

***N*-Fettsäure-Aminosäure-Konjugate und
die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
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 Diplomchemiker
Matthias Funke

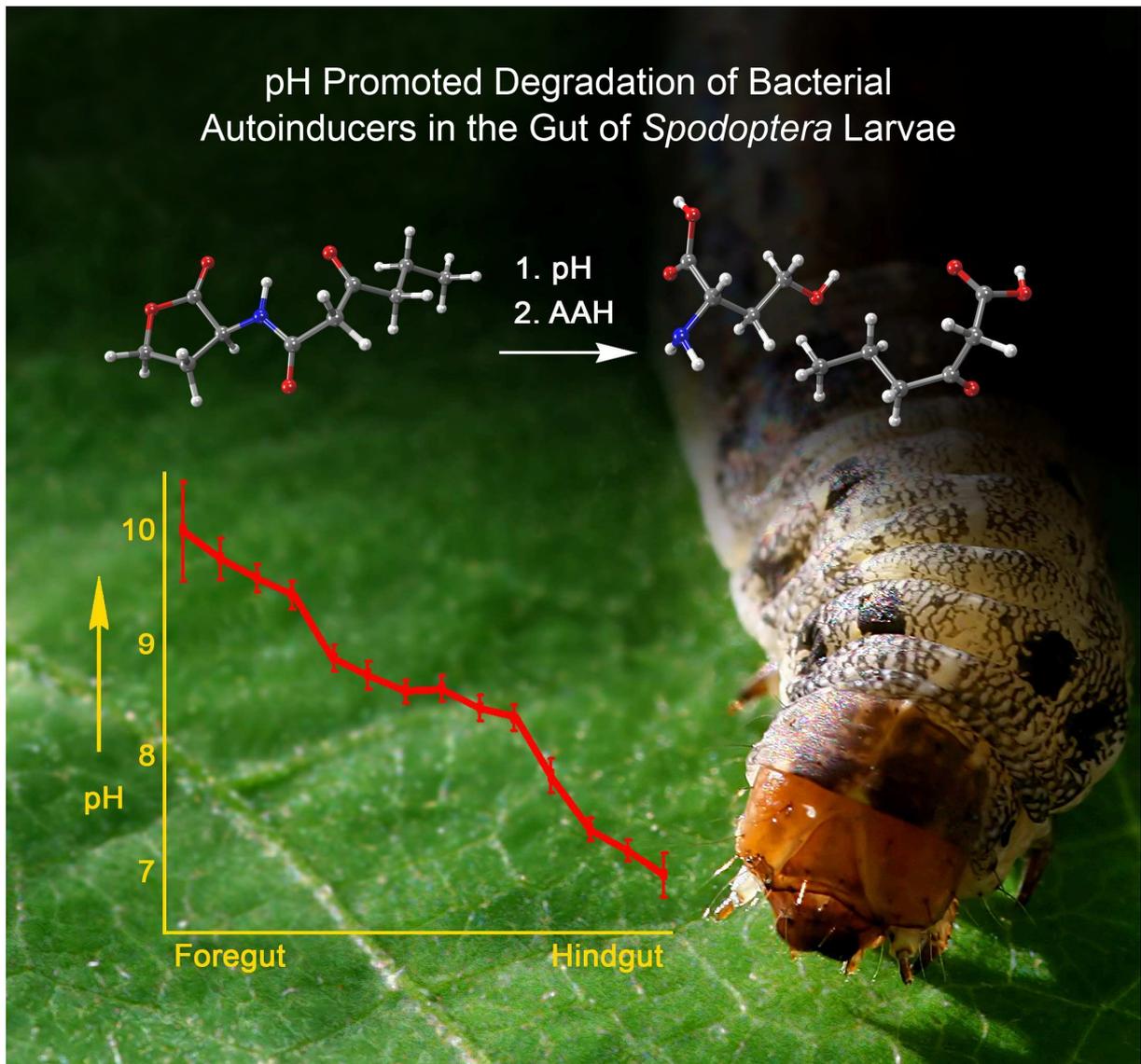
Geboren am 03.07.1979 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Wilhelm Boland
2. Prof. Ernst Anders

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.02.2009

pH Promoted Degradation of Bacterial Autoinducers in the Gut of *Spodoptera* Larvae



Titelgrafik zur Publikation:

„Rapid Hydrolysis of Quorum-Sensing Molecules in the Gut of *Spodoptera* Larvae“

ChemBioChem, 2008, 9, 12, 1953-1959

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Abwehrmechanismen von Pflanzen.....	2
1.2	<i>N</i> -Acylglutamine als Elicitoren der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese.....	7
1.3	Bedeutung der <i>N</i> -Acylglutamine für <i>Spodoptera</i> Larven.....	12
1.4	<i>N</i> -Acylaminosäurekonjugate und Quorum Sensing	13
1.5	8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) – ein Alkaloid im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven	17
2	Aufgabenstellung	20
3	Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.1	Untersuchungen zur Homeostase der <i>N</i> -Acylglutamine im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven	22
3.1.1	Untersuchungen mittels ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie	22
3.1.2	Untersuchungen mittels LC-MS	26
3.2	Synthese hydrolysestabiler <i>N</i> -Acylglutamine.....	29
3.3	Die Hydrolyse von Quorum-Sensing-Molekülen im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven.....	31
3.3.1	Screening von <i>Spodoptera</i> Larven nach <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen	31
3.3.2	Fütterungsstudien	36
3.3.3	<i>N</i> -Acylglutamine als mögliche Inhibitoren des Quorum Sensing.....	37
3.3.4	Analyse des pH-Wertes im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven.....	39
3.3.5	Alkalische Hydrolyse der <i>N</i> -Acylhomoserinlactone	40
3.3.6	Alkalische Hydrolyse von <i>N</i> -(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen	42
3.3.7	Postulat einer Abbaukaskade der <i>N</i> -Acylhomoserinlactone im Insektendarm	43
3.3.8	Screening isolierter Darmbakterien auf die Synthese von <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen	45
3.4	8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) – ein Alkaloid im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven	47

3.4.1	Verbreitung der 8-HChC in Lepidoptera Larven.....	47
3.4.2	Konzentration der 8-HChC im Darm von <i>Spodoptera</i> Larven.....	47
3.4.3	Untersuchungen zur Biosynthese der 8-HChC im Insektendarm.....	49
3.4.4	Untersuchungen zum Einfluss der 8-HChC auf die Verteidigung von Mais ..	56
3.4.5	8-HChC als Siderophor.....	63
3.4.6	Stabilität des Fe(II)-Komplexes unter physiologischen Bedingungen	71
3.4.7	Einfluss der 8-HChC auf Chlorophyll	72
4	Zusammenfassung und Ausblick	75
5	Summary	79
6	Experimenteller Teil	82
6.1	Spektroskopie.....	82
6.2	Chromatografie.....	83
6.3	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	84
6.4	Aufzucht der <i>Spodoptera</i> Larven	86
6.5	Sammeln von Regurgitat	86
6.6	Allgemeine Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen.....	86
6.7	Alkalische Hydrolyse von <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen	87
6.8	Analytik von <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen.....	88
6.9	Reporterorganismen: Kulturbedingungen und Bioassays.....	88
6.10	Isolation von Darmbakterien aus <i>Spodoptera</i> Larven	89
6.11	Duftsammlung mittels Closed-Loop-Stripping.....	89
6.12	Fütterung von Antibiotika	90
6.13	Kristallisation des Komplexes der 8-HChC mit Fe(II).....	91
6.14	Membrandurchlässigkeit des Komplexes	92
6.15	Untersuchungen zur Genexpression von Mais	92
6.16	Synthese von Standardverbindungen.....	96
7	Literaturverzeichnis.....	99
8	Anhang	105
8.1	Spektren	105
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	109

8.3	Tabellen.....	112
8.4	Publikationen und Vorträge	114
8.5	Lebenslauf	115
9	Dank	116

1 Einleitung

Die chemische Ökologie befasst sich mit den Interaktionen verschiedener Organismen auf molekularer Ebene. Um die Bedeutung chemischer Signalstoffe innerhalb eines Ökosystems besser zu verstehen, ist die Erforschung sowohl der chemischen Kommunikation zwischen Organismen einer Art als auch die zwischen verschiedenen Arten, wie z. B. Pflanzen und Insekten, von großem Interesse.

Über erste Erkenntnisse zu Interaktionen zwischen Pflanzen und Insekten berichtet Maria Sybilla Merian (1647-1717). Zeit ihres Lebens sammelte sie eine Vielzahl von Insekten und fand als eine der ersten heraus, dass viele Schmetterlingsarten ganz bestimmte Futterpflanzen haben, auf der diese

ihre Eier ablegen und auf der sie sich auch verpuppen. Sie entgegnete damit der im 17. Jahrhundert vorherrschenden Meinung, bei Insekten handele es sich um „Teufelsgetier, das aus einer Urzeugung aus faulem Schlamm entstehe und sich von Unrat ernähren“. Maria Sybilla Merian veröffentlichte ihre Ergebnisse unter anderem in dem Buch „Der Raupen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung“ (1679-1683) (Abbildung 1).^[1]

Für ihre Verdienste auf dem Gebiet der Insektenforschung wurde sie später mit der Abbildung auf dem 500 DM-Schein geehrt.



Abbildung 1: Deckblatt des Buches: „Der Pflanzen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung von Marie Sybilla Merian^[1]

1.1 Abwehrmechanismen von Pflanzen

Pflanzen haben den vermeintlichen Nachteil, dass sie an ihren Standort gebunden sind und damit nicht vor ihren Feinden flüchten, oder sich vor ihnen verstecken können. Warum wird dann aber nur ein sehr geringer Teil der jährlichen Biomasseproduktion terrestrischer Ökosysteme von Pflanzenfressern konsumiert? Hauptsächlich wird der Bestand von Herbivoren^a durch deren Fraßfeinde begrenzt. Pflanzen haben jedoch im Laufe der Evolution auch eine Vielzahl eigener effizienter Mechanismen entwickelt, um Herbivorenbefall entgegenzuwirken. Dabei unterscheidet man generell mechanische und chemische Verteidigungsstrategien (Abbildung 2).

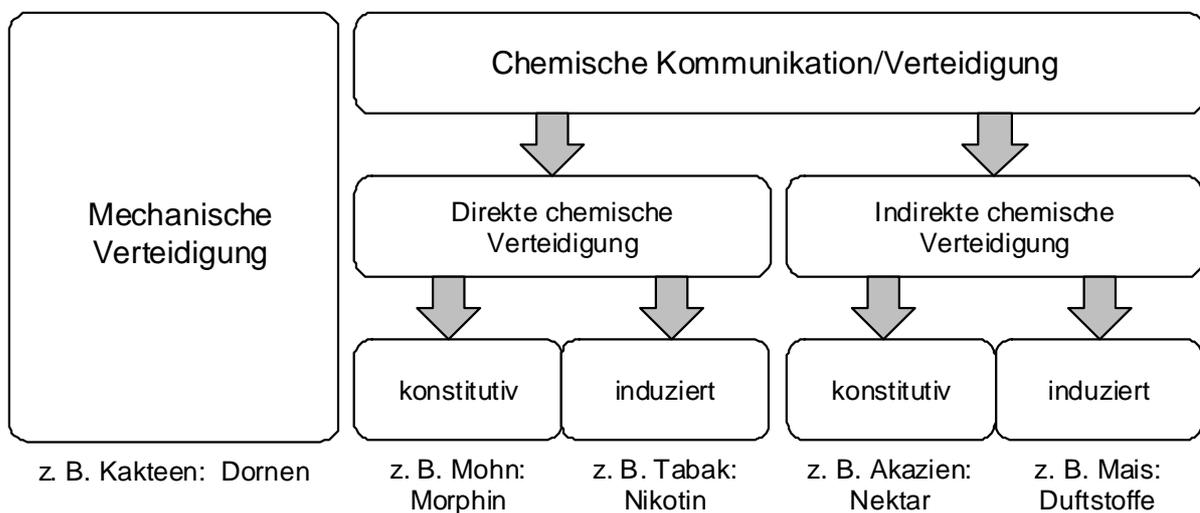


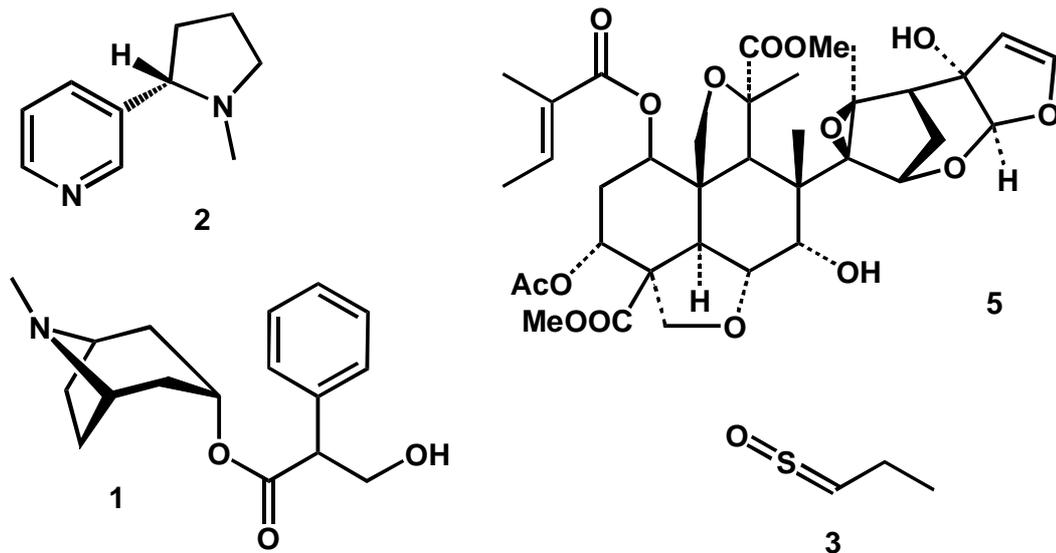
Abbildung 2: Überblick über die vielfältigen pflanzlichen Verteidigungsstrategien, viele Pflanzen kombinieren dabei mehrere Strategien

Beispiele für mechanische Verteidigungsstrategien sind z. B. die Bildung von Dornen,^[2,3] Trichomen^[3] oder ledrigen Blättern, die einen gewissen Schutz vor Herbivorenfraß bieten. Die von Pflanzen eingesetzten chemischen Abwehrstoffe sind in der Regel Produkte des Sekundärmetabolismus. Lange Zeit galten diese als „Abfallprodukte“ des Primärstoffwechsels, oder als „in jedem Fall entbehrlicher Luxus der Schöpfung“. Erst Mitte des letzten Jahrhunderts kam die Idee auf, dass solche Sekundärstoffe,^[4] wie Coumarine, Flavonoide, Terpene, oder Alkaloide, gezielt von Pflanzen zur Verteidigung gegen Fraßfeinde gebildet werden könnten. Man unterscheidet generell direkte und indirekte Arten der chemischen Verteidigung.

^aHerbivor – Pflanzenfresser (lat.: *herba* „Kraut“ und *vorare* „verschlingen“), in dieser Arbeit in der Regel Insektenlarven

Substanzen zur direkten Abwehr können dabei toxische, abschreckende^[3] oder wachstums- und entwicklungshemmende Wirkungen^[3,5] auf Herbivoren haben. Bekannte Alkaloide sind zum Beispiel das sehr toxische Atropin **(1)** der Tollkirsche (*Atropa belladonna*)^[2] (Schema 1) sowie das nicht minder giftige Nicotin **(2)** des Tabaks (*Nicotiana glauca*)^[4,5] (Schema 1), von dem für einen erwachsenen Menschen bei oraler Aufnahme schon 0.88 mg kg^{-1} tödlich sein können.^[6] Andere Pflanzen, wie Hanf (*Cannabis sativa*) und Schlafmohn (*Papaver somniferum*), produzieren Halluzinogene, die vermutlich dem Schutz vor Herbivoren dienen.^[5] Das beim Schneiden von Zwiebeln gebildete, reizende Thiopropanal-S-oxid **(3)** (Schema 1) entsteht, wenn während des Fraßvorgang eine Alliinase mit trans-S-(1-Propenyl)-L-(+)-cysteinsulfoxid **(4)** in Kontakt kommt.^[7] Viele Pflanzen schützen sich durch diese getrennte Lokalisierung der Vorstufen des eigentlichen Giftstoffs und den zu dessen Bildung benötigten Enzymen vor Vergiftungen mit den eigenen Toxinen.^[3] Als letztes besonderes Beispiel für die direkte chemische Verteidigung von Pflanzen gegen Herbivoren sei der Niembaum genannt. Einer von ca. 40 in ihm enthaltenen Abwehrstoffen ist das Azadirachtin **(6)** (Schema 1),^[8] das als universelles Schädlingsbekämpfungsmittel eingesetzt wird.

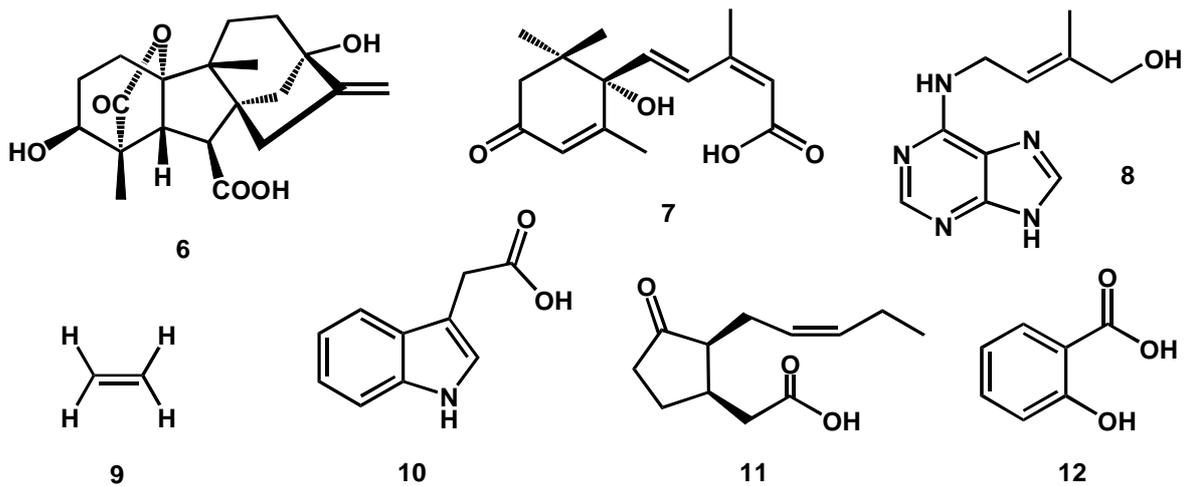
Neben der Bildung von Metaboliten zur direkten Abwehr von Fraßfeinden besitzen viele Pflanzen auch Mechanismen zur indirekten chemischen Verteidigung. Diese haben den Vorteil, dass sich Fraßfeinde nicht an Toxine anpassen können, wie das zum Beispiel bei der Tabakpflanze (*Nicotiana glauca*) der Fall ist. Der amerikanische Tabakschwärmer (*Manduca sexta*) kann dabei das in der Pflanze enthaltene Nicotin **(2)** schneller als andere Arten wieder ausscheiden.^[9] Ein sehr plakatives Beispiel für die indirekte chemische Verteidigung sind Akazien, die durch die Bildung und Exkretion von extrafloralen Nektar Ameisen anlocken, die diesen Nektar als Futterquelle nutzen. Die Ameisen verteidigen die Pflanze im Gegenzug gegen Herbivoren.^[10] Diese Art des Zusammenlebens bezeichnet man auch als obligate Symbiose.



Schema 1: Sekundärmetabolite verschiedener Pflanzen zur Abwehr von Fraßfeinden und Pathogenen: Atropin (**1**) der Tollkirsche, Azadirachtin (**5**) des Niembaum, Nicotin (**2**) aus Tabak, Thiopropanal-S-Oxid (**3**) aus Zwiebelgewächsen

Alternativ zur aufwändigen konstitutiven^a Abwehr durch dauerhafte Produktion der Verteidigungsmetaboliten verwenden viele Pflanzen energie- und ressourcensparende induzierbare Abwehrmechanismen, die erst bei Befall der Pflanze zum Einsatz kommen. Dazu zählen beispielsweise die Bildung von Proteinaseinhibitoren^[11] oder Duftstoffen.^[12,13] Aber auch konstitutive Verteidigungsmechanismen sind teilweise induzierbar. Die Brennnessel bildet beispielsweise Trichome, die beim Fraß eines Herbivoren abbrechen, verschiedene Verteidigungssubstanzen in diesen injizieren und somit vertreiben können. Die nach Verletzung der befallenen Pflanze neu gebildeten Blätter besitzen eine wesentlich höhere Zahl an Trichomen^[3] und bieten so einen stärkeren Schutz gegen Herbivorenfraß. Auch die Tabakpflanze (*Nicotiana glauca*) kann den Gehalt des in den Blättern enthaltenen Nicotins bei Bedarf erhöhen. Während manche Akazienarten kontinuierlich Nektar produzieren, tun dies andere nur bei Herbivorenbefall.^[10]

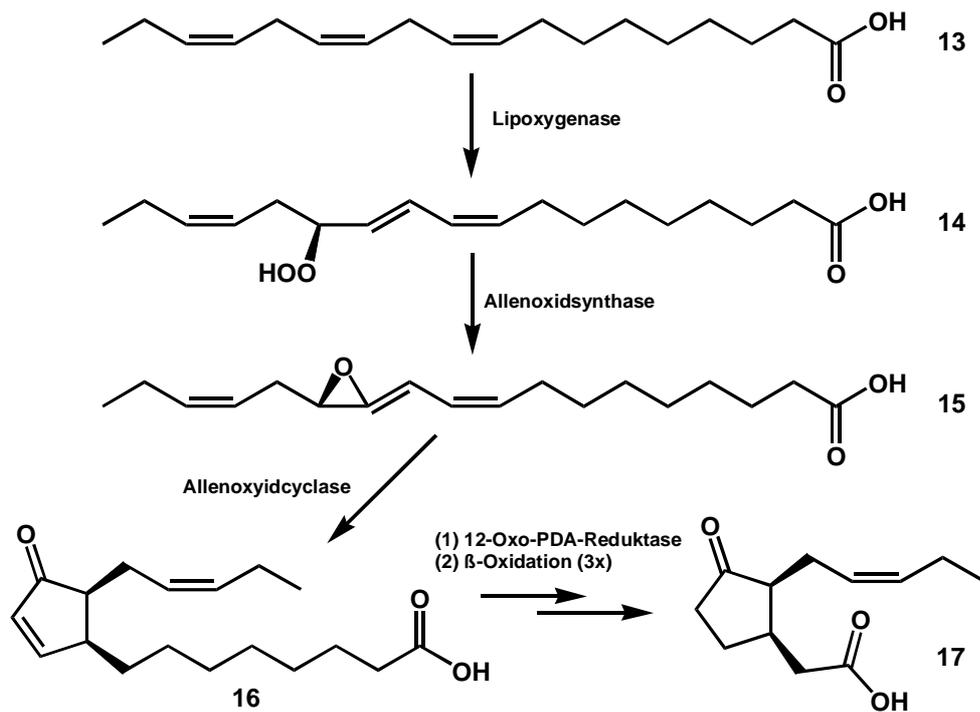
Entwicklungsprozesse von Pflanzen als auch deren Interaktionen mit der Umwelt werden durch sogenannte Phytohormone gesteuert (Schema 2).



Schema 2: Strukturen verschiedener Pflanzenhormone: Gibberellin 1 (**6**), (*S*)-Abscisinsäure (**7**), das Cytokinin Zeatin (**8**), Ethylen (**9**), das Auxin Indol-3-essigsäure (**10**), Jasmonsäure (**11**), Salicylsäure (**12**)

Gibberelline wie das Gibberellin 1 (**6**), Auxine wie Indol-3-essigsäure (**10**) und Cytokinine wie das Zeatin (**8**) fördern das Pflanzenwachstum, während Abscisinsäure (**7**) und Ethylen (**9**) u. a. hemmende Wirkungen besitzen (Schema 2).^[14] Weitere Phytohormone wie Salicylsäure (**12**) und Jasmonsäure (**11**) (Schema 2) sind in die Abwehr von Pathogen- bzw. Herbivorenbefall involviert. Durch das Zusammenspiel verschiedener Transduktionsmechanismen sind Pflanzen in der Lage, spezifisch auf unterschiedliche Schädigungen zu reagieren.

