr. Maritta Kunert, Dr. Andrew Jarvis, Andrea Lehr, Aying Li, Dr. Eva und Klaas Pettersson, Liyang Ping, Dr. Göde Schüler, Dr. Mesmin Mekem Sonwa, Dr. Otmar Schaaf, Dr. Christoph Steinbeck und Thomas Wichard.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und für das Korrekturlesen der Arbeit sehr herzlich danken.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 21.10.2002