Einer der am intensivsten studierten Signalwege ist dabei der Octadecanoid-Weg (Schema 3). Bei Beschädigung der pflanzlichen Zellmembran wird α -Linolensäure (**13**) aus Phospholipiden freigesetzt. Diese wird zunächst von einer 13-Lipoxygenase zu 13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (**14**) umgesetzt, aus der eine Allenoxydsynthase das entsprechende Allenoxyd bildet. Eine Allenoxydcyclase cyclisiert 12,13-Epoxy-9,11,15-octadecatriensäure (**15**) zu 12-Oxophytodiensäure (12-Oxo-PDA) (**16**). Nach Reduktion durch die 12-Oxo-PDA-Reduktase und anschließender dreifacher β -Oxidation entsteht Jasmonsäure (**17**).^[15,16]



Schema 3: Biosynthese des Phytohormons (3R,7S)-Jasmonsäure (17) aus α-Linolensäure (13)

Jasmonsäure (17) ist ein Pflanzenhormon, das erstmals aus *Lasiodiplodia theobromae* isoliert wurde.^[17,18] Neben Wachstum^[19] und Alterung^[20] steuert sie auch pflanzliche Abwehrreaktionen wie die Bildung von Proteinaseinhibitoren^[11] und die Emission von Duftstoffen.^[21,22] Interessanterweise induzieren auch Vorstufen der Jasmonsäure (17) wie die 12-Oxophytodiensäure (16) pflanzliche Verteidigungsreaktionen.^[23] Aus α-Linolensäure (13) werden neben der Jasmonsäure (17) und deren Derivaten noch eine Vielzahl weiterer biologisch aktiver Oxylipine gebildet.^[24-26]

1.2 *N*-Acylglutamine als Elicitoren^b der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese

Ein komplexes Beispiel der induzierbaren Pflanzenabwehr, in die auch die Jasmonsäure (17) involviert ist, ist die tritrophische Interaktion von *Spodoptera* Larven, Maispflanzen und parasitären Schlupfwespen.^[27] Frisst eine Raupe der Gattung *Spodoptera* an einer Maispflanze, so reagiert diese darauf mit einem Arsenal verschiedenster Abwehrreaktionen, unter anderem mit der Biosynthese und Emission verschiedener Duftstoffe. Diese locken wiederum Schädlinge der Raupen, z. B. parasitäre Schlupfwespen (*Cotesia marginiventris*) an, die ihre Eier in die Raupen legen.^[12,13] Die geschlüpften Larven der Wespen nutzen die Raupe als Futterquelle, wodurch diese verendet und die Pflanze nicht länger attackieren kann (Abbildung 3). Die Wespen können bei der Wahrnehmung der emittierten Duftstoffe genau differenzieren, welche Insekten an der Pflanze fressen, da diese durch ihren Fraß die Emission unterschiedlicher Duftmuster induzieren.^[27]

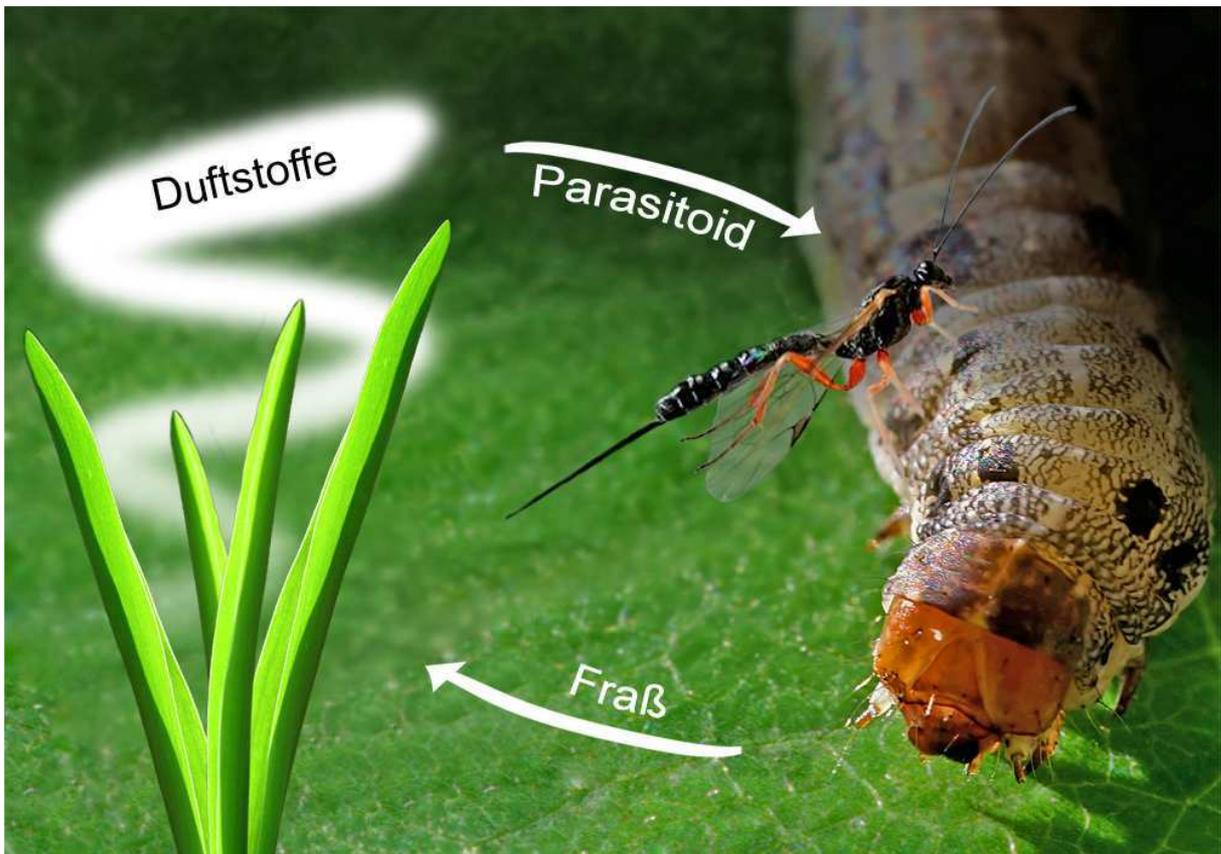


Abbildung 3: Tritrophische Interaktion zwischen Maispflanzen, *Spodoptera* Larven und parasitären Schlupfwespen

^bElicitor – Auslöser spezifischer Reaktionen in einem Organismus

Durch das Saugen von Spinnmilben an Limabohnen (*Phaseolus lunatus*) werden z. B. Duftstoffe emittiert, die Raubmilben der Gattung *Phytoseilus persimilis* anlocken.^[28] Außerdem konnte gezeigt werden, dass die einer befallenen Pflanze benachbarten Pflanzen auf deren Duftstoffemission mit der Aktivierung der eigenen Abwehr reagieren („Priming“).^[29-31] Die Emission von Duftstoffen bezeichnet man allgemein auch als „molekularen Hilferuf“ der Pflanze.

Maispflanzen reagieren auf Herbivorenbefall mit der Emission verschiedenster Duftstoffe (Abbildung 4).^[32] Neben sogenannten „Green-Leaf-Volatiles“ wie z. B. Hexenylacetat (**18**) wird eine Vielzahl verschiedener Terpene gebildet. Dazu zählen z. B. das Monoterpen Linalool (**19**) sowie verschiedene Homoterpene, wie 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) (**20**) und 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) (**21**). Neben aromatischen Verbindungen wie Indol (**22**) wurden auch die Sesquiterpene Caryophyllen (**23**), Bergamoten (**24**), Farnesen (**25**) und Bisabolen (**26**) detektiert.

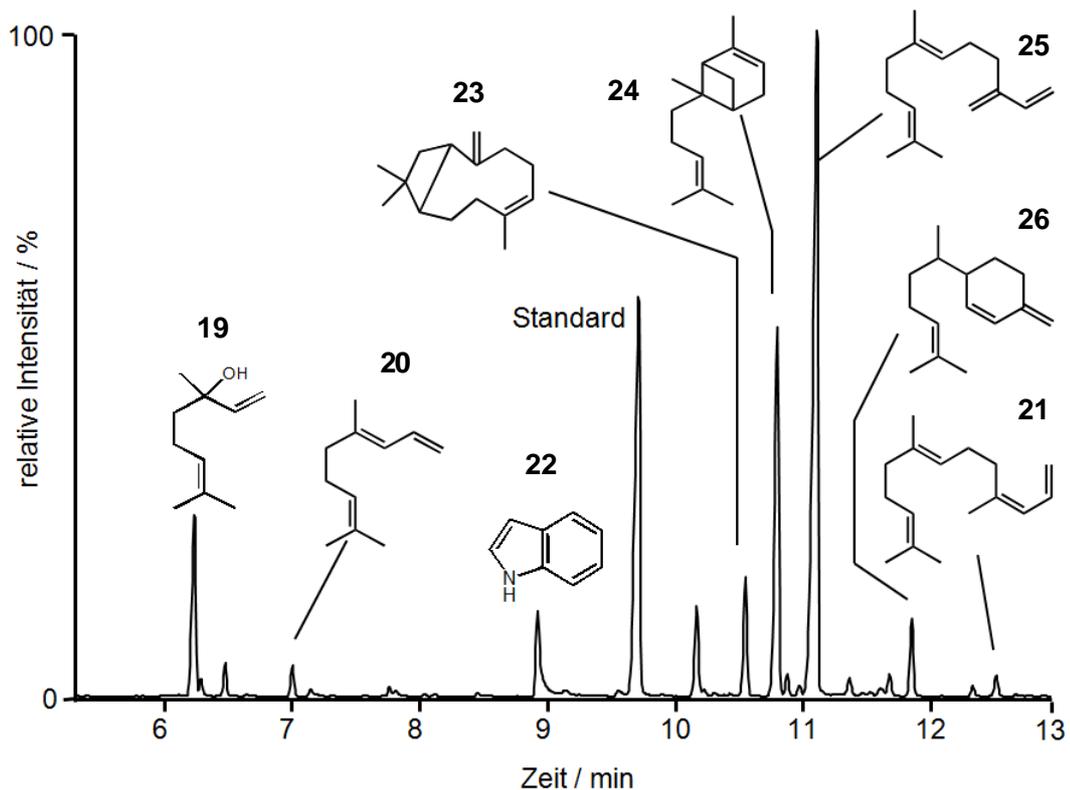
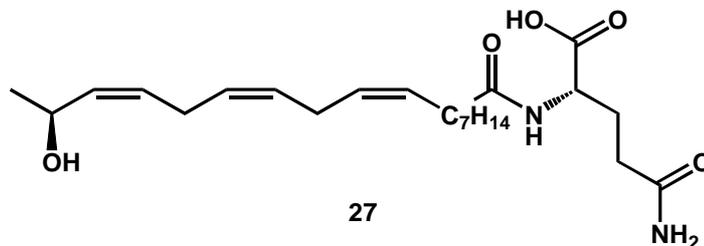


Abbildung 4: Gaschromatogramm[°] des typischen Duftspektrums einer Maispflanze, induziert durch 24stündige Inkubation mit *N*-Linolenoylglutamin

[°]Sammlung der Duftstoffe via Closed Loop Stripping; GC-MS Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0,25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 1.5 ml min⁻¹; Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, 10 °C min⁻¹ 200 °C, 30 °C min⁻¹, 280 °C 1 min; Injektortemperatur 220 °C; Split: 1 :10

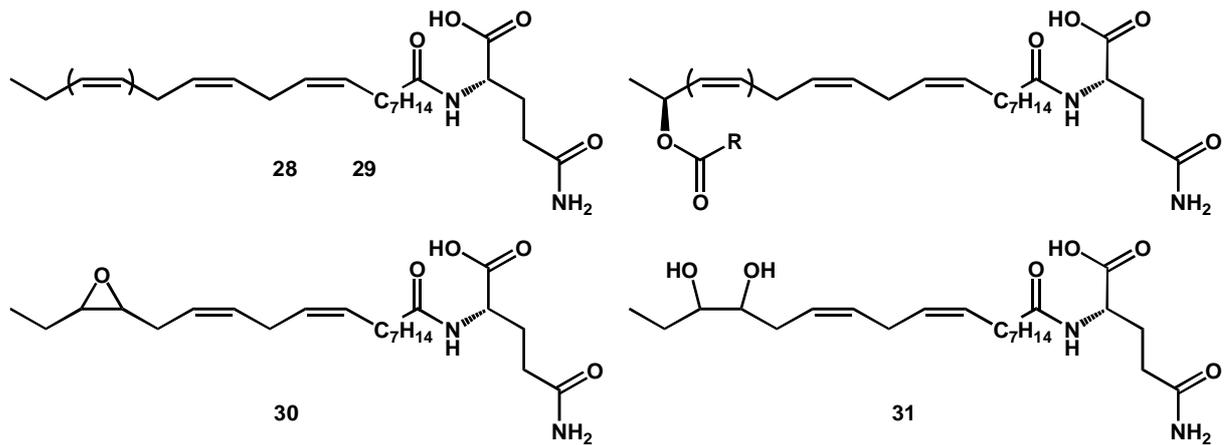
Woher „weiß“ eine Pflanze aber nun, dass sie von einer Raupe befallen wurde? Im Regurgitat^d diverser *Spodoptera* Arten befindet sich eine Vielzahl unter anderem durch Darmbakterien produzierter *N*-Acylglutamine^e.^[27] Diese *N*-Fettsäure-Aminosäure gelangen beim Fraß der Raupen in das Blatt und lösen dort verschiedene Reaktionen aus. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die *N*-Acylglutamine in den Blättern der Limabohnen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen.^[33] Da Pflanzen die Regulation von Calciumionenflüssen zur Signaltransduktion nutzen, liegt ein Einfluss auf die pflanzliche Verteidigung nahe. An Maispflanzen konnte nachgewiesen werden, dass die *N*-Acylglutamine eine Signalkaskade auslösen, die unter anderem zur Biosynthese und Emission der beschriebenen Duftstoffe (Abbildung 4) führt.^[34,35] Auch hierbei dürften Calciumionenflüsse eine entscheidende Rolle spielen.^[36-38] Der erste Vertreter der *N*-Acylglutamine, der als Elicitor der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese entdeckt wurde, ist das Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-glutamin) (**27**) (lat. *volatilis* - flüchtig, *elicere* – erregen, Schema 4).^[39] Neben Volicitin (**27**) wurde im Darm eine große Vielfalt weiterer *N*-Acylglutamine nachgewiesen (Schema 5).^[40,41,42]



Schema 4: Strukturformel von Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-glutamin) (**27**) aus dem Darm von *Spodoptera* Larven, einem Elicitor der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese bei Maispflanzen

^dRegurgitat – Vorderdarminhalt von Schmetterlingslarven

^eSämtliche in dieser Arbeit behandelten *N*-Acylglutamine verstehen sich als Derivate von L-Glutamin



Schema 5: Strukturformeln weiterer *N*-Acylglutamine aus *Spodoptera* Larven: *N*-Linolenoylglutamin (**28**), *N*-Linoleoylglutamin (**29**), verschiedene *N*-(17-Acyloxylinolenoyl)-glutamine und *N*-(17-Acyloxylinoleoyl)-glutamine, *N*-(15,16-Epoxylinoleoyl)-glutamin (**30**), *N*-(15,16-Dihydroxylinoleoyl)-glutamin (**31**)

Neben unsubstituierten *N*-Acylglutaminen wie z. B. *N*-Linolenoylglutamin (**28**)^[41] oder *N*-Linoleoylglutamin (**29**)^[41] wurden ebenfalls *N*-(17-Acyloxyacyl)-glutamine gefunden^[42]. Aber auch *N*-(15,16-Epoxylinoleoyl)-glutamin (**30**)^[42] und *N*-(15,16-Dihydroxylinoleoyl)-glutamin (**31**)^[42] konnten bestimmt werden (Schema 5).

Wie aber lösen die *N*-Acylglutamine die pflanzliche Duftstoffbiosynthese aus? Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass im Mais enthaltene Plasmamembranproteine in der Lage sind, *N*-Acylglutamine zu binden. Diese Beobachtung deutet auf eine rezeptorgebundene Induktion der Duftstoffbiosynthese bei Mais hin^[43] (Abbildung 5). Ein weiterer möglicher Ansatz beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit der *N*-Acylglutamine zu den Lipiden der pflanzlichen Zellmembranen. Versuche mit Modellmembranen aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycerophosphocholin (DPPC) (**31**) legen nahe, dass die *N*-Acylglutamine aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in der Lage sind, in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen einzudringen und damit deren Hyperstruktur zu stören. Dadurch würde sich das Membranpotential verändern und eine Reizweiterleitung erfolgen, die die Verteidigung der Pflanze induzieren könnte.^[44]

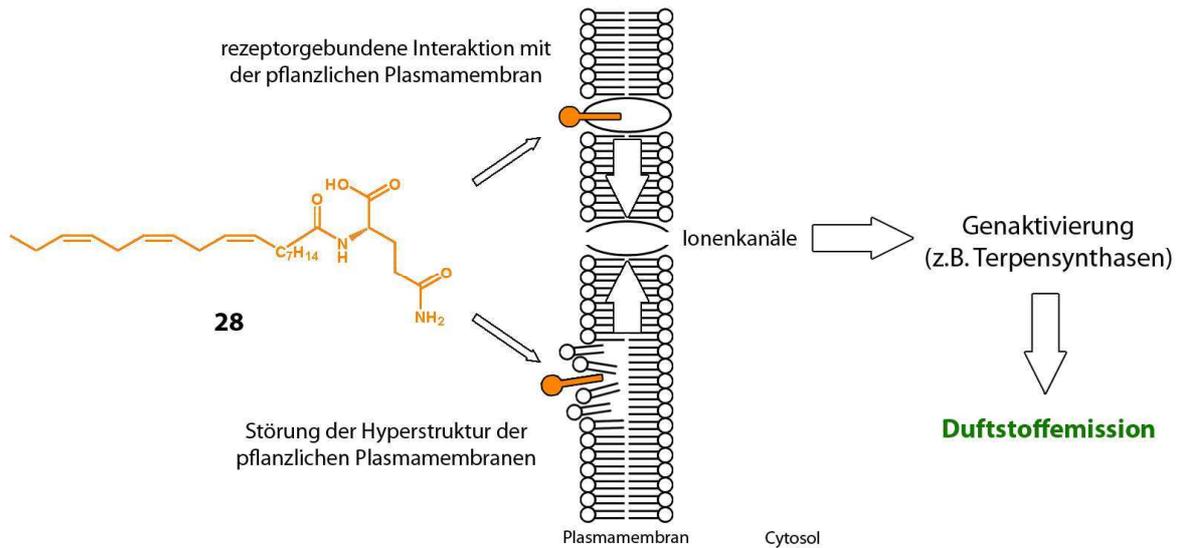


Abbildung 5: Möglicher Wirkmechanismus der *N*-Acylglutamine als Elicitoren der pflanzlichen Duftstoffbiosynthese

Neben den *N*-Acylglutaminen selbst wäre auch die biologische Wirksamkeit der jeweiligen Fett- bzw. Aminosäure denkbar. α -Linolensäure (**13**) wird in der Pflanze zum Phytohormon Jasmonsäure (**17**) derivatisiert^[15,16] (Schema 3). Da *N*-Linolenoylglutamin (**28**) im Fall von Mais einer der effektivsten Elicitoren der Duftstoffbiosynthese ist, wäre die Hydrolyse des Konjugats und die Derivatisierung der dabei gebildeten α -Linolensäure (**13**) zur Jasmonsäure (**17**) denkbar. Jedoch konnten Baldwin *et al.* bereits zeigen, dass dieser Effekt keine Rolle spielt.^[45] Die Aminosäure Glutamin (**33**) konnte ich bereits während meiner Diplomarbeit als Elicitor der Duftstoffbiosynthese von Mais ausschließen.

1.3 Bedeutung der *N*-Acylglutamine für *Spodoptera* Larven

N-Acylglutamine sind im Darm von *Spodoptera* Larven in relativ hohen Konzentrationen (z. B. *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ca. $100 \mu\text{g ml}^{-1}$)^[42] und großer Vielfalt vorhanden. Durch die polare Kopfgruppe des Glutamins (**33**) und die unpolare Kohlenstoffkette des Fettsäurerestes stellen sie Biotenside dar. Da Insekten nicht wie Säuger in der Lage sind, Gallenflüssigkeit als Nahrungsemulgatoren zu produzieren,^[46] wird vermutet, dass die *N*-Acylglutamine im Darm der Raupe dazu dienen, Nahrungsfette zu emulgieren und damit deren Verdauung zu unterstützen.^[42] Als weiterer möglicher Nutzen der *N*-Acylglutamine für die Raupe wird die Verwendung in der Verteidigung gegen Fraßfeinde diskutiert. Bei Gefahr zeigen *Spodoptera* Larven ein ganz spezifisches Abwehrverhalten. Sie würgen ihr Regurgitat hervor (Abbildung 6) und bewegen sich dabei schnell hin und her. Versuche mit *Spodoptera frugiperda* Larven haben gezeigt, dass angreifende Ameisen, die mit dem Regurgitat benetzt wurden, von der Raupe ablassen und beginnen, sich ausgiebig zu reinigen.^[47] Aufgrund der durch die *N*-Acylglutamine verursachten Verringerung der Oberflächenspannung des Wassers perlt das Regurgitat nicht von den Antennen der Ameisen ab und diese verlieren die Orientierung.



Abbildung 6: *Spodoptera exigua* Larve beim Hervorwürgen eines Tropfens Regurgitat

1.4 *N*-Acylaminosäurekonjugate und Quorum Sensing

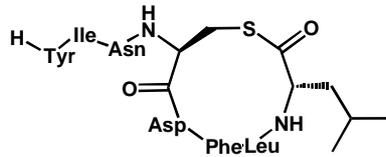
Als Quorum Sensing bezeichnet man die Kommunikation zwischen Bakterien einer Art basierend auf niedermolekularen Verbindungen, sogenannten Autoinducern. Durch Quorum Sensing werden zelllichteabhängige Prozesse gesteuert, die bei geringer Zelldichte ineffektiv wären. Dazu zählen z. B. Biolumineszenz,^[48] Biofilmbildung,^[49] oder die Sekretion von Antibiotika^[50] bzw. Toxinen.^[51] Jede Bakterienart besitzt dabei spezifische Kommunikationsmoleküle. Während Gram-positive Bakterien vor allem peptidartige Autoinducer oder γ -Butyrolactone nutzen,^[52] wird die Kommunikation Gram-negativer Bakterien vorwiegend über *N*-Acylhomoserinlactone^[53] gesteuert (Schema 6). Weiterhin sind auch Chinolinone^[54] und Furanoborester^[55] bekannt (Schema 6). *N*-Acylhomoserinlactone werden auch Autoinducer 1 (AI 1) genannt, die Furanoborester bezeichnet man als Autoinducer 2 (AI 2).

Jede Bakterienart, die über *N*-Acylhomoserinlactone zelllichteabhängige Prozesse steuert, produziert dafür spezifische Derivate, die sich vor allem in der Länge der Fettsäurekette und deren Substitution in β -Position unterscheiden (Schema 6).^[53] Dies dürfte auch der Grund für die große Vielfalt dieser Verbindungsklasse sein.

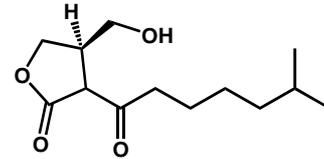
Das Prinzip des Quorum Sensing beruht auf der ständigen Produktion und Abgabe von Autoinducern in das umgebende Medium. Bei geringer Zelldichte der Bakterien ist auch die Konzentration der abgegebenen Autoinducer im umgebenden Medium gering, da diese sich durch Diffusion verdünnen. Wächst hingegen die Zelldichte, steigt auch die Konzentration der Autoinducer im Medium an. Ist eine bestimmte Grenzkonzentration, das sogenannte „Quorum“, erreicht, diffundieren die Autoinducer zurück in das Bakterium und binden dort an spezifische Rezeptoren. Der Rezeptor-Autoinducer-Komplex reguliert die Expression weiterer Gene, die die Emission von Licht,^[48] die Produktion von Farbstoffen^[56] oder Antibiotika^[50] regulieren.

Vibrio fischeri ist der erste in den 1970er Jahren entdeckte Vertreter Gram-negativer Bakterien, der *N*-Acylhomoserinlactone zur intraspezifischen Kommunikation produziert^[48]. *Vibrio fischeri* kommt als marines Bakterium in allen Weltmeeren in geringen Konzentrationen vor, lebt aber vor allem in Symbiose mit verschiedenen Organismen wie z. B. dem Anglerfisch oder bestimmten Kalmaren^[57]. *Vibrio fischeri* bildet *N*-(3-Oxoheptanoyl)-homoserinlacton (**34**), durch das die Biolumineszenz der

Gram-positive Bakterien

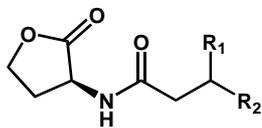


AIP Oligopeptid (35)
Staphylococcus aureus

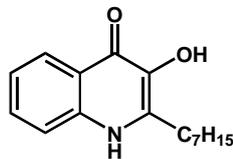


γ -Butyrolactone (36)
Streptomyces griseus

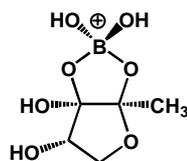
Gram-negative Bakterien



N-Acylhomoserinlactone

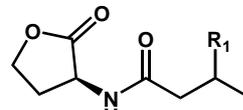


2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolinon (37)
Vibrio harveyi

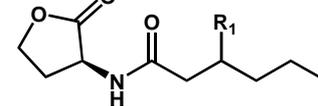


Foranoborester (38)
Vibrio harveyi

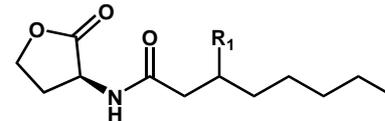
R = H (39)
R = OH (40)
R = O (41)



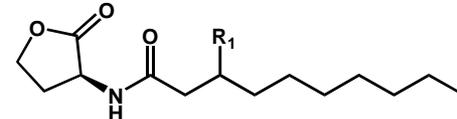
R = H (42)
R = O (34)



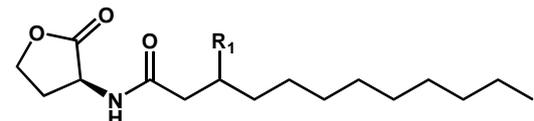
R = H (43)
R = O (44)



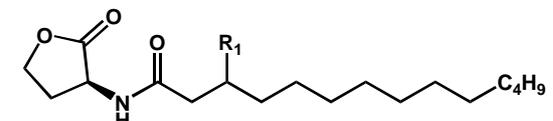
R = H (45)
R = O (46)



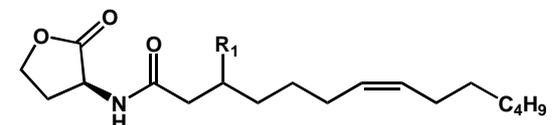
R = H (47)
R = O (48)



R = H (49)
R = O (50)



R = H (51)
R = OH (52)
R = O (53)



Schema 6: Übersicht über Quorum-Sensing-Moleküle: Oligopeptide und γ -Butyrolactone Gram-positiver Bakterien, *N*-Acylhomoserinlactone (AI 1), Chinolinone und Furanoborester (AI 2) Gram-negativer Bakterien

Bakterien reguliert wird.^[48] Diesen Effekt nutzen oben genannte Tiefseeorganismen zum Beutefang. Im Gegenzug werden die Bakterien vom Wirt mit Nährstoffen versorgt.

Wie Abbildung 7 zeigt, sind verschiedene Gene in den Prozess des Quorum Sensing involviert.^[58] Das Gen *luxI* kodiert für eine *N*-Acylhomoserinlacton-Synthase, die die Synthese des Autoinducers *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) steuert. Das Gen *luxR* hingegen kodiert das entsprechende Rezeptorprotein und induziert die Transkription des *luxICDABE*-Operons, indem der LuxR-AHL-Komplex an spezifische Sequenzen im Promotorbereich bindet. *LuxA* und *luxB* kodieren dabei die α - und β -Untereinheiten einer Luciferase, in der die Biolumineszenzreaktion erfolgt. *LuxC*, *luxD* und *luxE* kodieren Teile einer Säurereductase, die Tetradecansäure (**54**) in den entsprechenden Aldehyd umwandeln. Dieses Tetradecanal (**55**) wird von der Luciferase als Substrat für die Biolumineszenzreaktion benötigt.^[59]

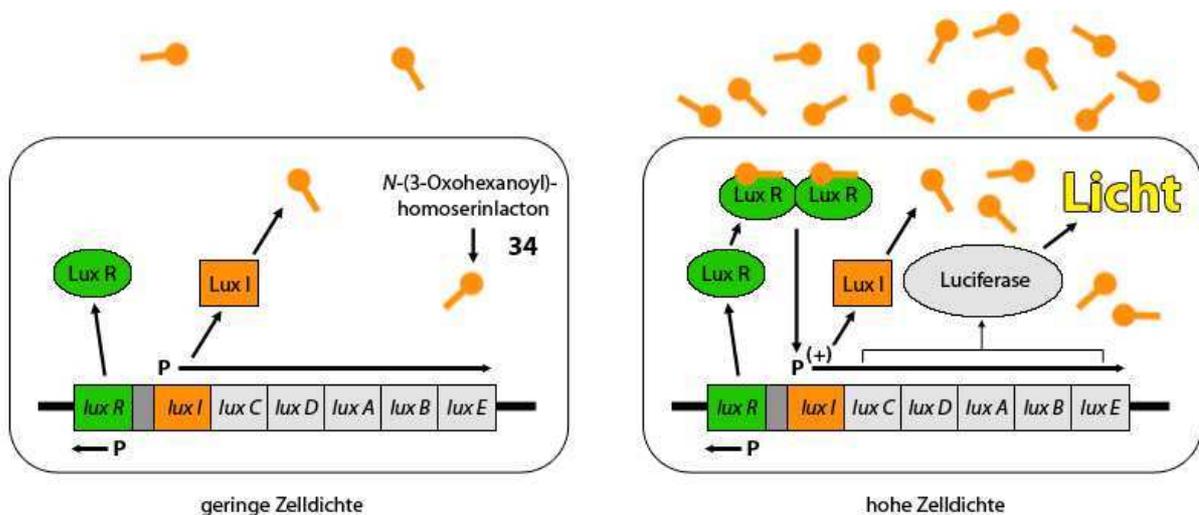


Abbildung 7: Prinzip des Quorum Sensing und die Beteiligung verschiedener Gene am Beispiel von *Vibrio fischeri*

Ein weiteres Beispiel für Quorum Sensing regulierte Prozesse ist die Bildung des Farbstoffes Violacein (**56**) bei *Chromobacterium violaceum*.^[56] Violacein (**56**) wird aus je zwei Molekülen Tryptophan (**57**) gebildet und dient der Zelle zum Schutz vor UV-Strahlung sowie der Regulierung der Tryptophan-Konzentration.^[56] Der hierbei genutzte Autoinducer ist *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**).

Bei dem im Labor eingesetzten Biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 zum Nachweis von *N*-Acylhomoserinlactonen wurde das Gen zur Bildung der *N*-Acylhomoserinlactone deaktiviert. Da die Funktion der Gene zur Detektion der Autoinducer jedoch unbeeinflusst ist, kann dieser Mutant als Biosensor zur Detektion von *N*-Acylhomoserinlactonen genutzt werden. Da der Farbstoff Violacein (**56**) eine sehr intensive violette Farbe besitzt, kann man *N*-Acylhomoserinlactone bereits in Mengen ab 5 pmol detektieren.

Die bakterielle Synthese von Biotensiden, wie sie z. B. auch die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen *N*-Acylglutamine aus dem Darm von *Spodoptera* Larven darstellen, wird ebenfalls durch Quorum Sensing gesteuert.^[60] Da die *N*-Acylglutamine zumindest teilweise von Darmbakterien synthetisiert werden.^[42] ist ein Zusammenhang mit dem Quorum Sensing theoretisch denkbar.

1.5 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) – ein Alkaloid im Darm von *Spodoptera* Larven

Im Darm von *Spodoptera* Larven gibt es eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen. Neben den bereits beschriebenen *N*-Acylglutaminen wurde auch die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) (**58**) gefunden.^[42] Diese wurde in Insekten erstmals 1969 aus dem Wehrsekret des Schwimmkäfers *Ilybius fenestratus* isoliert.^[61] Das verwandte 8-Hydroxychinolin (**59**) wird im Labor aufgrund seiner guten Eigenschaften als Chelator zur quantitativen Analyse von Mg^{2+} -Ionen verwendet. Durch die zusätzliche Carboxylfunktion sollte die 8-HChC (**58**) noch besser als Chelator für Metallionen geeignet sein. Möglicherweise spielen deren Komplexbildungseigenschaften auch bei der Interaktion zwischen Raupe und Futterpflanze eine wichtige Rolle. Denkbar ist auch die selektive Komplexierung und der Transport bestimmter Ionen im Darm. Da 8-Hydroxychinolin (**59**) auch antibakterielle Eigenschaften aufweist,^[61] könnte man dies auch bei der 8-HChC (**58**) vermuten.

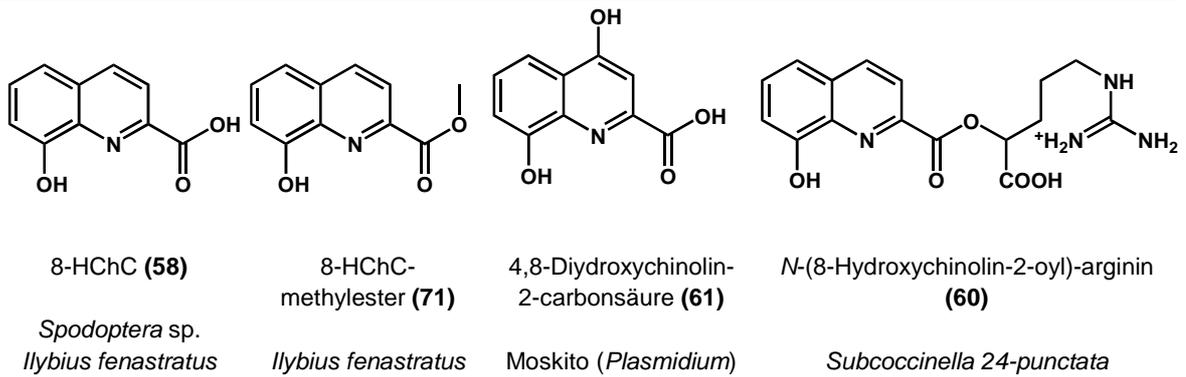
Neben *Spodoptera* Larven^[42] und Schwimmkäfern^[61] findet man Chinolinderivate auch in anderen Insekten (Schema 7). So wurde z. B. im Wehrsekret des 24-Punktmariekäfers *Subcoccinella 24-punctata* *N*-(8-Hydroxychinolin-2-oyl)-L-arginin (**60**) isoliert.^[63] In Moskitos konnte gezeigt werden, dass die 4,8-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure (**61**) (Xanthurensäure) in die sexuelle Phase des Malaria-Erregers *Plasmodium berghei* involviert ist.^[64]

Auch Bakterien synthetisieren verschiedene Chinolinderivate. Neben der 3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**62**) von *Streptomyces griseoflavus*^[65] findet man bei *Streptomyces laurentii* 4-(1-Hydroxyethyl)-chinolin-2-carbonsäure (**63**), die als Vorstufe des Antibiotikums Thiostrepton dient.^[66] *Pseudomonas vesicularis* bildet 5-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**64**) als Dead-End-Metabolit.^[67]

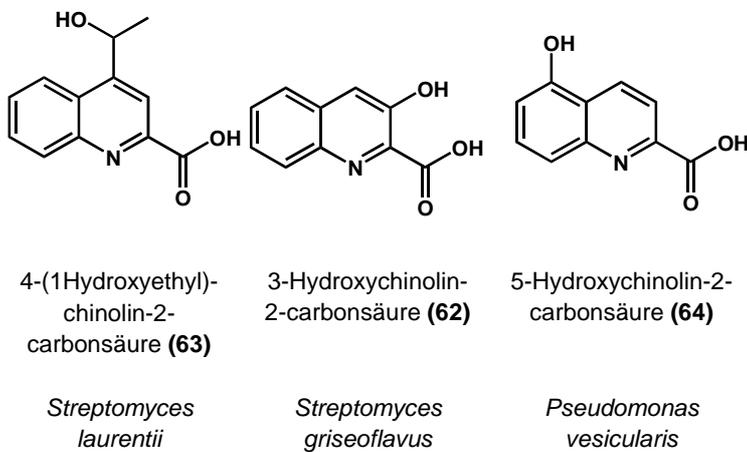
Als Chinolinderivate mariner Organismen seien die Tridemsäure (**65**)^[68] sowie Pespicamid A (**66**) und B (**67**)^[69] verschiedener Seescheiden-Arten erwähnt. Aus dem Kaktusschwamm *Dendrilla membranosa* wurde 4,5,8-Trihydroxychinolin-2-carbonsäure (**68**) isoliert.^[70]

^fDead-End-Metabolit – Stoffwechselendprodukt ohne Funktion

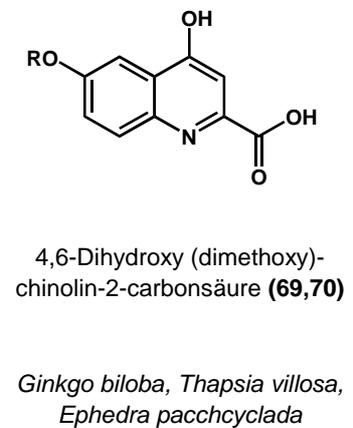
Insekten



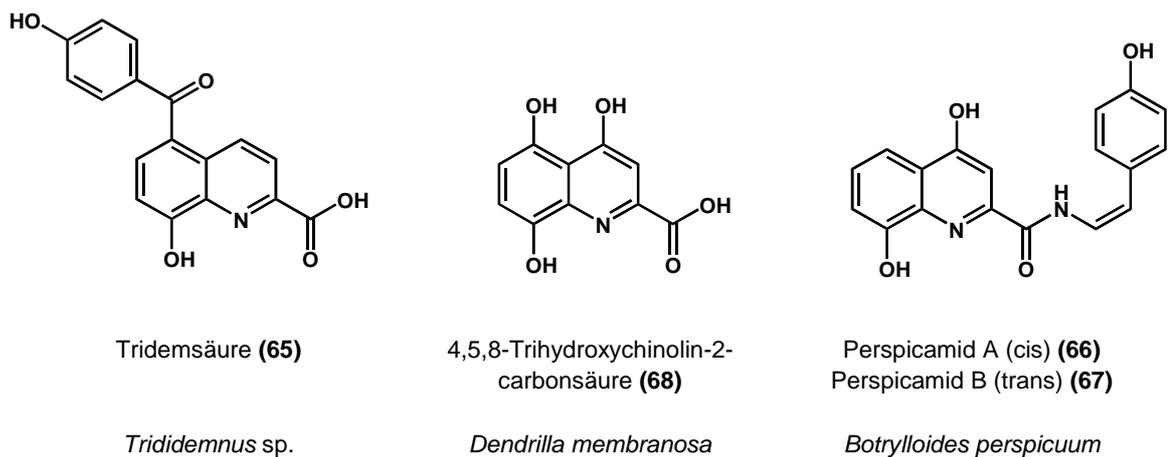
Microorganismen



Pflanzen



Marine Organismen



Schema 7: Übersicht über Chinolin-2-carbonsäurederivate in Insekten, Bakterien, Pflanzen und marinen Organismen

Auch aus Pflanzen sind Chinolinderivate bekannt. Dort findet man vorwiegend verschiedene 4-Hydroxychinolin-2-carbonsäurederivate (Kynurensäuren), wie die 4,6-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure (**69**) aus *Ginkgo biloba*,^[71] *Thapsia villosa*^[72] oder *Nicotiana tabacum*^[73] sowie die 4,6-Dimethoxychinolin-2-carbonsäure (**70**) aus *Ephedra pachyclada*, einem Meerträubelgewächs^[74].

Die beschriebenen Chinolin-2-carbonsäurederivate dienen den jeweiligen Organismen zu sehr unterschiedlichen Zwecken. Daher lässt sich für die 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven zunächst keine potentielle Funktion ableiten. Es fällt jedoch auf, dass bei keinem der genannten Derivate explizit deren Einsatz als Chelatoren für Ionen beschrieben wird. In anderen Lepidoptera Spezies wurden bisher keine Chinolinsäurederivate gefunden.

2 Aufgabenstellung

Pflanzen haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Verteidigungsmechanismen gegen Umwelteinflüsse wie Herbivorenbefall, aber auch gegen Pathogene wie Bakterien oder Pilze entwickelt.^[16,18,23,75] Das Phytohormon Jasmonsäure (**17**) spielt bei solchen Abwehrreaktionen eine zentrale Rolle und ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Studien. Es steuert beispielsweise die Duftstoffemission von Maispflanzen, die als molekularer Hilferuf der Pflanze zur Anlockung von Prädatoren der Herbivoren genutzt wird.^[39] Während der Erforschung solcher Mechanismen wurden zunächst die beteiligten Verbindungen identifiziert und im Anschluss deren Bildung und Regulation. Heute ist auch viel über die beteiligten Enzyme bzw. Gene bekannt.^[76,77] Es fügen sich also nach und nach verschiedenste Mosaiksteine zu einem komplexen Netzwerk pflanzlicher Signalprozesse zusammen.

Mittlerweile weiß man, dass während des Fraßvorgangs herbivorer Insekten an Pflanzen durch das Regurgitat hoch- und niedermolekulare Verbindung und über das Salivarsekret Enzyme in die Pflanze gelangen und dort eine Vielzahl von Reaktionen auslösen. So konnte zum Beispiel bei Tabakpflanzen gezeigt werden, dass Raupen durch eine Glucoseoxidase die Menge an toxischem Nikotin (**2**) im Blatt stark reduzieren können.^[78] Des Weiteren schützen sich manche Raupen durch große Mengen an Glycin (**72**) im Darm gegen pflanzliche Iridoide.^[79] Neben den für Insektenlarven nützlichen Verbindungen enthält das Regurgitat von Raupen jedoch auch Stoffe, die für diese von Nachteil sein können. So sind beispielsweise die *N*-Acylglutamine aus dem Regurgitat von *Spodoptera* Larven in die Induktion der Duftstoffbiosynthese von Mais involviert. Das Regurgitat enthält jedoch auch aromatische Verbindungen wie die 8-HChC (**58**), deren biologische Aktivität im Bezug auf eine mögliche Interaktion mit den Futterpflanzen der Raupen noch völlig ungeklärt ist.^[42] Auch über deren möglichen Nutzen für die Raupe selbst ist bisher nichts genaueres bekannt.

Ziel dieser Doktorarbeit sollte sein, bekannte Verbindungen aus *Spodoptera* Larven hinsichtlich ihres Stoffwechsels im Darm zu lokalisieren und deren biologische Aktivität im Hinblick auf mögliche Insekten-Pflanzen-Interaktionen oder auch deren direkten Nutzen für die Raupen selbst genauer zu untersuchen. Des Weiteren sollte

das Regurgitat auf die Präsenz bisher unbekannter niedermolekularer Verbindungen untersucht werden.

Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

- In welchen Darmabschnitten findet die Homeostase⁹ der *N*-Acylglutamine in *Spodoptera* Larven statt. Werden die *N*-Acylglutamine und deren Hydrolyseprodukte recycled oder ausgeschieden?
- Die Untersuchung verschiedener Fragestellungen bezüglich der *N*-Acylglutamine machte ein hydrolysestabiles Konjugat erforderlich. Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden. Ein solches Konjugat würde eine wichtige Rolle in der Untersuchung der in die Homeostase der *N*-Acylglutamine involvierten Enzyme spielen. Des Weiteren wäre es als interner Standard in der Analytik von *N*-Acylglutaminen im Regurgitat von Wert.
- Findet man im Darm von *Spodoptera* Larven auch weitere *N*-Fettsäure-Aminosäure-Konjugate? Im Laufe der Untersuchungen des Regurgitats stellte sich heraus, dass die bei Gram-negativen Bakterien als Quorum-Sensing-Moleküle weit verbreiteten *N*-Acylhomoserinlactone trotz der Präsenz Gram-negativer Bakterien im Darm nicht nachweisbar sind. Existieren spezifische Abbaumechanismen für *N*-Acylhomoserinlactone und welches Interesse hätten *Spodoptera* Larven, Quorum Sensing im Darm zu unterbinden?
- Wie weit ist die 8-HChC (**58**) unter Lepidopteren verbreitet? Welche Konzentrationen dieser Verbindung findet man im Darm? Gibt es Konzentrationsunterschiede entlang des Darms und in Abhängigkeit vom Alter der Raupen?
- Wo ist der Ursprung der 8-HChC (**58**) im Darm zu suchen? Wird die Verbindung durch die Pflanzennahrung aufgenommen oder wird sie im Darm synthetisiert? Spielen Mikroorganismen bei einer möglichen Biosynthese im Darm eine Rolle?
- Ist die 8-HChC (**58**) in verschiedene Insekten-Pflanzen-Interaktionen involviert? Kann diese Verbindung aufgrund ihrer hervorragenden Komplexbildungseigenschaften in der Pflanze Ionen binden und damit deren Verteidigungsmechanismen inhibieren? Fungiert die 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven als möglicher Siderophor und ist sie damit z. B. in den Transport und die Speicherung von Eisenionen involviert?

⁹Homeostase – umfassende Beschreibung für Biosynthese und Hydrolyse

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Homeostase der *N*-Acylglutamine im Darm von *Spodoptera* Larven

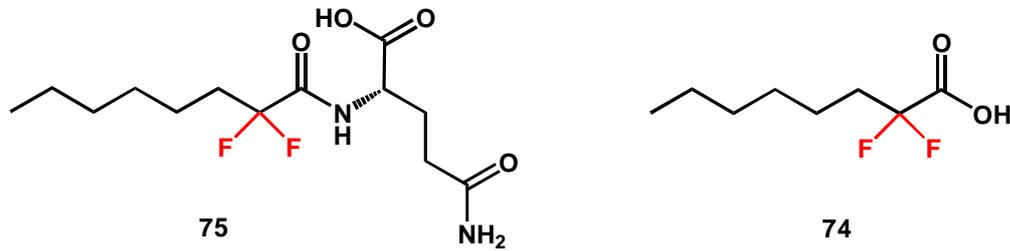
Wie bereits in Kapitel 1.3 eingehend beschrieben, haben die *N*-Acylglutamine verschiedene Funktionen für *Spodoptera* Larven. Einerseits dienen sie diesen als Nahrungsemulgatoren zum Transport von Fetten in die Hämolymphe.^[42] Andererseits verteidigen sich die Larven gegen Fraßfeinde durch Hervorwürgen des Regurgitats. Des Weiteren induzieren *N*-Acylglutamine die pflanzliche Verteidigung z. B. im Fall von Mais.

Über die Lokalisierung der *N*-Acylglutamine im Darm von *Spodoptera* Larven war bisher nur wenig Genaues bekannt. Aufgrund der vielfältigen biologischen Aktivitäten der *N*-Acylglutamine war es von großem Interesse, herauszufinden, wo genau diese Konjugate im Darm lokalisiert sind und in welchen Abschnitten deren Homeostase stattfindet.

3.1.1 Untersuchungen mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie

Zur Beantwortung der Frage nach der Lokalisierung der *N*-Acylglutamine im Insektendarm wurde die bildgebende NMR als Methode der Wahl ins Auge gefasst. Anstelle von Wasserstoff – bzw. Kohlenstoffisotopen wurde ¹⁹F-NMR-Spektroskopie genutzt. Um im Insektendarm sowohl das gefütterte fluoridierte Konjugat als auch die möglicherweise durch Hydrolyse freigesetzte Fettsäure differenzieren zu können, sollte bei der Synthese eines ¹⁹F-markierten Konjugats eine zweifache Fluorierung am α -Kohlenstoffatom der Fettsäure erfolgen. In beiden Verbindungen wären unterschiedliche chemische Verschiebungen für ¹⁹F-Atome zu erwarten. Bei der Wahl der Fettsäure musste ein Kompromiss zwischen einer möglichst großen Ähnlichkeit zur Struktur der natürlichen längerkettigen *N*-Acylglutamine sowie einer optimalen Wasserlöslichkeit des fluoridierten Konjugats gefunden werden. Daher fiel die Wahl auf α -Ketoctansäure (**73**). Diese wurde mittels DAST zu 2,2'-Difluor-octansäure (**74**) derivatisiert.^[80] Die anschließende Umsetzung mit Glutamin^[81] ergab

N-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) (persönliche Mitteilung Christina Münnich, Schema 8).



Schema 8: *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) ($\delta_F \approx 79$ ppm); 2,2'-Difluor-octansäure (**74**) ($\delta_F \approx 76$ ppm), die chemischen Verschiebungen der Fluoratome beider Verbindungen unterscheiden sich um ca. 3 ppm

Nach Fütterung des synthetisierten Konjugats sollte dieses durch Detektion der Fluorsignale mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie in der Raupe lokalisiert werden. Des Weiteren sollte eine mögliche Hydrolyse zur freien Fettsäure und zum Glutamin (**33**) untersucht werden. Dabei lag besonderes Augenmerk auf der Frage, ob die Hydrolyse im Darmmedium oder z. B. speziell an der Darmwand stattfindet. Dies ließe unter anderem Rückschlüsse auf eine bakterielle oder durch die Raupe selbst induzierte Hydrolyse zu.

Um während des Messvorgangs ein möglichst verwacklungsfreies Bild zu erhalten, war es notwendig, die jeweilige Raupe konstant in Position zu halten. Des Weiteren ist die Empfindlichkeit der Messung umso höher, je symmetrischer, also linearer die Raupe im Röhrchen positioniert ist. Dazu wurde die *Spodoptera* Larve vor der Messung durch Abkühlen auf ca. 4 °C immobilisiert und in einem speziell entwickelten Einsatz für NMR-Röhrchen aus Kunststoff arretiert (Abbildung 8). Ein kleiner Kanal bis zur oberen Öffnung des NMR-Röhrchens stellte dabei die Sauerstoffversorgung der Raupe sicher.

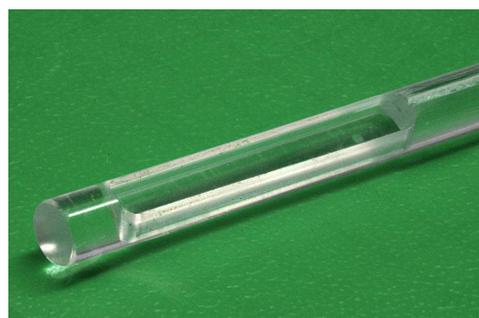


Abbildung 8: speziell entwickelter Kunststoffeinsatz für NMR-Röhrchen zur Arretierung von *Spodoptera* Larven in der Spule

Trotz groß angelegter Messreihen war es nur in wenigen Fällen möglich, ein Fluor-Signal zu detektieren, dessen Intensität hoch genug war, um ein zwei- bzw. dreidimensionales Verteilungsmuster zu erstellen. Fluor ist zwar neben Wasserstoff einer der empfindlichsten Kerne in der NMR, jedoch lag die aufgenommene Menge des Fluor-markierten Konjugats oft unterhalb der Nachweisgrenze. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, eine vermehrte Aufnahme des Konjugats durch die Raupen zu erreichen. Dazu wurde die künstliche Diät (Kapitel 6.4) z. B. noch vor dem Erkalten des Agars mit großen Mengen Konjugat versetzt. Des Weiteren wurde Futter vor dem Erkalten sehr dünn in ein spezielles Töpfchen gestrichen und die sichtbare Oberfläche des Futters mit großen Mengen Konjugat bestrichen. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Raupen das Konjugat aufnehmen. Jedoch führten auch diese Versuche nicht zum gewünschten Erfolg. Die mittels LC-MS bestimmte maximale Konzentration im Darm stieg in der Regel nicht über $25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Viele Fluorverbindungen sind toxisch. Auch durch Fütterung von *N*-(2,2'-Difluorocanoyl)-glutamin (**75**) entstehen im Darm von *Spodoptera* Larven vermutlich toxische Abbauprodukte. So konnte eine Mortalitätsrate von ca. 20 % beobachtet. Die überlebenden Raupen litten unter teils akuten Wachstumsstörungen und nahmen keine weitere Nahrung auf. Speziell jüngere *Spodoptera* Larven schienen dabei besonders anfällig zu sein. Deshalb wurden für weitere Experimente *Spodoptera* Larven verwendet, die bereits ein Alter von ca. 20 Tagen und eine Größe von ca. 20 mm erreicht hatten.

Lediglich in zwei Fällen war die aufgenommene Menge an fluoriertem Konjugat groß genug, um ein dreidimensionales Verteilungsmuster in der Raupe zu erstellen. Dabei wurden die Raupen über ca. sieben bis zehn Tag kontinuierlich mit *N*-(2,2'-Difluorocanoyl)-glutamin (**75**) gefüttert. Das erhaltene Fluor-Signal konnte jeweils der 2,2'-Difluorocansäure (**74**) zugeordnet werden (Abbildung 9).

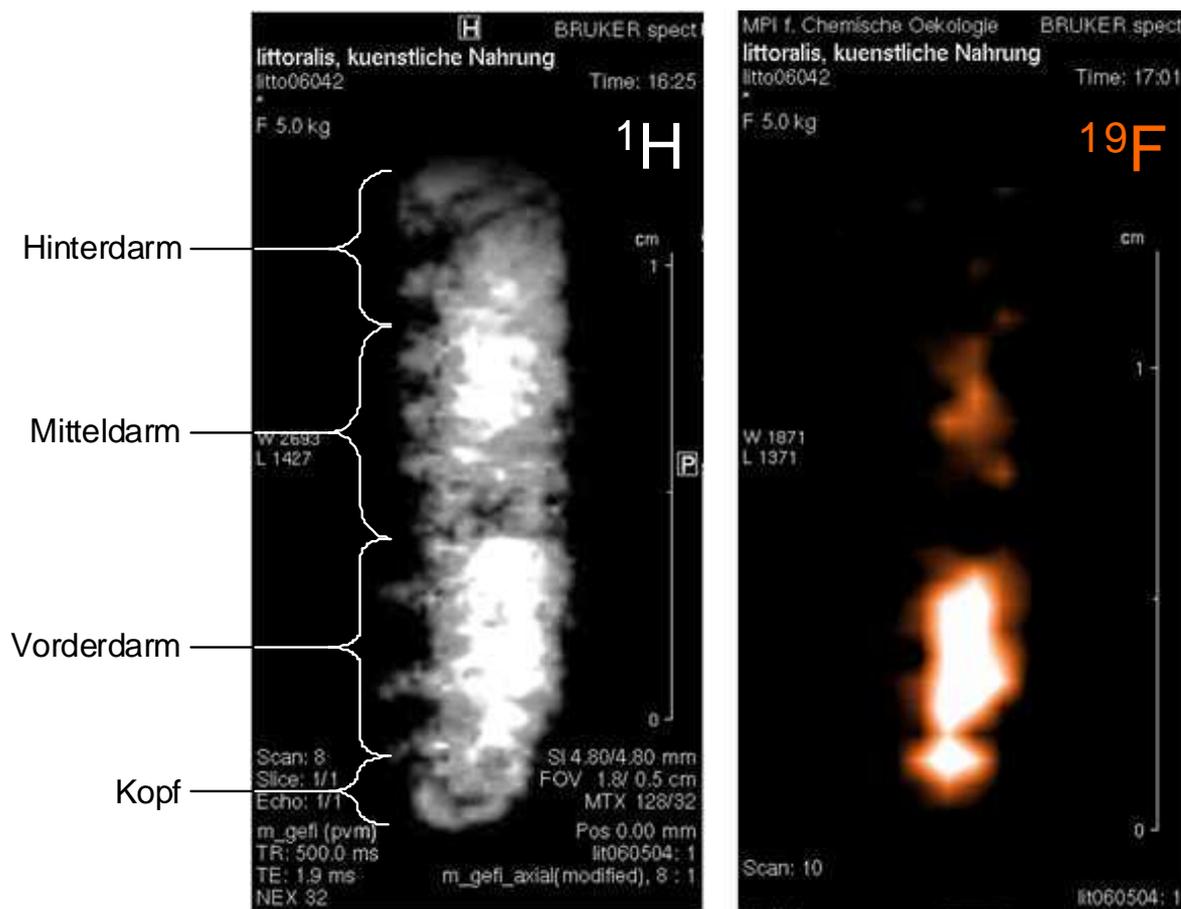


Abbildung 9: ^1H -Image einer *Spodoptera littoralis* Larve und ^{19}F -Signal der 2,2'-Difluor-octansäure (**74**)

Dass ausschließlich das Signal der Fettsäure speziell im Vorderdarm gefunden wurde, spricht klar für eine Hydrolyse des Konjugats in diesem Teil des Darms. Die lange Fütterungsdauer von sieben bis zehn Tagen bis zur Detektion des ^{19}F -Signals spricht für eine Akkumulation der 2,2'-Difluorooctansäure (**74**). Da jedoch auch in diesen Fällen das detektierte Signal verhältnismäßig schwach war, konnte bei der Erstellung der dreidimensionalen Verteilung nur eine vergleichsweise geringe Auflösung erzielt werden. Es wurde diskutiert, die Messungen an einem Gerät mit höherer Empfindlichkeit durchzuführen. Berechnungen haben jedoch gezeigt, dass die Mengen des im Darm vorhandenen Konjugats bzw. der Fettsäure nicht ausreichen würden, um eine signifikant höhere Auflösung zu erreichen.

3.1.2 Untersuchungen mittels LC-MS

Mittels der ^{19}F -NMR-Spektroskopie konnten lediglich Aussagen zur Verteilung der Fettsäure im Darm von *Spodoptera* Larven getroffen werden. Vom Konjugat selbst wurde kein Signal detektiert. Dessen Verteilung im Darm wurde alternativ mittels der deutlich empfindlicheren LC-MS bestimmt. Optisch können *Spodoptera* Larven in 11 verschiedene Segmente unterteilt werden. Zur Bestimmung der Verteilung des fluorierten Konjugats im Darm wurden die Raupen nach 24stündiger Fütterung mit *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) tiefgefroren und anschließend mit einem Skalpell in die einzelnen Segmente zerteilt. Diese wurden mit jeweils 50 μl Methanol extrahiert und der Überstand mittels LC-MS^h analysiert. Als interner Standard wurden 4 μl einer 2 mM Lösung des nicht im Insektendarm vorkommenden *N*-(*n*-Phenylvaleroyl)-glutamins (**76**) zugegeben. Ähnlich wie bei der Verteilung der Fettsäure beobachtet man auch beim Konjugat große Konzentrationsunterschiede entlang des Darms. So konnte gezeigt werden, dass *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) speziell im Vorderdarm in großen Mengen zu finden ist, aber bereits im mittleren bzw. hinteren Teil des Vorderdarms (Segmente 3 – 4) in ungleich geringerer Konzentration vorhanden ist. Während sich etwa 90 % der im Darm von *Spodoptera* Larven gefundenen Gesamtmenge des Konjugats im Vorderdarm befanden, konnten im Mittel- und Hinterdarm nur noch Spuren davon nachgewiesen werden (Abbildung 10).

^hLC-MS Bedingungen: H₂O (A, 0.5 % CH₃COOH), CH₃CN (B, 0.5 % CH₃COOH), min⁻¹ 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml

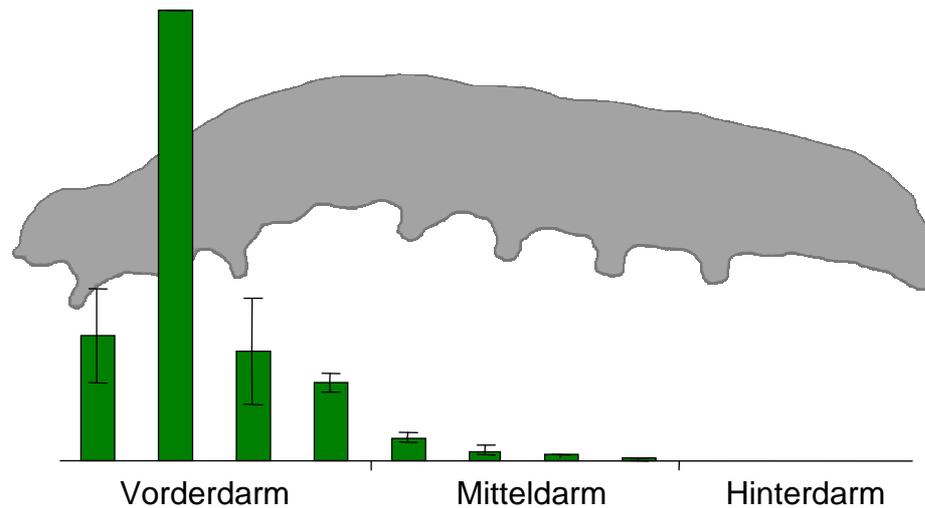


Abbildung 10: relative Verteilung von *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) entlang des Darms von *Spodoptera littoralis* (N = 6)

Das erste Segment bezeichnet den Kopf der *Spodoptera* Larve und besteht zu einem verhältnismäßig geringen Anteil aus Darm. Deshalb wurde dort - bezogen auf die Masse - eine kleinere Menge des Konjugats detektiert. Im zweiten Segment findet man das Konzentrationsmaximum von *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**). Ab dem dritten Segment nimmt die Konzentration des Konjugats stetig ab, was stark auf dessen Hydrolyse zur entsprechenden Fett- und Aminosäure hinweist. Größere Versuchsreihen haben gezeigt, dass das in Abbildung 10 dargestellte Verteilungsmuster nach 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden konstant bleibt.

Um herauszufinden, wie stabil *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) im Darm ist, wurden Raupen für 24 Stunden damit gefüttert und anschließend auf unbehandeltes Futter gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) nach vier Stunden nicht mehr im Regurgitat detektierbar war. Zur Lokalisierung der Biosynthese des Konjugats wurde 2,2'-Difluorooctansäure (**74**) gefüttert. Es konnte jedoch kein entsprechendes Glutaminkonjugat detektiert werden.

Die Untersuchungen zur Homeostase der *N*-Acylglutamine im Darm von *Spodoptera* Larven haben gezeigt, dass speziell die Hydrolyse der Konjugate bereits im Vorderdarm sehr effektiv funktioniert. Dafür sprechen sowohl das Verteilungsmuster von *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) als auch das der 2,2'-Difluorooctansäure (**74**). Letztere wird offenbar nicht ausgeschieden, sondern weiterverwertet, da diese in hinteren Darmabschnitten nicht nachgewiesen wurden. Da die Konzentration des Konjugats auch in hinteren Darmabschnitten stetig sinkt, ist zu vermuten, dass dort

ebenfalls eine aktive Hydrolyse stattfindet. Zum einen dürften die Fluoratome die Carbonylaktivität der Säure erhöhen und damit die Hydrolyse der Amidbindung beschleunigen. Im Darm von *Spodoptera* Larven gibt es jedoch auch Enzyme wie die *N*-Acylaminosäurehydrolase (AAH), isoliert aus *Microbacterium arborescens*, die die Homeostase, aber im Speziellen die Hydrolyse der *N*-Acylglutamine steuern.^[82] Da das Aktivitätsmaximum der AAH vor allem im alkalischen Bereich um pH 10 liegt, also unter Bedingungen vergleichbar mit denen im Vorderdarm von *Spodoptera* Larven, sind solche Enzyme wahrscheinlich für diese effektive Hydrolyse und damit für das Verteilungsmuster von *N*-(2,2'-Difluorooctanoyl)-glutamin (**75**) mitverantwortlich. Die *N*-Acylglutamine kommen in *Spodoptera* Larven speziell im Vorder- und Mitteldarm vor.^[83] Der Einfluss des alkalischen pH-Wertes auf die Stabilität der Amidbindung der *N*-Acylglutamine ist in diesem Fall nahezu vernachlässigbar, da die alkalische Hydrolyse vergleichsweise langsam vonstatten geht und die schnelle Hydrolyse des Konjugats im Insektendarm binnen vier Stunden nicht erklärt.

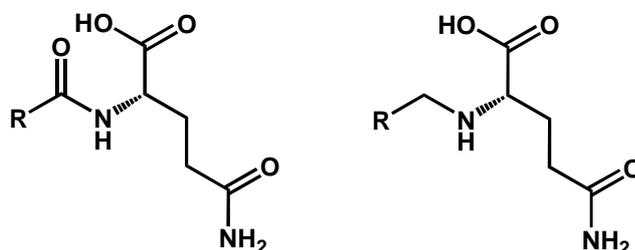
Die gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den zu Anfang des Kapitels beschriebenen Beispielen zum Nutzen der *N*-Acylglutamine für die Raupe. Bei der möglichen Rolle als Nahrungsemulgatoren macht deren Präsenz im Vorderdarm ebenso Sinn, wie beim Einsatz zur Verteidigung gegen Fraßfeinde durch das Hervorwürgen des Regurgitats.

3.2 Synthese hydrolysestabiler *N*-Acylglutamine

Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, haben *N*-Acylglutamine im Darm von *Spodoptera* Larven große Bedeutung sowohl für die Raupen selbst als auch in deren Interaktion mit ihren Futterpflanzen. Darmbakterielle Enzyme wie die *N*-Acylaminosäurehydrolase (AAH) aus *Microbacterium arborescens* sind in die Biosynthese und Hydrolyse dieser Verbindungsklasse involviert.^[82] Am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen wird die AAH auf verschiedene Fragestellungen wie z. B. die Position des aktiven Zentrums hin untersucht. Dazu werden Enzym und Substrat co-kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert. Für diese Studien sind Derivate der *N*-Acylglutamine nötig, die zwar in der Enzymtasche binden, aber nicht von der AAH hydrolysiert werden können.

In der Analytik der *N*-Acylglutamine z. B. mittels LC-MS wurden bisher Standards wie die *N*-(*n*-Phenylacyl)-glutamine verwendet, die nicht im Darm vorkommen. Jedoch sind diese Konjugate aufgrund der Amidbindung relativ empfindlich gegen alkalische oder enzymatische Hydrolyse. Auch hier wäre der Einsatz hydrolysestabiler Standardverbindungen sinnvoll.

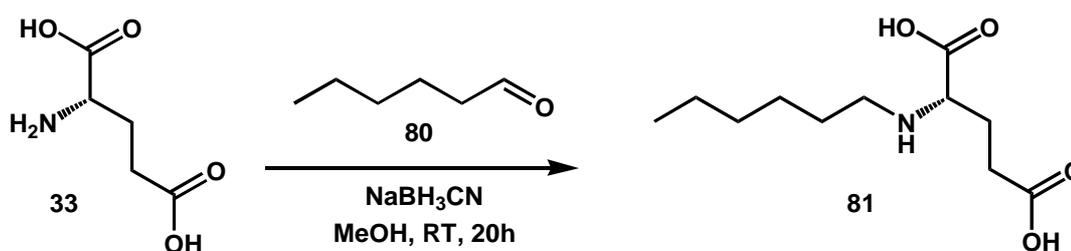
Für die Analytik von Salicin aus Larven von *Chrysomela* Spezies wurde z. B. anstatt des hydrolyseempfindlichen *O*-Glucosids das entsprechende *S*-Glucosid verwendet.^[84] Zur Synthese hydrolysestabiler *N*-Acylglutamine war das entsprechende alkylierte Glutamin ein recht vielversprechender Ansatz, bei dem an der Amidfunktion zwischen Fettsäure und Glutamin die Carbonylfunktion formal fehlt (Schema 9).



Schema 9: Strukturformeln der hydrolyseempfindlichen *N*-Acylglutamine (links) und der hydrolysestabiler *N*-Alkylglutamine (rechts)

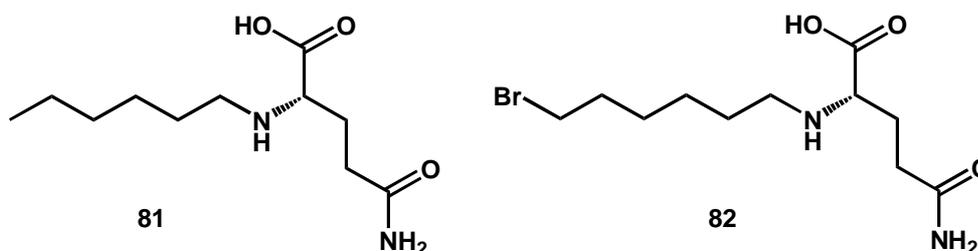
In ersten Versuchen wurde α -Linolensäure (**13**) mit LiAlH_4 zum entsprechenden Alkohol reduziert und weiter zum Methylsulfonat umgesetzt. Dessen Umsetzung mit Glutamin führte nicht zum gewünschten *N*-Linolenylglutamin (**77**). Die Reaktion des Alkohols zum Iodid und dessen Umsetzung mit Glutamin (**33**) mittels Ethyldiisopropylamin in DMSO führte zu sehr geringen Ausbeuten des gewünschten Produkts.

N-alkylierte Aminosäuren können auch durch Reaktion mit den entsprechenden Aldehyden in Gegenwart von NaBH_3CN synthetisiert werden.^[85] Dazu wurde α -Linolenol (**78**) mit IBX ^[86] zu α -Linolenal (**79**) oxydiert^[87] und das erhaltene Produkt anschließend mit Glutamin (**33**) umgesetzt.^[85] Da das entstandene *N*-Linolenylglutamin (**77**) in Wasser nahezu unlöslich war, wurde die Reaktion mit dem kürzerkettigen *n*-Hexanal (**80**) wiederholt. Es wurde *N*-Hexylglutamin (**81**) in 67 % Ausbeute erhalten (Schema 10).



Schema 10: Reaktionsschema zur Synthese von *N*-Hexylglutamin (**81**)^[85]

Für die Analyse des co-kristallisierten Enzyms AAH mittels Röntgenstrukturanalyse wurde ebenfalls ein entsprechendes *N*-(*n*-Bromhexyl)-glutamin (**82**) ausgehend von *n*-Bromhexanol (**83**) synthetisiert (Schema 11). Die Präsenz des Brom-Atoms im Kristall verursacht anomale Dispersion, durch die genauere Aussagen über die Position des Substrats im Enzym getroffen werden können.



Schema 11: hydrolysestabile Derivate der *N*-Acylglutamine: *N*-Hexylglutamin (**81**); *N*-(*n*-Bromhexyl)-glutamin (**82**)

3.3 Die Hydrolyse von Quorum-Sensing-Molekülen im Darm von *Spodoptera* Larven

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben wurde, steuern viele Bakterienarten zelldichteabhängige Stoffwechselprozesse über eine spezielle Art der intraspezifischen Kommunikation, das sogenannte Quorum Sensing. Die Regulation solcher Prozesse erfolgt über spezielle Kommunikationsmoleküle, sogenannte Autoinducer. Speziell die *N*-Acylhomoserinlactone Gram-negativer Bakterien stehen dabei im Fokus. Diese Fettsäure-Aminosäure-Konjugate haben eine große strukturelle Ähnlichkeit mit den aus dem Darm von *Spodoptera* Larven bekannten *N*-Acylglutaminen.^[41] In diesem Kapitel soll unter anderem die Frage geklärt werden, ob auch die *N*-Acylhomoserinlactone im Insektendarm zu finden sind.

3.3.1 Screening von *Spodoptera* Larven nach *N*-Acylhomoserinlactonen

3.3.1.1 Screening via LC-MS und GC-MS

Der Darminhalt von *Spodoptera* Larven wurde gesammelt und mittels LC-MSⁱ und GC-MS auf das Vorkommen verschiedener *N*-Acylhomoserinlactone untersucht. Zur Identifizierung eventueller *N*-Acylhomoserinlactone wurde nach charakteristischen Fragmentierungsmustern gesucht (Abbildung 11). Als Standards wurden verschiedene unsubstituierte *N*-Acylhomoserinlactone synthetisiert (Tabelle 1).^[88] Das kommerziell verfügbare *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) wurde durch Reduktion mittels NaBH₄ zu *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinlacton (**84**) reduziert. Zur Untersuchung des Regurgitats mittels GC-MS wurden die Proben vor der Messung mit MSTFA derivatisiert.

Obwohl für die LC-MS eine Nachweisgrenze für *N*-Acylhomoserinlactone von 5 pmol (*N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**)) ermittelt werden konnte, wurde zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung ein Hinweis auf die Präsenz von *N*-Acylhomoserinlactonen im Raupendarm gefunden, weder im Vorder- oder Mitteldarm, noch in Rectum oder Colon. Auch die Analyse mittels GC-MS ergab keine Hinweise auf *N*-Acylhomoserinlactone.

ⁱLC-MS Bedingungen: H₂O (A, 0.5 % CH₃COOH), CH₃CN (B, 0.5 % CH₃COOH), min⁻¹ 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml min⁻¹

^kGC-MS Bedingungen: Alltech EC5, 15 m x 0,25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 1.5 ml min⁻¹; Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, 10 °C min⁻¹ 200 °C, 30 °C min⁻¹, 280 °C 1 min; Injektortemperatur 220 °C; Split: 1:10

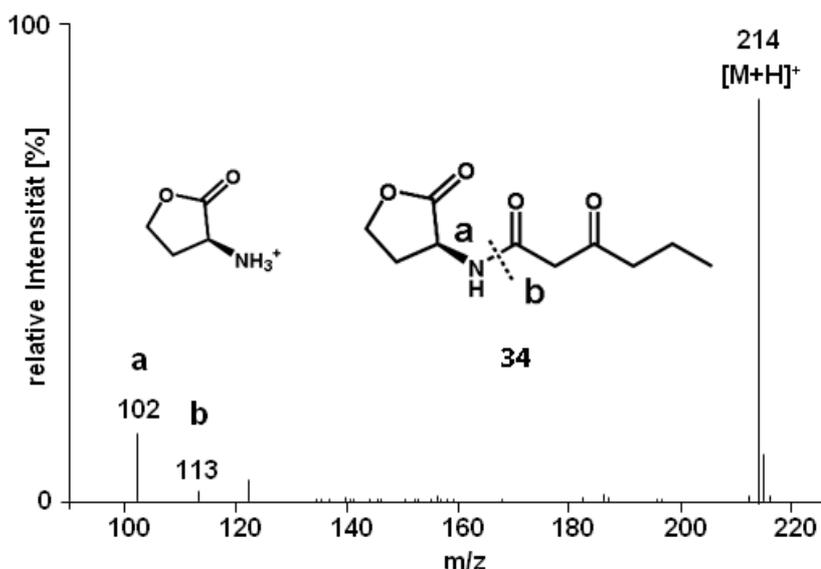
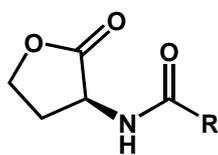


Abbildung 11: typisches APCI-Massenspektrum der *N*-Acylhomoserinlactone am Beispiel von *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**), Molekülion $[M+H]^+$ sowie zwei Fragmente der Fett- bzw. Aminosäure resultierend aus der Spaltung der Amidbindung.

Tabelle 1: Überblick über zur Identifizierung von *N*-Acylhomoserinlactonen im Raupendarm synthetisierter Standards, *kommerziell verfügbar bei Sigma Aldrich

<i>N</i> -Acylhomoserinlacton	Retentionszeit LC-MS ^I [min]
<i>N</i> -Pentanoylhomoserinlacton (85)	15.3
<i>N</i> -Hexanoylhomoserinlacton (42)	18.6
<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton* (34)	15.2
<i>N</i> -(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinlacton (84)	17.7
<i>N</i> -Octanoylhomoserinlacton (43)	22.7
<i>N</i> -Decanoylhomoserinlacton (45)	26.3
<i>N</i> -Undecanoylhomoserinlacton (86)	28.1
<i>N</i> -Dodecanoylhomoserinlacton (47)	29.8



^ILC-MS Bedingungen: H₂O (A, 0.5 % CH₃COOH), CH₃CN (B, 0.5 % CH₃COOH), min⁻¹ 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml min⁻¹

3.3.1.2 Screening mittels verschiedener Biosensoren

Da mit den etablierten analytischen Verfahren, wie LC-MS und GC-MS keine Hinweise auf *N*-Acylhomoserinlactone im Darm von *Spodoptera* Larven gefunden werden konnten, kamen verschiedene sogenannte Biosensoren zum Einsatz. Bei diesen Reporterbakterien wurde das Gen zur Biosynthese von *N*-Acylhomoserinlactonen deaktiviert. Sie besitzen jedoch weiterhin die Fähigkeit, auf *N*-Acylhomoserinlactone zu reagieren. *Chromobacterium violaceum* CV026 produziert z. B. in Anwesenheit von *N*-Acylhomoserinlactonen den violetten Farbstoff Violacein^[56] (**x**) (Abbildung 12a). *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 hingegen exprimiert eine β -Galactosidase, die mittels X-Gal durch eine hellblaue Farbreaktion nachgewiesen werden kann^[89] (Abbildung 12b). Der ebenfalls eingesetzte Reporterstamm *Escherichia coli* RV308pSB40^[89] reagierte auf *N*-Acylhomoserinlactone mit der Emission von Licht (Biolumineszenz, Abbildung 12c). Für alle drei Reporterstämme wurde zunächst die Nachweisgrenze für *N*-Acylhomoserinlactone ermittelt. Als Standard wurde *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) verwendet (Tabelle 2).

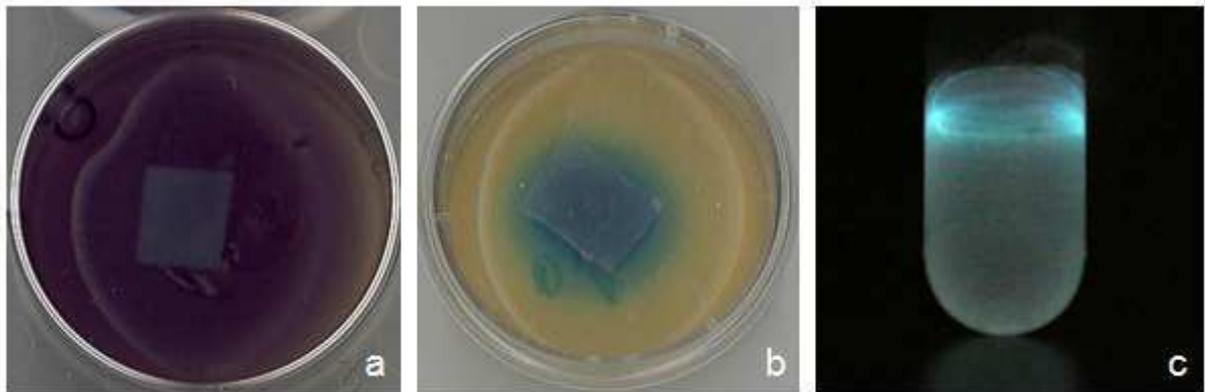


Abbildung 12: Biosensoren zum Nachweis von *N*-Acylhomoserinlactonen im Darmmedium von *Spodoptera* Larven, a: *Chromobacterium violaceum* CV026 produziert den Farbstoff Violacein (**56**), b: Blaufärbung von *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 nach Bildung einer β -Galactosidase, c: Biolumineszenz von *Escherichia coli* RV308pSB40

Tabelle 2: Nachweisgrenzen verschiedener *N*-Acylhomoserinlacton-sensitiver Reporterorganismen am Beispiel von *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**)

Reporterstamm	<i>N</i> -Hexanoylhomoserinlacton (42)		
	50 pmol	5 pmol	500 fmol
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	+	+	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1/pZLR4	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> RV308pSB40	+	+	-

Die Nachweisgrenze der getesteten Biosensoren liegt bei ca. 5 pmol. Einzig *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 weist eine etwas niedrigere Empfindlichkeit für *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) auf.

Alle Gram-negativen Bakterien, die Quorum Sensing über *N*-Acylhomoserinlactone betreiben, synthetisieren charakteristische Konjugate die sich in der Kettenlänge und Substitution des Fettsäurerestes unterscheiden. Während natürlich vorkommende Stämme von *Chromobacterium violaceum* *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) als Autoinducer nutzen,^[56] bildet *Agrobacterium tumefaciens* das längerkettige *N*-Dodecanoylhomoserinlacton (**47**).^[89] Dies dürfte auch die etwas geringere Empfindlichkeit von *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 auf das kurzkettige *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) erklären. Dafür ist *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 etwas empfindlicher für längerkettige *N*-Acylhomoserinlactone und die beiden Reporterstämme ergeben zusammen eine gute Kombination für die Detektion kurz- und langkettiger *N*-Acylhomoserinlactone.

Zur Untersuchung des Darminhaltes von *Spodoptera* Larven auf die Präsenz von *N*-Acylhomoserinlactonen im Fall von *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 und *Chromobacterium violaceum* CV026 wurden Agarkulturen, wie in Kapitel 6.3 beschrieben, hergestellt. 20 - 50 µl der zu untersuchenden Probe wurden auf ein 1 cm x 0.5 cm großes Stück steriles Filterpapier gegeben, das vorher auf den erstarrten Agar gelegt wurde. Dies sollte das unkontrollierte Verlaufen und damit Verdünnen der Probe verhindern.

Im Fall von *Escherichia coli* RV308pSB40 wurden Flüssigkulturen verwendet. Zu 900 µL Flüssigkultur wurden dabei 100 µl Probe gegeben. Die Biolumineszenz wurde mit einem Luminometer (Lumiskan TL Plus, Labsystems) quantifiziert.

Die Untersuchung des Regurgitats mittels der drei Reporterorganismen ergab übereinstimmend keinen Hinweis auf die Präsenz von *N*-Acylhomoserinlactonen. Quorum Sensing findet also im Darm von *Spodoptera* Larven vermutlich nicht statt. Zum Quorum Sensing sind jedoch nur sehr kleine Mengen *N*-Acylhomoserinlactone notwendig. Darum kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass lokal Quorum Sensing im Darm stattfindet. Durch das Sammeln des Regurgitats würden diese kleinen Mengen *N*-Acylhomoserinlactone stark verdünnt werden und deren Konzentration so unterhalb der Nachweisgrenze der genutzten analytischen Verfahren (ca. 5 pmol) liegen.

Aufgrund der ähnlichen Struktur der im Darm weit verbreiteten *N*-Acylglutamine zu den *N*-Acylhomoserinlactonen wurden diese ebenfalls auf einen möglichen Einfluss in den Tests untersucht. Allerdings haben die *N*-Acylglutamine bei keinem der Reporterorganismen die Induktion von Quorum-Sensing-Aktivitäten gezeigt.

N-Acylhomoserinlactone werden im Darm aufgrund des alkalischen pH-Wertes zu den offenkettigen *N*-Acylhomoserinen hydrolysiert (Kapitel 3.3.5). Diese *N*-Acylhomoserine wurden mittels der Reporterorganismen ebenfalls auf deren Aktivität bezüglich des Quorum Sensing getestet. Während *N*-Acylhomoserine in derselben Konzentration wie die *N*-Acylhomoserinlactone keine Aktivität aufwiesen, konnte im Fall von *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 bei Zugabe eines Überschusses an *N*-Hexanoylhomoserin (**87**) eine Positivreaktion beobachtet werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass auch die offenkettigen *N*-Acylhomoserine in diesem speziellen Fall noch eine schwache Restaktivität als Autoinducer des Quorum Sensing besitzen.

3.3.2 Fütterungsstudien

Da Autoinducer wie die *N*-Acylhomoserinlactone bereits in sehr kleinen Mengen wirksam sind, wurde zunächst vermutet, dass die Analytik mittels LC-MS und GC-MS nicht empfindlich genug war, um diese zu detektieren.

Um die Konzentration möglicherweise vorhandener *N*-Acylhomoserinlactone im Darm zu erhöhen, wurden diverse unsubstituierte Fettsäuren der Kettenlängen C₄ bis C₁₂, sowie 3-Oxohexansäure (**88**) und 3-Hydroxyhexansäure (**89**) gefüttert. Diese wurden z. B. als Lösung auf Blätter der Limabohne oder die künstliche Bohnennahrung gestrichen. Nach 24stündiger Fütterung wurde der Darminhalt mittels LC-MS und GC-MS analysiert. Während dieser Studie konnten keinerlei Hinweise auf die Präsenz und damit die Biosynthese von *N*-Acylhomoserinlactonen im Darm von *Spodoptera* Larven gefunden werden.

In einem weiteren Versuch wurden verschiedene synthetische *N*-Acylhomoserinlactone gefüttert (Abbildung 13), um deren Stabilität unter den physiologischen Bedingungen des Insektdarms zu prüfen. Beeindruckender Weise wurde im Darm weder das gefütterte Konjugat nachgewiesen, noch gab es Hinweise auf die möglicherweise durch Hydrolyse entstandenen und den *N*-Acylglutaminen strukturell ähnlichen *N*-Acylhomoserine.



Abbildung 13: Limabohnenblätter bestrichen mit wässrigen Lösungen verschiedener *N*-Acylhomoserinlactone

3.3.3 *N*-Acylglutamine als mögliche Inhibitoren des Quorum Sensing

Untersuchungen des Darms verschiedener *Spodoptera* Larven auf *N*-Acylhomoserinlactone mittels *Escherichia coli* RV308pSB40 (Kapitel 3.3.1.2) zeigten, dass nach Zugabe von Regurgitat keine signifikante Erhöhung der Biolumineszenz verzeichnet werden konnte, die auf die Präsenz von *N*-Acylhomoserinlactonen hingewiesen hätte. Stattdessen wurde eine wesentlich geringere Biolumineszenz als bei der Negativkontrolle detektiert. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurde eine Flüssigkultur von *Escherichia coli* RV308pSB40 mit *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) versetzt und jeweils Regurgitat bzw. als Kontrolle Puffer zugegeben. Dabei konnte nach Zugabe von Regurgitat eine um 50 % geringere Biolumineszenz im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Im Darm von *Spodoptera* Larven befinden sich also offenbar Verbindungen, die das Quorum Sensing und damit die Biolumineszenz dieses Biosensors inhibieren können. Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung wurden verschiedene bekannte niedermolekulare Verbindungen aus dem Insektendarm auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Während die in Kapitel 3.4 behandelte 8-HChC (**58**) keinen Effekt auf die Biolumineszenz hatte, konnte nach Zugabe von *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), einem Vertreter der *N*-Acylglutamine, eine signifikante Inhibierung der Biolumineszenz um etwa 50 % beobachtet werden (Abbildung 14).

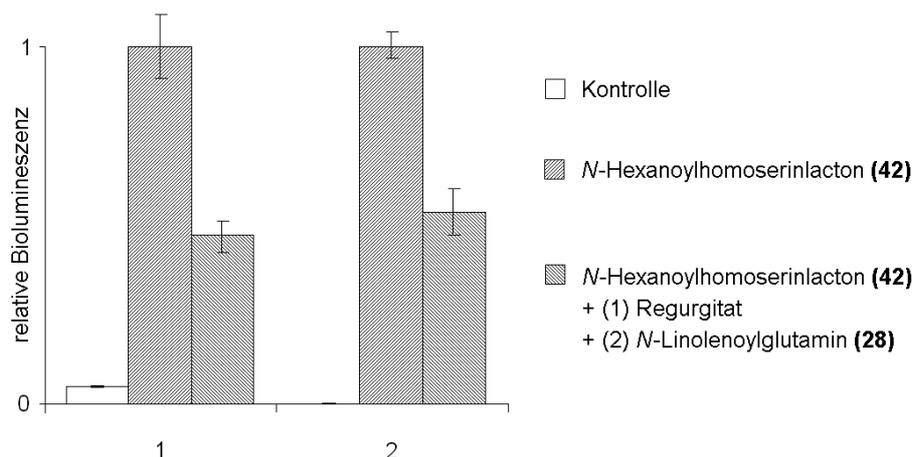


Abbildung 14: Inhibierung der Biolumineszenz von *Escherichia coli* RV308pSB40 nach Zugabe des Regurgitats von *Spodoptera* Larven sowie nach Zugabe von *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) (N = 5)

Die Zugabe größerer Mengen *N*-Linolenoylglutamin (**28**) führte schließlich zu einer maximalen Inhibierung der Biolumineszenz auf 39 % bei 680 µg ml⁻¹. Offensichtlich sind die niedermolekularen *N*-Acylglutamine in der Lage, das Quorum Sensing im Fall von *Escherichia coli* RV308pSB40 zu beeinträchtigen.

Um zu zeigen, dass neben den *N*-Acylglutaminen keine weiteren Verbindungen aus dem Regurgitat für die Inhibierung der Biolumineszenz von *Escherichia coli* RV308pSB40 verantwortlich sind, wurden diese mittels eines Ionenaustauschers (Dowex 50WX8-200) entfernt.^[90] Das behandelte Regurgitat zeigte keine signifikante Inhibierung der Biolumineszenz von *Escherichia coli* RV308pSB40.

Die inhibierende Wirkung der *N*-Acylglutamine auf das bakterielle Quorum Sensing ist aus heutiger Sicht spekulativ. Jedoch wird deren strukturelle Verwandtschaft zu den *N*-Acylhomoserinlactonen bzw. den offenkettigen *N*-Acylhomoserinen als mögliche Ursache vermutet. Die *N*-Acylglutamine könnten dabei z. B. in das Bakterium diffundieren und dessen Lux-Rezeptoren (Abbildung 7, Kapitel 1.4) blockieren. Die im Darmmedium gefundene hohe Konzentration an *N*-Acylglutaminen könnte zu diesem Phänomen beitragen.

Der Effekt der Inhibierung des Quorum Sensing wurde nur bei *Escherichia coli* RV308pSB40 beobachtet, bei dem man langkettige *N*-Acylhomoserinlactone als Autoinducer vermutet. Die Biosensoren *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 und *Chromobacterium violaceum* CV026 hingegen nutzen das kurzkettige *N*-(3-Oxo-octanoyl)-homoserinlacton (**34**)^[56] bzw. *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**).^[89] Dies könnte erklären, warum das langkettige *N*-Linolenoylglutamin (**28**) nur bei *Escherichia coli* RV308pSB40 einen Effekt auf das Quorum Sensing hat. Um dies zu untersuchen, wurde das kürzerkettige *N*-Hexanoylglutamin (**90**) synthetisiert und auf dessen Aktivität hin untersucht. Jedoch konnte weder bei *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 noch bei *Chromobacterium violaceum* CV026 ein signifikanter Effekt auf deren Quorum Sensing beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Studie indizieren eine inhibierende Aktivität der *N*-Acylglutamine auf das Quorum Sensing von Bakterien, es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen.

3.3.4 Analyse des pH-Wertes im Darm von *Spodoptera* Larven

Die Bestimmung des pH-Werts im Insektendarm ist von großer Bedeutung, da man darüber Vorhersagen über die mögliche Präsenz bestimmter Verbindung treffen kann. Im Fall der *N*-Acylhomoserinlactone ist zum Beispiel offensichtlich, dass speziell der Lactonring unter alkalischen Bedingungen zur Hydrolyse neigen sollte und so die Präsenz der *N*-Acylhomoserinlactone unter derartigen Bedingungen eher unwahrscheinlich wäre.

Zur Bestimmung des pH-Wertes im Darm wurde von jeweils 10 Larven verschiedener Lepidoptera Arten Regurgitat gesammelt und der pH-Wert mittels Universalindikatorpapier bestimmt. Als Kontrolle wurden verschiedene Puffer der pH-Werte 7 - 11 aufgetragen. Die Ergebnisse von *Spodoptera littoralis* (pH 10,4), *S. exigua* (pH 10,6), *S. eridania* (pH 10,3) und *Helicoverpa armigera* (pH 10,3) zeigten, dass im Regurgitat ein relativ alkalischer pH-Wert ~ 10 herrscht. Spätere genauere Untersuchung des pH-Wertes in der Arbeitsgruppe mittels Glaselektroden ergaben im Fall von *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera eridania* einen pH Wert von ca. 10 ± 0.5 im Vorderdarm bis hin zu $\text{pH } 7.0 \pm 0.5$ in Rectum und Colon (Abbildung 15).^[91]

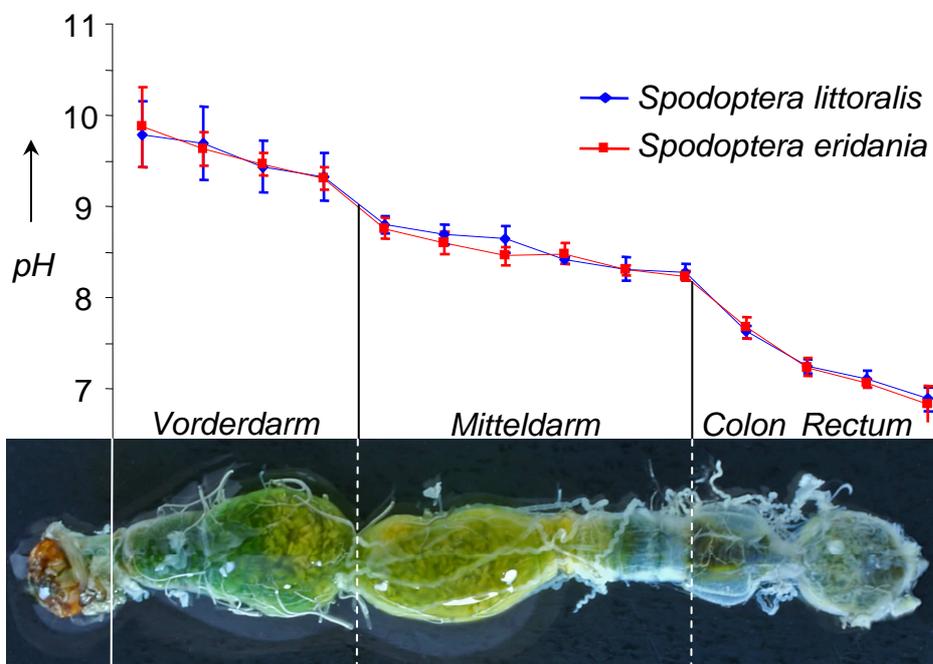


Abbildung 15: pH-Gradient im Darm von *Spodoptera* Larven (Daten: Vertica Mahobia)

3.3.5 Alkalische Hydrolyse der *N*-Acylhomoserinlactone

Die Abwesenheit der *N*-Acylhomoserinlactone im Insektendarm (Kapitel 3.3.1) und deren chemische Struktur legen unter den alkalischen Bedingungen im Darm von *Spodoptera* Larven eine hydrolytische Spaltung des Lactonrings nahe.

Zum Nachweis dieser Hypothese wurden *in vitro* verschiedene *N*-Acylhomoserinlactone auf ihre Stabilität unter alkalischen Bedingungen untersucht. Aufgrund der exzellenten Wasserlöslichkeit wurde dazu u. a. *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) verwendet. Bei der Analyse mittels LC-MS wurde die Bildung einer unbekanntten Verbindung der Masse $[M+18]$ beobachtet, die z. B. die Spaltung eines Lactonrings unter Addition von Wasser indiziert. Die unbekanntte Verbindung wurde als offenkettiges *N*-Hexanoylhomoserin (**87**) identifiziert. Wie in Abbildung 16 dargestellt, blieb die Konzentration von *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) bei pH 8 und 9 konstant. Der Lactonring wurde also nicht hydrolysiert. Erst bei pH-Werten >9 wurde eine beschleunigte Ringhydrolyse beobachtet.

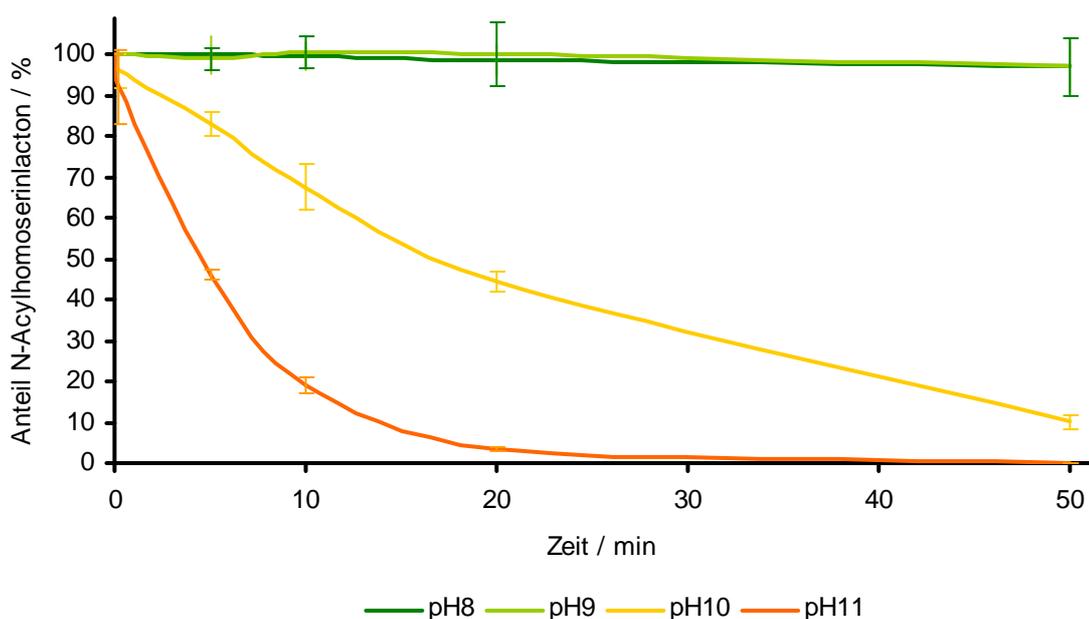
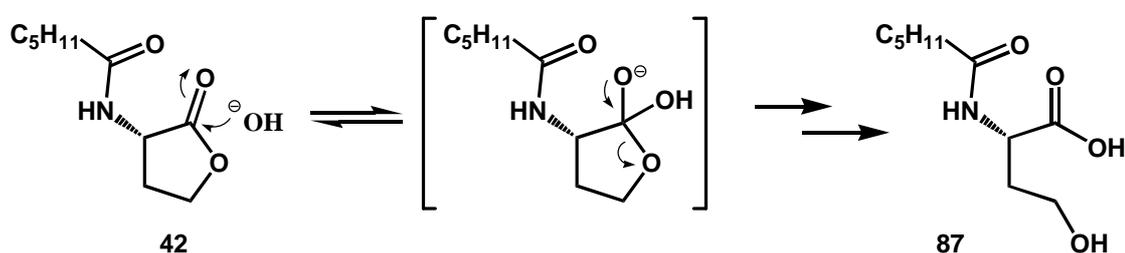


Abbildung 16: Alkalische Hydrolyse des Lactonrings von *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**) zu *N*-Hexanoylhomoserin (**87**) in Abhängigkeit des pH-Wertes (pH 8-11) (N = 6)

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Fettsäuresubstitution auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Lactonrings untersucht. Dazu wurden *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton (**34**) und *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinlacton (**84**) verwendet (Abbildung 17). Wie vermutet, erhöhte die Sauerstofffunktion der Keto- und Hydroxysubstitution aufgrund des Elektronen ziehenden Effekts die Hydrolysegeschwindigkeit, wobei der Effekt der Ketofunktion erwartungsgemäß etwas größer war.^[92]

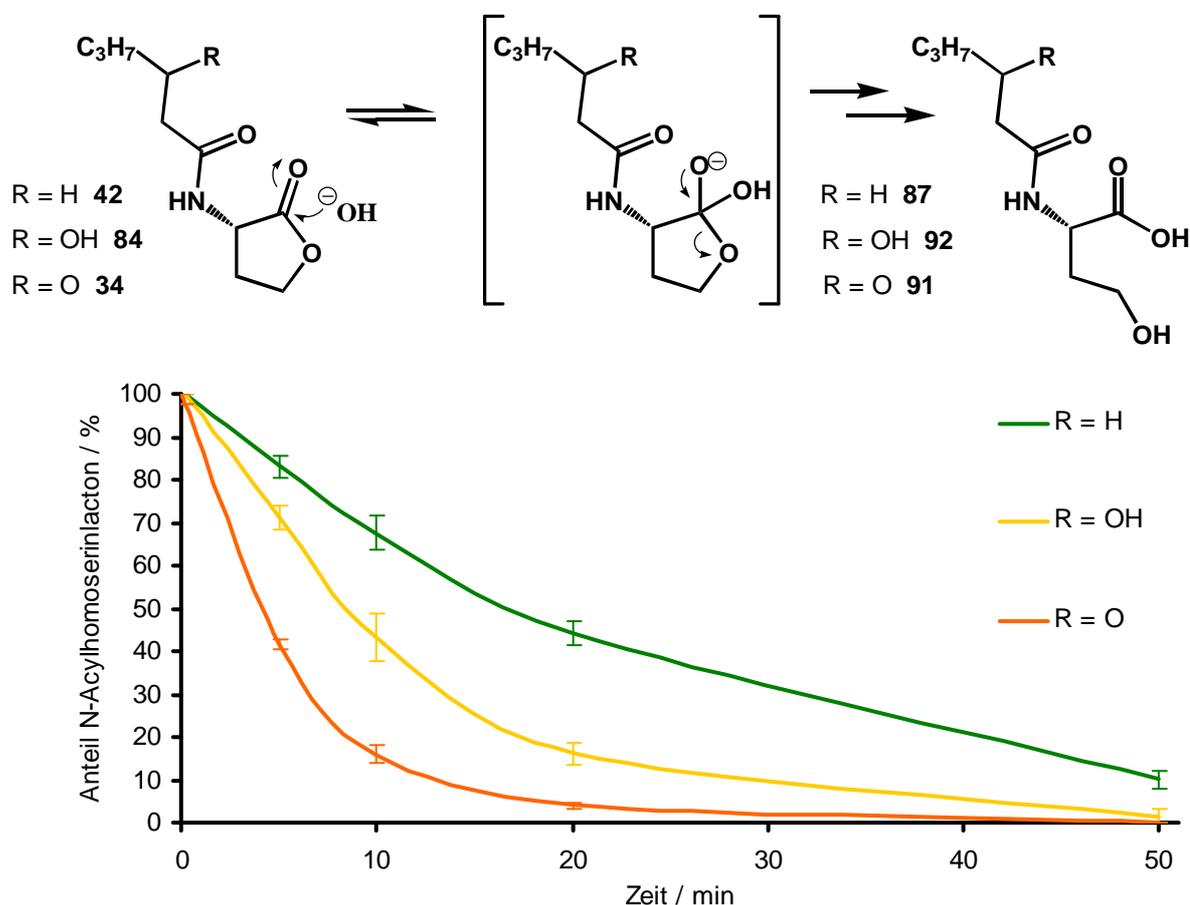


Abbildung 17: Alkalische Hydrolyse des Lactonrings verschiedener *N*-Acylhomoserinlactone in Abhängigkeit der Fettsäuresubstitution bei pH 10; grün: *N*-Hexanoylhomoserinlacton (**42**), gelb: *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinlacton (**84**), orange: *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton (**34**) (N = 6)

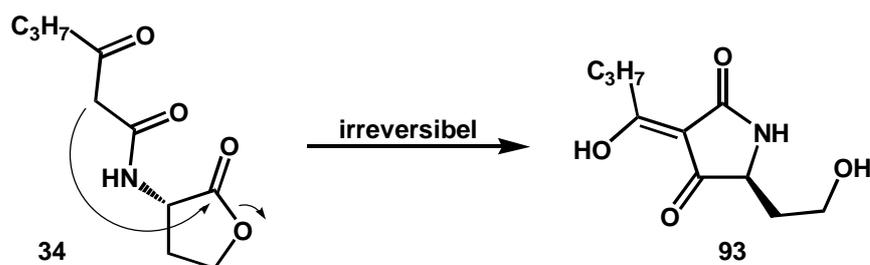
Tabelle 3: $t_{1/2}$ für die Lactonringhydrolyse verschiedener *N*-Acylhomoserinlactone bei unterschiedlichen pH-Werten

	$t_{1/2}$ [min]		
	pH 9	pH 10	pH 11
<i>N</i> -Hexanoylhomoserinlacton (42)	-	17.5	5
<i>N</i> -(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinelacton (84)	23	11	4.5
<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-homoserine lactone (34)	17	4.5	3

Die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Lactonringhydrolyse der verschiedenen *N*-Acylhomoserinlactone bei unterschiedlichen pH-Werten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Amidbindung der fettsäuresubstituierten *N*-Acylhomoserine unter alkalischen Bedingungen (pH 11) ebenfalls hydrolysiert wird. Jedoch konnte bei unsubstituierten *N*-Acylhomoserinen eine hohe pH-Stabilität über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Da jedoch während der Fütterungsexperimente (Kapitel 3.3.2) weder *N*-Acylhomoserinlactone, noch die teilweise pH-stabilen *N*-Acylhomoserine nachgewiesen wurden, muss neben dem alkalischen Darmmedium noch ein weiterer, effektiverer Faktor in den Abbau der *N*-Acylhomoserinlactone involviert sein. Dieser wird in Kapitel 3.3.7 diskutiert.

3.3.6 Alkalische Hydrolyse von *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen

Bei der alkalischen Hydrolyse von *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) wurde mittels LC-MS gezeigt, dass neben dem eigentlichen Hydrolyseprodukt *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserin (**91**) eine weitere Verbindung mit derselben Masse wie *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) zu beobachten war. Tatsächlich kommt es bei der alkalischen Hydrolyse von *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen neben der Hydrolyse des Lactonrings (ca. 33 %) als Konkurrenzreaktion zu einer intramolekularen Umlagerung vom Claisen-Typ (ca. 67 %) Die dabei entstehenden Produkte sind als Tetransäuren bekannt (Schema 12).^[93]



Schema 12: Neben der alkalischen Hydrolyse von *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) zu *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserin (**91**) entsteht in einer Konkurrenzreaktion durch irreversible Umlagerung die entsprechende Tetransäure 3-(1-Hydroxybutyliden)-5-(2-hydroxyethyl)-pyrroliden-2,4-dion (**93**)^[93]

Das Regurgitat von *Spodoptera* Larven wurde ebenfalls auf die Präsenz von Tetransäuren als möglicher Hinweis auf *N*-Acylhomoserinlactone untersucht. Dazu wurde nach Kaufmann *et al.* aus *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) die entsprechende Tetransäure synthetisiert^[93] und der Darm systematisch nach Tetransäuren untersucht. Es wurden jedoch keine Hinweise auf diese Verbindungen im Darm gefunden. Hierbei sei erwähnt, dass die Konzentration dieser Verbindungen im Darm so gering sein könnte, dass diese mit der genutzten Analytik nicht nachweisbar waren und man so deren Präsenz im Darm nicht endgültig ausschließen kann.

3.3.7 Postulat einer Abbaukaskade der *N*-Acylhomoserinlactone im Insektendarm

In unserer Arbeitsgruppe wurde das Enzym AAH (*N*-Acyl-Aminosäure-Hydrolase) aus dem Darmbakterium *Microbacterium arborescens* von *Spodoptera* Larven isoliert.^[82] Es ist in die Homeostase, aber vor allem in die Hydrolyse der im Darm vorhandenen *N*-Acylglutamine involviert. Die AAH wurde von Rita Böhler auf ihren Einfluss auf die *N*-Acylhomoserinlactone und die *N*-Acylhomoserine hin untersucht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der offenkettigen *N*-Acylhomoserine zu den *N*-Acylglutaminen (Abbildung 18) war zu erwarten, dass die ringgeöffneten *N*-Acylhomoserine in die aktive Enzymtasche der AAH passen und das Enzym damit

in der Lage ist, neben den *N*-Acylglutaminen auch weitere *N*-Fettsäure-Aminosäure-Konjugate wie die *N*-Acylhomoserine als Substrat zu nutzen. Rita konnte zeigen, dass die AAH die offenkettigen *N*-Acylhomoserine hydrolysiert. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse war dabei mit der der *N*-Acylglutamine vergleichbar.^[91] Interessanterweise kann die AAH keine *N*-Acylhomoserinlactone als Substrat nutzen. Diese Erkenntnis führt zu dem Schluss, dass sich beide Abbauschritte, die alkalische Hydrolyse des Lactonrings und die enzymatische Spaltung der Amidbindung durch die AAH einander bedingen (Schema 13).^[91]

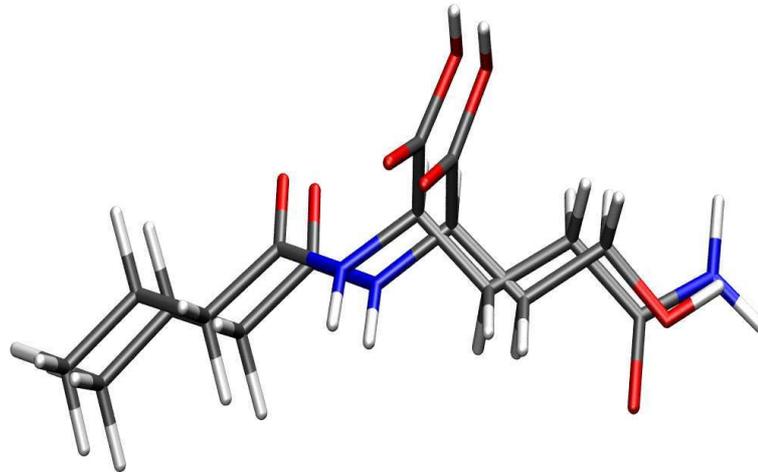
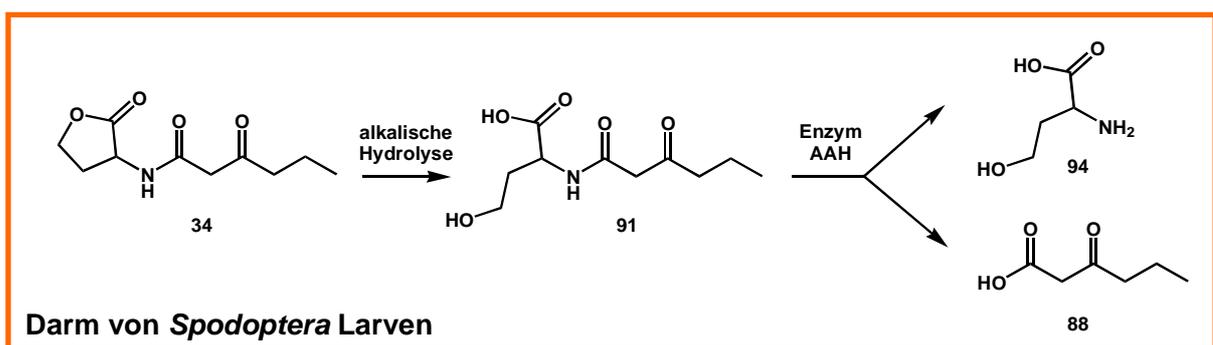


Abbildung 18: Strukturelle Ähnlichkeit ringgeöffneter *N*-Acylhomoserine (Vordergrund) und der *N*-Acylglutamine (Hintergrund); Grafik: Andreas Habel



Schema 13: Möglicher Abbaumechanismus der *N*-Acylhomoserinlactone im Darm von *Spodoptera* Larven^[91]

Im Darm von *Spodoptera* Larven wurden Bakterien nachgewiesen, die prinzipiell eine Vielzahl weiterer Enzyme bilden, wie z. B. Lactonasen,^[94] die in den Abbau von

N-Acylhomoserinlactonen involviert sein könnten. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen kann jedoch geschlussfolgert werden, dass die Raupen speziell durch den alkalischen pH-Wert auch aktiv zum Abbau von *N*-Acylhomoserinlactonen beitragen können.

Wie in Schema 6 (Kapitel 1.4) dargestellt ist, steuern Bakterien Quorum Sensing über verschiedenste Autoinducer, die pH-labile oder durch oben genannte Enzyme spaltbare funktionelle Gruppen aufweisen (Schema 6). Allein diese Tatsache macht Quorum Sensing im Insektendarm relativ unwahrscheinlich. Des Weiteren werden über Quorum Sensing oft Prozesse wie Biofilmbildung,^[49] die Synthese von Virulenzfaktoren^[95] oder Antibiotika^[50] gesteuert, die für das Insekt von Nachteil sein könnten. *Spodoptera* Larven können also kein Interesse an Quorum Sensing im Darm haben. Dies und die Tatsache, dass auch über die Nahrung viele Mikroorganismen in die Raupe gelangen, macht die Präsenz solcher effektiver Abbaumechanismen erforderlich.

3.3.8 Screening isolierter Darmbakterien auf die Synthese von *N*-Acylhomoserinlactonen

Da der alkalische pH-Wert im Darm und diverse Enzyme zum Abbau der *N*-Acylhomoserinlactone im Darm beitragen, stellte sich die Frage, ob die Darmbakterien außerhalb des Darms Quorum Sensing über *N*-Acylhomoserinlactone betreiben würden. Zur Isolation von Mikroorganismen aus dem Insektendarm wurden Därme von *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera exigua* präpariert und anschließend auf diversen Nährmedien ausplattiert (Kapitel 6.3). Es wurden insgesamt 28 Isolate gewonnen. Da diese nicht identifiziert wurden, ist eine Mehrfachisolierung einzelner Arten nicht auszuschließen. Die Bakterien wurden sowohl aus Flüssigmedien als auch direkt von Agarplatten mit 70%igem Ethanol extrahiert und mittels LC-MS auf die Präsenz von *N*-Acylhomoserinlactonen getestet. Es wurden jedoch keine Hinweise auf die Produktion von *N*-Acylhomoserinlactonen gefunden. Die zusätzliche Untersuchung der Proben mittels des Biosensors *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 bestätigte diese Ergebnisse.

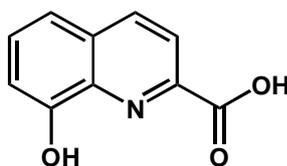
Prinzipiell würde man von Gram-negativen Darmbakterien mit der Fähigkeit zum Quorum Sensing über *N*-Acylhomoserinlactone erwarten, dass sie diese

Verbindungen außerhalb des Darms in nachweisbaren Mengen produzieren würden. Da jedoch nur ein geringer Teil der Darmbakterien überhaupt isolierbar ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit möglicherweise keine entsprechenden Organismen isoliert. Um endgültige Aussagen treffen zu können, müssten die Versuche zu deren Isolation jedoch noch ausgeweitet werden.

3.4 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) – ein Alkaloid im Darm von *Spodoptera* Larven

3.4.1 Verbreitung der 8-HChC in Lepidoptera Larven

Die 8-HChC (**58**) (Schema 14) wurde erstmals von Dieter Spiteller im Darm von *Spodoptera* Larven identifiziert.^[42] Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste Lepidoptera Larven auf diese Verbindung hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 8-HChC (**58**) weder in *Helicoverpa armigera*, *Pieris rapae* oder *Manduca sexta* vorkommt. Dafür konnte 8-HChC (**58**) im Darm aller untersuchter *Spodoptera* Arten, wie *S. littoralis*, *S. exigua*, *S. eridania* und *S. frugiperda* nachgewiesen werden.



58

Schema 14: Strukturformel der 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (8-HChC) (**58**)

3.4.2 Konzentration der 8-HChC im Darm von *Spodoptera* Larven

Zur Quantifizierung der 8-HChC (**58**) wurde Regurgitat von *Spodoptera* Larven in einer Glaskapillare gesammelt und mit derselben Menge einer $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ wässrigen Lösung von 4-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (Kynurensäure) (**95**) als internem Standard versetzt. Es wurden $20 \mu\text{l}$ Methanol zur Fällung der Proteine zugesetzt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Proben mittels LC-MS^m analysiert.

Im Laufe der Untersuchungen wurden gezeigt, dass die im Regurgitat enthaltene Menge an 8-HChC (**58**) stark von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis hin zu $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ schwankte.

^mLC-MS Bedingungen: H₂O (A, 0.5 % CH₃COOH), CH₃CN (B, 0.5 % CH₃COOH), min⁻¹ 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml

Im nächsten Schritt sollte ein möglicher Zusammenhang der Konzentration der 8-HChC (**58**) und dem Alter der Larven untersucht werden. Dazu wurden mehrere Generationen von *Spodoptera* Larven auf diese Fragestellung hin untersucht. In den meisten Fällen ließ sich ein klarer Trend feststellen. Offenbar enthält das Regurgitat von *Spodoptera* Larven besonders in den ersten Lebenstagen nach dem Schlüpfen besonders große Mengen 8-HChC (**58**) (Abbildung 19). Nachdem die Raupen ihr Maximalgewicht erreicht haben, nimmt die Konzentration der 8-HChC (**58**) spürbar ab und erreicht einen Tag vor dem Verpuppen ihr Minimum.

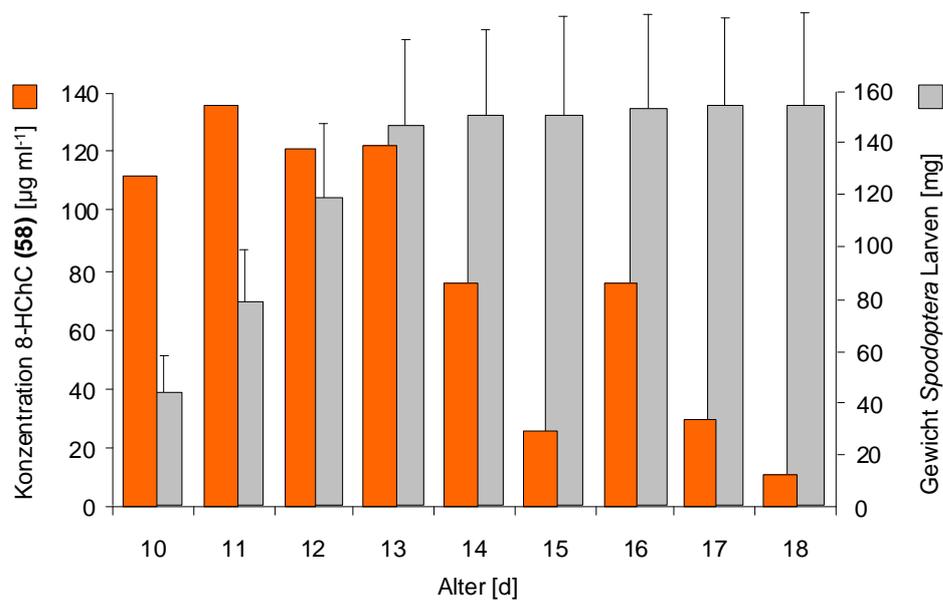


Abbildung 19: Konzentration der 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera exigua* in Abhängigkeit vom Alter, Regurgitat von je 10 Raupen vereinigt, im Vergleich die Wachstumskurve der Larven (Anzahl der Versuche N = 10)

Neben der altersabhängigen Verteilung der 8-HChC (**58**) im Regurgitat von *Spodoptera* Larven war es ebenfalls von Interesse, die Verteilung der 8-HChC (**58**) entlang des Darms von *Spodoptera* Larven zu untersuchen, um damit einen Eindruck über den möglichen Nutzen dieser Verbindung zu erhalten. Dazu wurde die Konzentration dieser Verbindung im Vorder-, Mittel- und Hinterdarm bestimmt. Um eine möglichst gute Auflösung der Verteilung im Darm zu erreichen, wurden *Spodoptera* Larven tiefgefroren und anschließend mit einem Skalpell in einzelne Segmente zerteilt. Die Segmente wurden abgewogen und mit je 50 μl Methanol extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren des Rückstands wurden die Proben mit 4 μl

einer methanolischen Lösung von *N*-(*n*-Phenylvaleroyl)-Glutamin (**76**) (2 mg ml^{-1}) versehen und mittels LC-MS analysiert. Es fiel auf, dass sich das Verteilungsmuster der 8-HChC (**58**) von Raupe zu Raupe relativ stark unterschied, was auch der Grund für die relativ hohen Standardabweichungen ist. Man kann jedoch sagen, dass die 8-HChC (**58**) im Darm relativ gleichmäßig verteilt ist und deren Konzentration erst im Colon und Rectum stärker zurückgeht (Abbildung 20). Abgebildet sind relative Konzentrationen, da sich die echten Konzentrationen individuell stark unterschieden. In allen Fällen wurde im Segment 3 ausnahmslos die größte Menge 8-HChC (**58**) detektiert, weswegen diese Konzentration jeweils auf den Wert 1 normiert wurde.

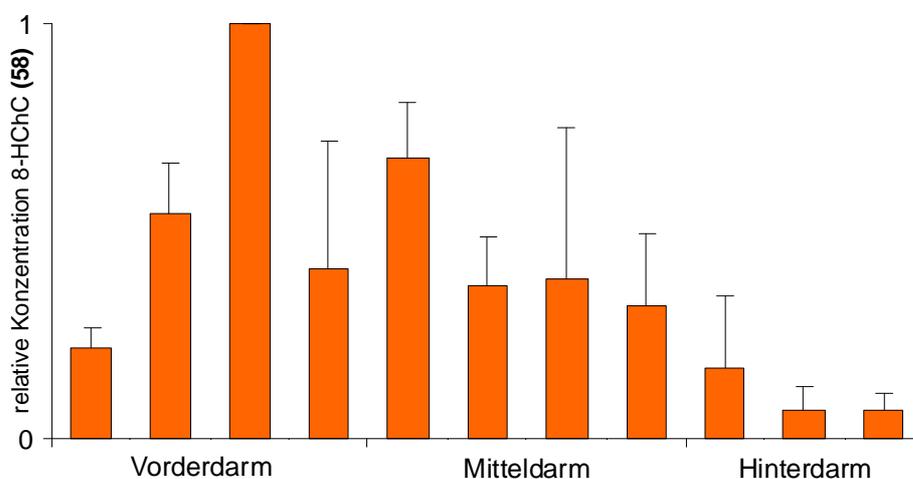


Abbildung 20: Verteilung der 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven am Beispiel von *Spodoptera littoralis* (N = 5)

3.4.3 Untersuchungen zur Biosynthese der 8-HChC im Insekten-darm

Nachdem die 8-HChC (**58**) in *Spodoptera* Larven in relativ hohen Konzentrationen nachgewiesen wurde, lag im nächsten Schritt das Hauptaugenmerk auf der Erforschung ihres Ursprungs. Da Chinolinderivate auch in Pflanzen vorkommen,^[71-74] wurde zunächst eine mögliche Aufnahme der 8-HChC (**58**) durch die pflanzliche Nahrung untersucht. Da die *Spodoptera* Larven im Labor entweder mittels einer künstlichen Diät aus Bohnen (Kapitel 6.4) oder mit Mais- bzw. Limabohnenblättern gefüttert wurden, wurden diese auf die Präsenz der 8-HChC (**58**) untersucht. Des

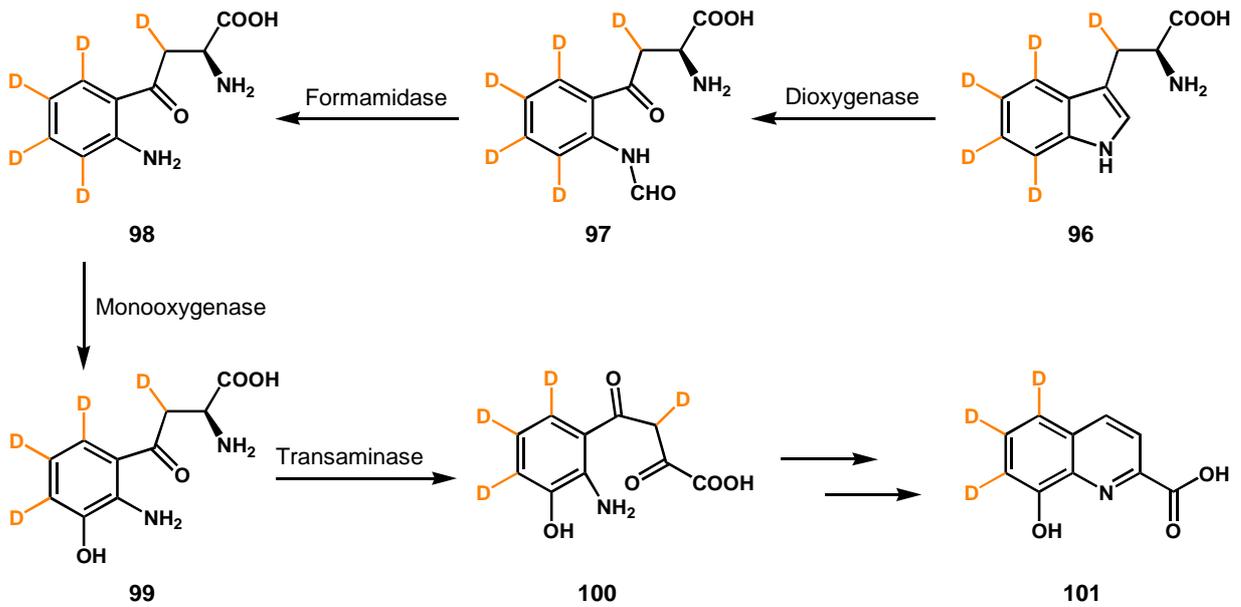
Weiteren wurde künstliche Bohnennahrung mit Methanol extrahiert und mittels LC-MS^a analysiert. Es wurde jedoch keine 8-HChC (**58**) gefunden. Um die Blatt-nahrung der *Spodoptera* Larven zu analysieren, wurde jeweils ein Teil des Blattes in ein Eppendorf-Tube gegeben und mit Methanol versetzt. Die Blätter wurden mit einem Pürierstab grob zerkleinert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Analyse des Überstandes per LC-MSⁿ gab auch in diesem Fall keinen Hinweis auf die Präsenz der 8-HChC (**58**).

3.4.3.1 Fütterung markierter Vorstufen zur Analyse der Biosynthese der 8-HChC im Darm

Da eine Aufnahme durch die pflanzliche Nahrung ausgeschlossen werden konnte, musste die Biosynthese der 8-HChC (**58**) also im Insektendarm stattfinden. Die Literatur beschreibt verschiedene Biosynthesewege für Chinolinderivate. Der häufigste Weg ist jedoch die Biosynthese über den Tryptophanmetabolismus. Zur Prüfung dieser Hypothese erschien die Fütterung einer markierten möglichen Vorstufe der 8-HChC (**58**) am besten geeignet. Dazu wurde deuteriertes Tryptophan (**96**) verwendet. Die Biosynthese sollte dabei über den in Schema 15 dargestellten Biosyntheseweg erfolgen.^[96-98]

In den ersten Schritten wird der Pyrrolring oxidativ geöffnet und der entstehende Formylrest von *N*-Formylkynurenin (**97**) hydrolytisch abgespalten. Das dabei entstehende Kynurenin (**98**) wird mit molekularem Sauerstoff und NADPH zum 3-Hydroxykynurenin (**99**) oxidiert, wobei ein Deuteriumatom verloren geht. Durch die Oxidation der α -Aminofunktion zu einer Ketogruppe entsteht 2-Amino-3-Hydroxybenzoylpyruvat (**100**). In den nächsten Schritten geht durch mehrmalige Wasserabspaltung wiederum eine Deuteriummarkierung am aliphatischen Rest verloren und es entsteht das kondensierte Ringsystem der 8-HChC (**58**).

^aLC-MS Bedingungen: H₂O (A, 0.5 % CH₃COOH), CH₃CN (B, 0.5 % CH₃COOH), min⁻¹ 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml



Schema 15: Vermuteter Biosyntheseweg der 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven über den Tryptophanstoffwechsel, nachgewiesen durch Umsatz von deuteriertem Tryptophan (**96**) zu 8-Hydroxy-5,6,7-²H₃-chinolin-2-carbonsäure

Würde die 8-HChC (**58**) über den Tryptophanmetabolismus biosynthetisiert werden, sollte man also die drei Deuteriummarkierungen im Massenspektrum wieder finden. Da die APCI eine relativ sanfte Fragmentierungsmethode ist, sollte der aromatische Ring mit den Deuteriumatomen stabil sein und die Markierungen so in jedem Fragment durch eine Erhöhung um die Masse 3 zu beobachten sein.

Das deuterierte Tryptophan (**96**) wurde als wässrige Lösung auf Blätter der Limabohne oder auch auf die künstliche Bohnennahrung gestrichen. Nach 24stündiger Fütterung der Larven von *Spodoptera exigua* und *Spodoptera littoralis* wurde Regurgitat gesammelt. Dieses wurde mit derselben Menge Methanol versetzt und der Überstand nach dem Abzentrifugieren per LC-MS analysiert.

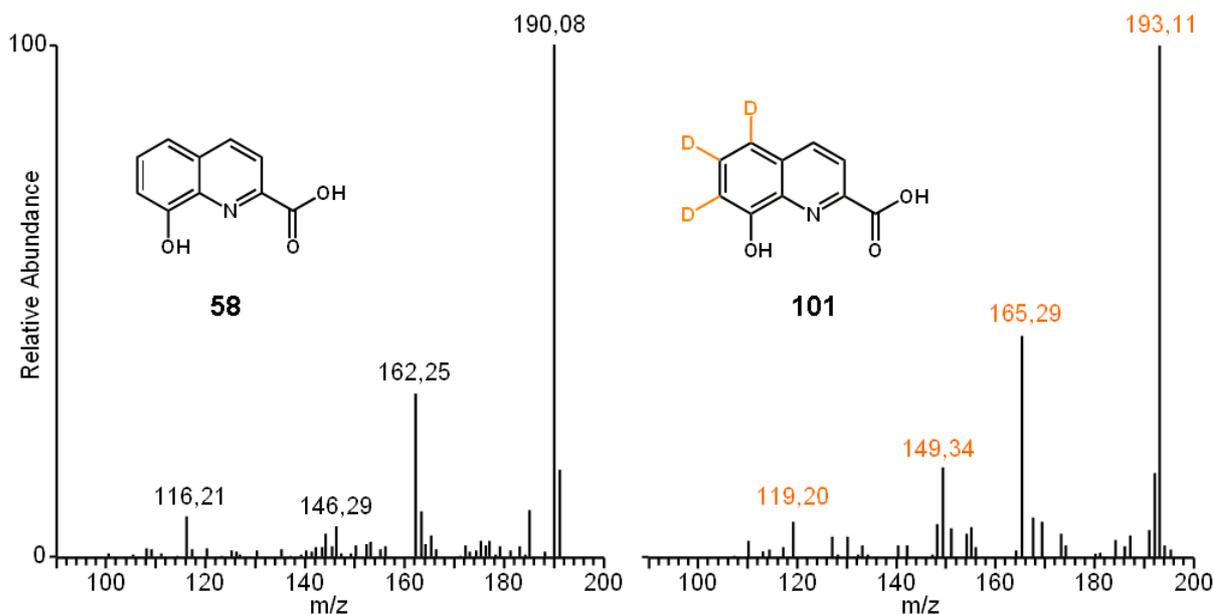


Abbildung 21: APCI-Massenspektren der natürlich vorkommenden 8-HChC (**58**) und 8-Hydroxy-5,6,7- $^{2}\text{H}_3$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**), die nach Fütterung von deuteriertem Tryptophan (**96**) im Darm von *Spodoptera* Larven nachgewiesen wurde

Im LC-MS-Chromatogramm^o beobachtet man nach Fütterung von deuteriertem Tryptophan (**96**) eine unbekannte Verbindung mit nahezu identischer Retentionszeit und ähnlichem Fragmentierungsmuster wie das der 8-HChC (**58**). Die Fragmente unterschieden sich um je drei Masseneinheiten (Abbildung 21) und bestätigen damit den Einbau des deuterierten Tryptophans (**96**). Mit Hilfe dieser Fütterungsstudie konnte also eindeutig gezeigt werden, dass die Biosynthese der 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven stattfindet und diese ein Produkt des Tryptophanmetabolismus ist. Tryptophan (**57**) gehört zu den essentiellen Aminosäuren und wird über die Pflanzennahrung aufgenommen.

Untersuchungen zur Geschwindigkeit der Biosynthese der 8-Hydroxy-5,6,7- $^{2}\text{H}_3$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**) konnten zeigen, dass das markierte Produkt bereits nach etwa einer Stunde nachweisbar war. Der Anteil der 8-Hydroxy-5,6,7- $^{2}\text{H}_3$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**) im Verhältnis zur natürlichen 8-HChC (**58**) stieg dabei binnen 24 h auf ein Maximum von ca. 40 %. Dass deren Anteil nicht weiter steigt, ist unter anderem dadurch erklärbar, dass die Raupen aus dem Blattmaterial neben dem deuterierten Substrat auch natürliches Tryptophan (**57**) aufnehmen, welches ebenfalls zur 8-HChC (**58**) umgesetzt werden sollte.

^oLC-MS Bedingungen: H_2O (A, 0,5 % CH_3COOH), CH_3CN (B, 0,5 % CH_3COOH), min^{-1} 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min), Flussrate 0.2 ml

3.4.3.2 Fütterung von Antibiotika

Sowohl Insekten als auch Bakterien bilden eine Vielzahl von Chinolinsäurederivate über den Tryptophanmetabolismus.^[61,63,65,66] Damit kommen sowohl die *Spodoptera* Larven selbst, als auch deren Darmbakterien als Produzenten der 8-HChC (**58**) in Frage. Um diese Frage zu beantworten, wurden Fütterungsstudien mit verschiedenen Antibiotika durchgeführt. Wäre die 8-HChC (**8**) bakteriellen Ursprungs, so sollte nach Fütterung von Antibiotika deren Konzentration im Darm signifikant sinken. Um sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien zu untersuchen, wurden entsprechende Antibiotika verwendet, die sich außerdem durch unterschiedliche Wirkungsmechanismen auszeichnen. So inhibieren z. B. Erythromycin und Tetracyclin die Proteinbiosynthese Gram-positiver Bakterien.^[99] Tetracyclin ist zusätzlich gegen Gram-negative Bakterien aktiv.^[100] Während Vancomycin die Zellwandsynthese Gram-positiver Bakterien inhibiert,^[101] zerstört Polymyxin die Zellmembranen Gram-negativer Bakterien.^[102] Das ebenfalls gegen Gram-negative Bakterien wirksame Fosmidomycin inhibiert deren DXP^p-Reduktase.^[103,104]

Zur Untersuchung des Effekts der verschiedenen Antibiotika wurden jeweils die Peakflächen der Molpeaks $[M+H]^+$ der 8-HChC (**58**) ($m/z = 190$) und der 8-Hydroxy-5,6,7- $[-^2H_3]$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**) ($m/z = 193$) bestimmt. Das Verhältnis von 8-HChC (**58**) und 8-Hydroxy-5,6,7- $[-^2H_3]$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**) beträgt nach 24-stündiger Fütterung deuterierten Tryptophans (**96**) ca. 60 % : 40 % und bleibt auch nach längerer Zeit relativ stabil. Ist die 8-HChC (**58**) ein Produkt von Darmbakterien, sollte die Fütterung von Antibiotika eine Verringerung des Anteils an 8-Hydroxy-5,6,7- $[-^2H_3]$ -chinolin-2-carbonsäure (**101**) unter 40 % bewirken. Die Änderung des Verhältnisses wäre dadurch zu erklären, dass eine stark reduzierte Biosynthese im Darm stattfindet, also das deuterierte Tryptophan (**96**) nicht, oder nur zu geringem Anteil umgesetzt wird. Da die natürliche 8-HChC (**58**) jedoch bereits vor dem Versuch im Darm enthalten ist, würde sich das Verhältnis beider Verbindungen zugunsten der 8-HChC (**58**) verschieben.

^pDXP - 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat

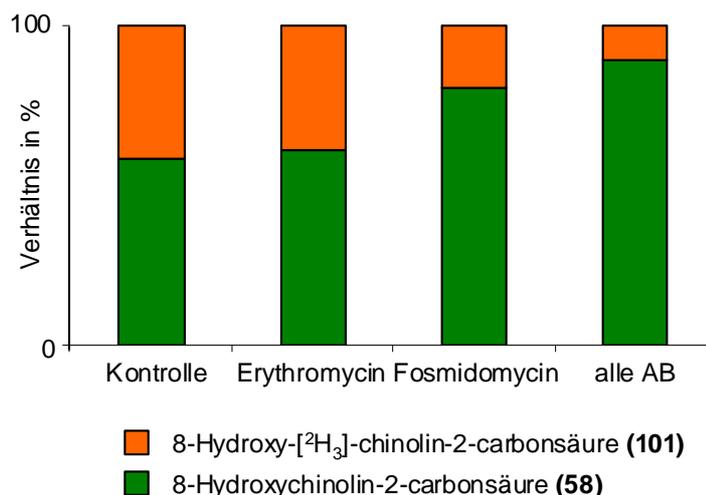


Abbildung 22: Verhältnis von natürlicher 8-HChC (**58**) zu 8-Hydroxy-5,6,7-²H₃-chinolin-2-carbonsäure (**101**) nach Fütterung diverser Antibiotika im Fall von je 5 Larven von *Spodoptera exigua*

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Antibiotikafütterung für *Spodoptera exigua* zusammengefasst. Die Kontrolle mit Wasser zeigt das beschriebene Verhältnis beider Verbindungen von 60 % zu 40 %. Im Fall von Erythromycin kann man keinen signifikanten Einfluss auf die Biosynthese von 8-Hydroxy-5,6,7-²H₃-chinolin-2-carbonsäure (**101**) erkennen. Dies lässt sich unter anderem damit erklären, dass die Raupen während der Aufzucht im Labor über Generationen gerade mit weit verbreiteten Antibiotika wie Erythromycin aufgezogen wurden und die Darmbakterien eventuell Resistenzen dagegen entwickelt haben könnten. Bei allen weiteren getesteten Antibiotika ist ein deutlicher Rückgang der synthetisierten 8-Hydroxy-5,6,7-²H₃-chinolin-2-carbonsäure (**101**) deutlich erkennbar. Speziell im Fall von Fosmidomycin fällt der beobachtete Rückgang am stärksten aus. Da es sich bei Fosmidomycin um ein relativ neues Antibiotikum handelt, ist es denkbar, dass die Darmbakterien noch keine Resistenzen dagegen entwickeln können und dessen Effekt deshalb besonders deutlich ist. Weiterhin fällt auf, dass sowohl die Antibiotika gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Bakterien einen Effekt auf die Bildung der 8-Hydroxy-5,6,7-²H₃-chinolin-2-carbonsäure (**101**) zeigten. Chinolinsäurederivate sind von Gram-positiven Streptomyceten bekannt.^[65] Man findet sie aber auch bei Gram-negativen *Pseudomonas* Species, wenngleich es sich dabei um ein Umlagerungsprodukt bzw. einen „Dead-End-Metaboliten“ handelt.^[67]

Da die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse nur ungenügend reproduzierbar waren, ist die Aussagekraft dieser Studie begrenzt. Nur in wenigen Fällen konnte ein derart deutlicher Effekt beobachtet werden. Bei *Spodoptera littoralis* konnten kein Effekt der Antibiotika festgestellt werden.

3.4.3.3 Untersuchung isolierter Darmbakterien auf deren Fähigkeit zur Biosynthese der 8-HChC

Da die Antibiotikastudie keine eindeutige Antwort zum Ursprung der 8-HChC (**58**) lieferte, schien alternativ die Isolierung von Mikroorganismen aus dem Insektendarm und deren anschließende Untersuchung auf die Produktion der 8-HChC (**58**) sinnvoll. Dazu wurden Därme von *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera exigua* präpariert und anschließend auf diversen Nährmedien ausplattiert (Kapitel 6.3). Da Chinolinderivate in der Literatur u. a. bei Streptomyceten bekannt sind, wurde zur Isolierung der Darmbakterien neben klassischem LB-Medium auch ein spezieller Actinomyceten-Isolationsagar verwendet (Kapitel 6.3). Auf LB-Platten wurden insgesamt 25 Isolate gewonnen, während auf dem Actinomyceten-Isolationsagar drei Kulturen gefunden wurden. Hierbei sei erwähnt, dass diese nicht identifiziert wurden und somit eine Mehrfachisolierung einzelner Arten nicht auszuschließen ist.

Zur Untersuchung der Kulturen auf die Präsenz der 8-HChC (**58**) wurden die Bakterien mit 70%igem Ethanol extrahiert und mittels LC-MS^a analysiert. Es wurden sowohl Bakterien direkt von den Platten extrahiert, als auch aus Flüssigmedium nach 6, 12 und 24 h. Zwar konnte speziell bei den auf Actinomycetenagar wachsenden Kulturen nach einigen Tagen eine intensive Gelbfärbung beobachtet werden, die auf die 8-HChC (**58**) hätte hinweisen können, jedoch wurde die HChC (**58**) mittels LC-MS in keinem der isolierten Organismen gefunden.

3.4.3.4 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Biosynthese der 8-HChC im Insektendarm

Die Ergebnisse der einzelnen Studien zur Biosynthese der 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven können die Frage nach deren Ursprung letztlich nicht eindeutig beantworten. Jedoch deuten viele Beobachtungen wie deren Verbreitung ausschließlich in *Spodoptera* Larven auf ein Produkt des Insekts selbst hin. Auch die

Antibiotikastudien konnten keinen eindeutigen Beweis für ein bakterielles Produkt erbringen. Da eventuelle mikrobielle Produzenten aufgrund des nachgewiesenen pH-Gradienten nur bestimmte Darmabschnitte besiedeln sollten, würde man deren selektive Verteilung im Darm erwarten. Da die 8-HChC (**58**) jedoch im gesamten Darm in relativ hohen Konzentrationen vorkommt (Kapitel 3.4.2), spricht dies tendenziell gegen diese Hypothese. Die hohen Konzentrationen der 8-HChC (**58**) vor allem in jüngeren Insektenlarven (Kapitel 3.4.2) lässt einen Zusammenhang mit dem Wachstum der Larven und damit die 8-HChC (**58**) als ein Produkt des Insekts selbst vermuten. Ein möglicher Nutzen dieser Verbindung für die Raupe bzw. deren mögliche Involvierung in Insekten-Pflanzen-Interaktionen werden in den folgenden Kapiteln eingehend untersucht und beschrieben.

3.4.4 Untersuchungen zum Einfluss der 8-HChC auf die Verteidigung von Mais

Chinolinderivate sind aufgrund ihrer Struktur geeignete Liganden für Komplexe mit diversen Metallionen. Von der Chinolin-2-carbonsäure (**102**) sind in der Literatur verschiedene Komplexe mit bivalenten Ionen, z. B. Mn(II), Co(II), Ni(II), V(IV), Zn(II), Fe(II) und Cu(II) beschrieben.^[105,106,107,108,109] Für die im Darm von *Spodoptera* Larven vorkommende 8-HChC (**58**) sind ebenfalls einige Komplexe mit Cu(II),^[110] Ni(II)^[111] und Co(II)^[111] beschrieben. Um den möglichen Nutzen der 8-HChC (**58**) im Insektendarm zu untersuchen, wurde deren Eigenschaft als Chelator verschiedener Metallionen fokussiert.

Die *N*-Acylglutamine aus dem Darm von *Spodoptera* Larven induzieren im Fall von Mais deren Verteidigung z. B. in Form der intensiven Biosynthese und Emission verschiedener Duftstoffe (Abbildung 23). Neben der verstärkten Bildung kontinuierlich emittierter Duftstoffe, wie Hexenylacetat (**18**) und Linalool (**19**), wird neben aromatischen Verbindungen wie Indol (**22**) vor allem die Biosynthese verschiedener Sesquiterpene wie Caryophyllen (**23**), Bergamoten (**24**) und Farnesen (**25**) induziert.

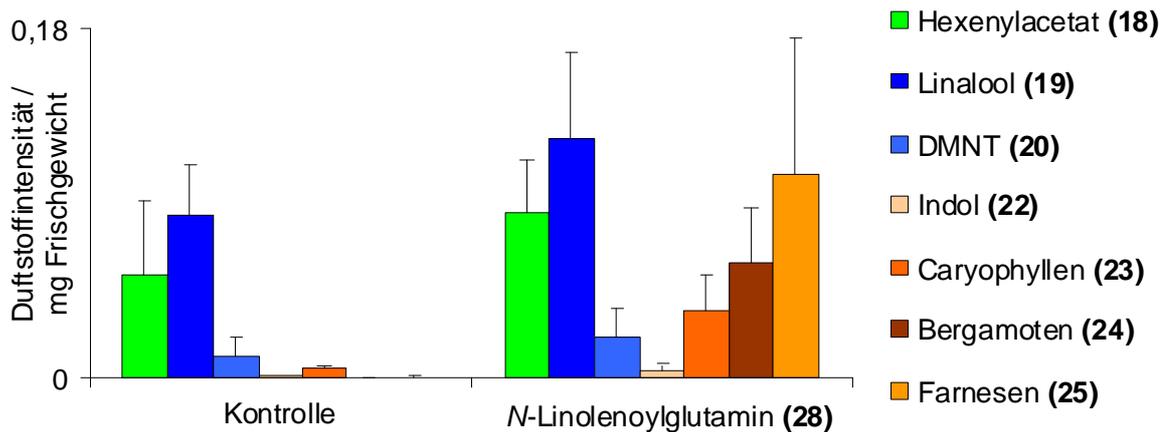


Abbildung 23: Duftstoffemission^a von Mais nach Zugabe von *N*-Linolenoylglutamin (**28**) aus dem Regurgitat von *Spodoptera* Larven (N = 12), siehe auch Tabelle 4

Tabelle 4: Zunahme der Duftstoffemission von Mais nach 24stündiger Inkubation mit dem Elicitor *N*-Linolenoylglutamin (**28**), *bei Kontrolle nicht detektiert

Duftstoffe von Mais	Zunahme [%]
Hexenylacetat (18)	60
Linalool (19)	46
DMNT (20)	87
Indol (22)	*
Caryophyllen (23)	590
Bergamoten (24)	*
Farnesen (25)	*

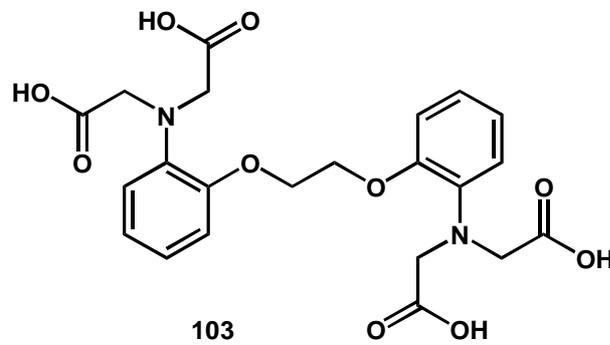
In solchen pflanzlichen Signalprozessen spielen verschiedene Ionen, wie z. B. Calcium, vermutlich eine wichtige Rolle. Da die 8-HChC (**58**) beim Fraß von *Spodoptera* Larven an Pflanzen genauso wie die *N*-Acylglutamine in das Blatt gelangen, wäre es denkbar, dass diese durch die Komplexbildung von Ionen wie z. B. Calcium in der Pflanze deren Signalprozesse stört und z. B. die Duftstoffbiosynthese

^aGC-Bedingungen: Säule: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 1.5 ml min⁻¹, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, mit 10 °C min⁻¹ auf 200 °C, mit 30 °C min⁻¹ auf 280 °C, 1 min bei 280 °C, Injektortemperatur: 220 °C, Split: 1 : 10

steigenden Calciumkonzentrationen entgegenzuwirken kann (mündliche Mitteilung Axel Mithöfer). Vermutlich resultiert dies aus der Komplexierung der Calciumionen durch die 8-HChC (**58**).

3.4.4.1 Einfluss des Calciumchelators BAPTA auf die Duftstoffemission von Mais

Um die Involvierung von Calciumionen in die Duftstoffbiosynthese von Mais zu prüfen, wurde der spezifische Calciumchelator 1,2-Bis-(*o*-aminophenoxy)-ethan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (BAPTA) (**103**) eingesetzt (Schema 16).^[112]



Schema 16: Strukturformel des Calciumchelators 1,2-Bis(*o*-aminophenoxy)-ethan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (BAPTA) (**103**)

Zur Untersuchung dieser Theorie wurden Maispflanzen mit *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) als Elicitor der Duftstoffbiosynthese versetzt und in einem Vergleichsexperiment zusätzlich BAPTA (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugegeben. Die Duftstoffe wurden mittels des Closed-Loop-Stripping-Verfahrens gesammelt (Kapitel 6.11).

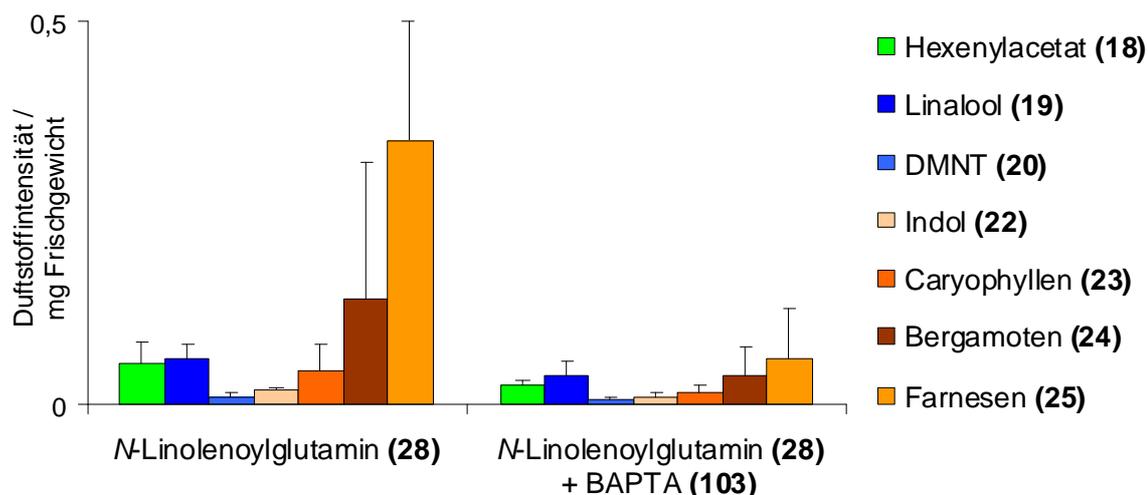


Abbildung 24: Einfluss des Calciumchelators BAPTA (103) auf die Duftstoffbiosynthese^r von Maispflanzen, BAPTA (103) führt zu einer verminderten Duftstoffbiosynthese von Mais (N = 10)

Wie Abbildung 24 zeigt, konnte durch Zugabe von BAPTA (103) eine teilweise starke Reduktion nahezu aller durch *N*-Linolenoylglutamin (28) induzierten Duftstoffe verzeichnet werden. Die Ergebnisse legen die Involvierung von Calciumionen in pflanzliche Verteidigungsmechanismen wie die Duftstoffbiosynthese von Mais nahe.

3.4.4.2 Einfluss der 8-HChC auf die Duftstoffemission von Mais

Nachdem ein Zusammenhang zwischen Calcium-Signalling und der Duftstoffbiosynthese bei Mais gezeigt werden konnte, wurde die 8-HChC (58) auf vergleichbare Eigenschaften getestet. Dafür wurde ebenfalls das Closed-Loop-Stripping-Verfahren angewandt.

Zunächst einmal konnte ein Duftstoffe induzierender Effekt der 8-HChC (58) ausgeschlossen werden (Abbildung 25).

^rGC-Bedingungen: Säule: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 3 ml min⁻¹, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, mit 10 °C min⁻¹ auf 200 °C, mit 30 °C min⁻¹ auf 280 °C, 1 min bei 280 °C, Injektortemperatur: 220 °C, Split: 1 : 10

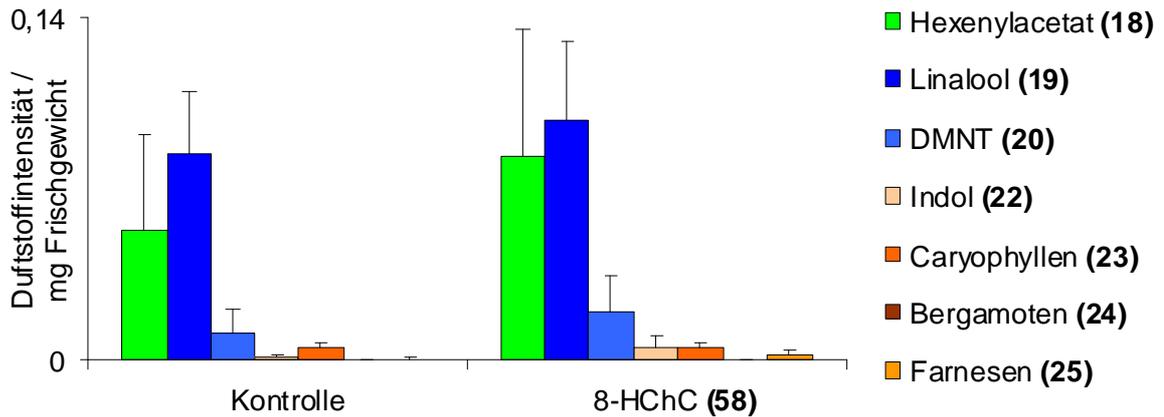


Abbildung 25: Kontrollversuch zur möglichen Induktion der Duftstoffbildung von Maispflanzen durch die 8-HChC (**58**). Es wurde keine Duftstoffinduktion beobachtet (N = 12)

In einem weiteren Versuch wurden Maispflanzen für 24 h mit *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) versetzt und parallel zusätzlich 8-HChC (**58**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) appliziert. Anschließend wurden die Duftstoffe für 24 h gesammelt. Wie in Abbildung 26 dargestellt ist, konnte kein inhibierender Effekt der 8-HChC (**58**) wie im Fall von BAPTA (**103**) nachgewiesen werden. Weder die Emission der Sesquiterpene noch die der permanent detektierbaren Duftstoffe Hexenylacetat (**18**) und Linalool (**19**) wurden nennenswert beeinflusst.

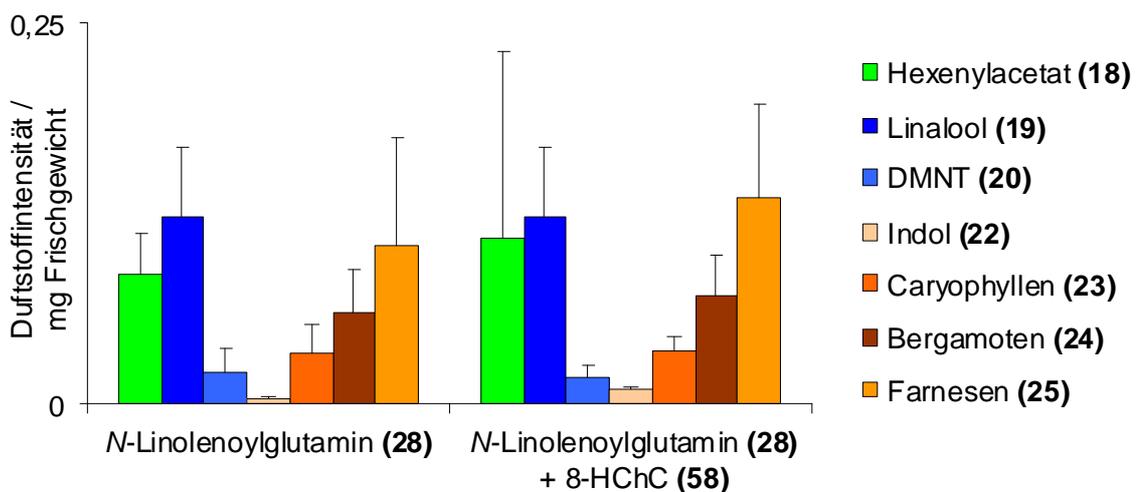


Abbildung 26: Einfluss der 8-HChC (**58**) auf die Duftstoffbiosynthese von Maispflanzen nach Zugabe von *N*-Linolenoylglutamin (**28**) als Elicitor. Es wurde kein Rückgang der Duftstoffemission verzeichnet (N = 12)

Es wurde vermutet, dass der Effekt der 8-HChC (**58**) sehr gering ist. Zum Nachweis wurden Maispflanzen für 24 h mit der 8-HChC (**58**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) und als Kontrolle mit Leitungswasser inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen mit dem Elicitor der Duftstoffbiosynthese *N*-Linolenoylglutamin (**28**) versetzt und die Duftstoffe für 24 h über das Closed-Loop-Stripping-Verfahren gesammelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine 24stündige Vorinkubation der Maispflanzen mit 8-HChC (**58**) zu einer leicht verringerten Emission speziell der Sesquiterpene Caryophyllen (**23**), Bergamoten (**24**) und Farnesen (**25**) führte. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch für die natürliche Interaktion zwischen *Spodoptera* Larven und Maispflanzen zu vernachlässigen, da beim Fraßvorgang sowohl die *N*-Acylglutamine als auch die 8-HChC (**58**) gleichzeitig in das Blatt gelangen.

3.4.4.3 Einfluss der 8-HChC auf die Genexpression von Mais

Parallel zu den Untersuchungen zum Einfluss der 8-HChC (**58**) auf die Duftstoffbiosynthese von Mais mittels des Closed-Loop-Stripping-Verfahrens (Kapitel 6.11) wurde auch der Einfluss der 8-HChC (**58**) auf die Expression diverser Verteidigungsgene von Mais untersucht. Dafür wurden exemplarisch Gene der indirekten chemischen Verteidigung aus dem Sekundärmetabolismus, wie z. B. die Terpensynthasen 1 (TPS 1) und 5 (TPS 5) ausgewählt, welche in die Biosynthese verschiedener Sesquiterpene involviert sind.^[113] Weiterhin wurde die Indol-Glycerol-Lyase (IGL) aus dem Primärmetabolismus untersucht, die für die Biosynthese von Indol (**22**) verantwortlich ist.^[114] Aber auch Gene zur Regulation direkter Verteidigungssubstanzen wie BX 1 und BX 6 wurden untersucht, die die Produktion von 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIBOA) (**104**) und 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIMBOA) (**105**) vor allem in jüngeren Pflanzen und in Maiskeimlingen steuern. Diese Verbindungen sind z. B. gegen den Maiszünsler *Ostrinia nubilalis*, einem Fraßfeind von Maispflanzen wirksam.^[115]

Die Maispflanzen wurden nach demselben Prinzip wie für die Untersuchungen zur Duftstoffbiosynthese mittels des Closed-Loop-Stripping-Verfahrens für 24 h mit *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) bzw. zusätzlich mit der 8-HChC (**58**) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert. Die Pflanzen wurden tiefgefroren und deren RNA mittels RNeasy Micro Kit[®] von Quiagen[®] gewonnen (Kapitel 6.15).

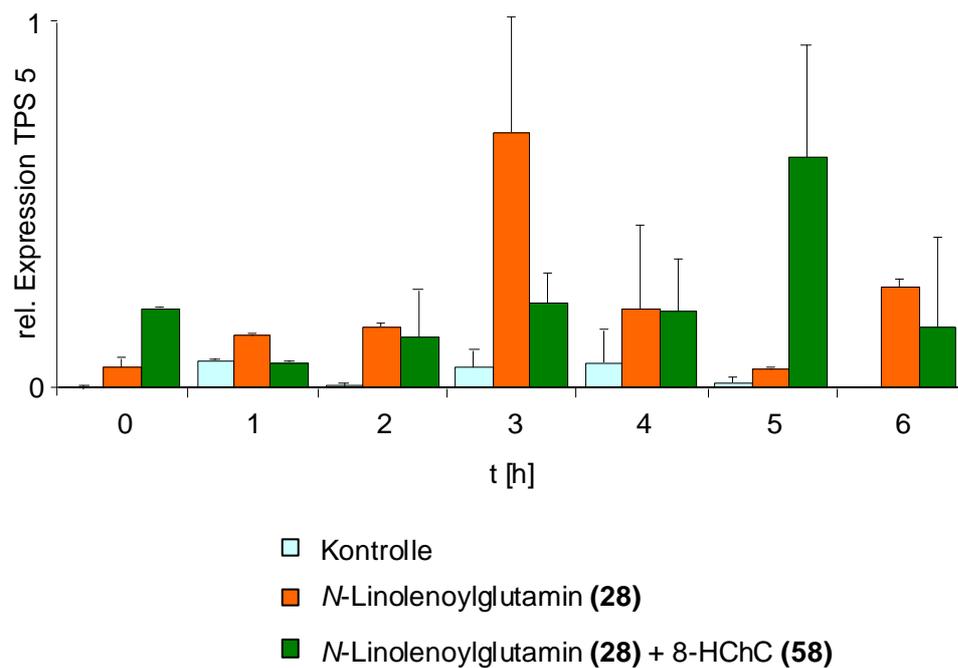


Abbildung 27: Expression der Terpensynthase 5 (TPS 5) von *Zea mays* nach Inkubation mit *N*-Linolenoylglutamin (**28**) und zusätzlicher Applikation mit 8-HChC (**58**) (N = 3)

In Abbildung 27 ist exemplarisch das Ergebnis der Expression für die Terpensynthase 5 (TPS 5) dargestellt. Die Expression des Gens erreichte drei Stunden nach Zugabe von *N*-Linolenoylglutamin (**28**) ein Maximum. Bei zusätzlicher Applikation der 8-HChC (**58**) beobachtet man dieses Expressionsmaximum erst 2 h später. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Versuchen zur Quantifizierung der Duftstoffemission, kann man nur vermuten, dass die Genexpression zwar minimal verzögert stattfindet, dabei jedoch der Einfluss auf die emittierte Duftstoffmenge vernachlässigbar klein ist. Im Fall der anderen getesteten Verteidigungsgene ließ sich ebenfalls kein signifikanter Effekt der 8-HChC (**58**) nachweisen.

Es lässt sich damit feststellen, dass die 8-HChC (**58**) der durch die *N*-Acylglutamine induzierten pflanzlichen Abwehr nicht entgegenwirkt. Da die 8-HChC (**58**) jedoch im Darm von *Spodoptera* Larven gebildet wird (Kapitel 3.4.3) und auch in relativ hoher Konzentration im Darm vorhanden ist (Kapitel 3.4.2), sollte diese in jedem Fall eine andere Bedeutung für die Larven haben. Dies wird im folgenden Kapitel näher untersucht.

3.4.5 8-HChC als Siderophor

3.4.5.1 Elementaranalyse des Regurgitats von *Spodoptera* Larve

Mittels einer Elementaranalyse sollten mögliche Anhaltspunkte für besonders häufige Metallionen im Darm gefunden werden. Dazu wurde Regurgitat mittels Röntgenfluoreszenzanalyse bei Herrn Prof. Einax in der Abteilung für Analytische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena charakterisiert.

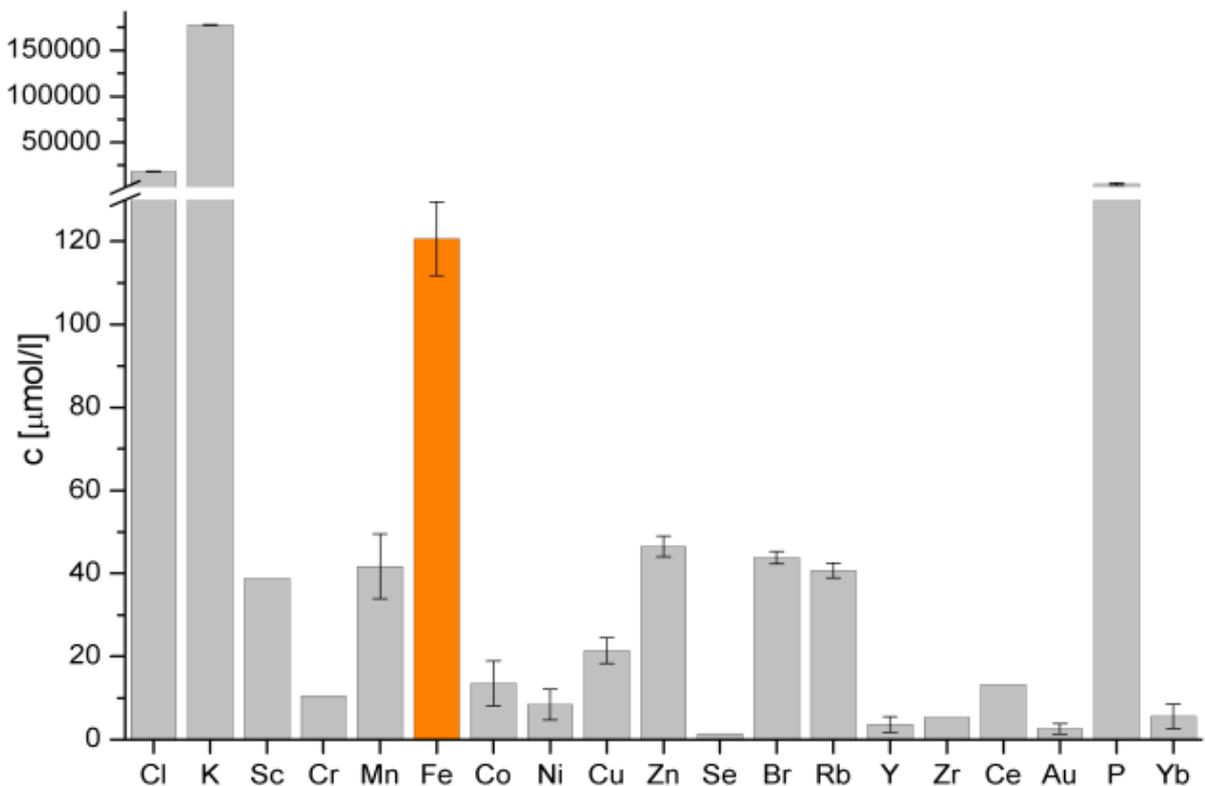


Abbildung 28: Gehalt des Regurgitats an einzelnen Elementen ermittelt mittels Röntgenfluoreszenzanalyse

Wie in Abbildung 28 dargestellt, sind die am häufigsten vorkommenden Elemente im Regurgitat vor allem Kalium und Chlor, die wahrscheinlich aus diversen gelösten Salzen der Pflanzennahrung stammen, sowie Phosphor z. B. aus Phosphaten. Die meisten anderen Elemente sind in verhältnismäßig geringen Mengen enthalten. Lediglich Eisen findet man noch in etwas höheren Konzentrationen. Auffällig ist, dass kein Calcium gefunden wurde, das prinzipiell in der pflanzlichen Nahrung von *Spodoptera* Larven enthalten sein sollte. Offensichtlich ist die Gesamtmenge des

Calciums in der Pflanze verhältnismäßig gering. Mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurde ebenfalls die Konzentration an Calcium im Regurgitat bestimmt. Diese lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von 70 nmol ml^{-1} .

Eisen ist in vielen Enzymen enthalten und für deren katalytische Eigenschaften mitverantwortlich. Da im Darm von *Spodoptera* Larven relativ große Mengen Eisen zu finden sind, stellte sich die Frage, ob die 8-HChC (**58**) dieses komplexieren könnte. Dabei käme zum einen eine Funktion als Transporter von Eisenionen in Frage. Des Weiteren wäre eine Inhibierung bestimmter Stoffwechselprozesse durch Bindung von Eisen möglich. *Microbacterium arborescens* aus dem Darm von *Spodoptera* Larven bildet eine *N*-Acyl-Aminosäure-Hydrolase (AAH), die in die Homeostase der *N*-Acylglutamine^[82] und den Abbau von bakteriellen Kommunikationsmolekülen (Kapitel 3.3.7) involviert ist. Da die AAH viel Eisen enthält, sollte deren Biosynthese größere Mengen Eisen erfordern. Die 8-HChC (**58**) könnte also beispielsweise von *Spodoptera* Larven produziert werden, um die Bildung von Enzymen wie der AAH von *Microbacterium arborescens* zu kontrollieren bzw. zu inhibieren.

Versuche in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die AAH in Anwesenheit der 8-HChC (**58**) nicht gebildet wird (mündliche Mitteilung, Jelena Pesek). Dieses Ergebnis legt eine Komplexierung des Eisens nahe, was im Folgenden näher untersucht wurde.

3.4.5.2 UV-VIS-Spektroskopische Untersuchungen des Komplexes der 8-HChC mit Fe(II)

Versetzt man eine ethanolische oder wässrige Lösung der 8-HChC (**58**) mit Eisensalzlösungen wie FeSO_4 , FeCl_2 oder $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, beobachtet man einen Farbumschlag der zuvor jeweils schwach gelblichen Lösungen in ein tiefes, intensives Blau (Abbildung 29). Das UV-Spektrum der 8-HChC (**58**) wird im wesentlichen durch die Absorptionsbanden der Hydroxyfunktion (210 nm), der Säurefunktion (270 nm) und des aromatischen Systems (370 nm) bestimmt. Nach Zugabe oben beschriebener Eisensalze beobachtet man die Bildung zweier weiterer Banden bei 483 und 612 nm. Diese Lichtabsorptionen legen sogenannte Charge-

Transfer-Übergänge nahe, bei denen Elektronen des Liganden in freie Orbitale des Zentralatoms übertragen werden.

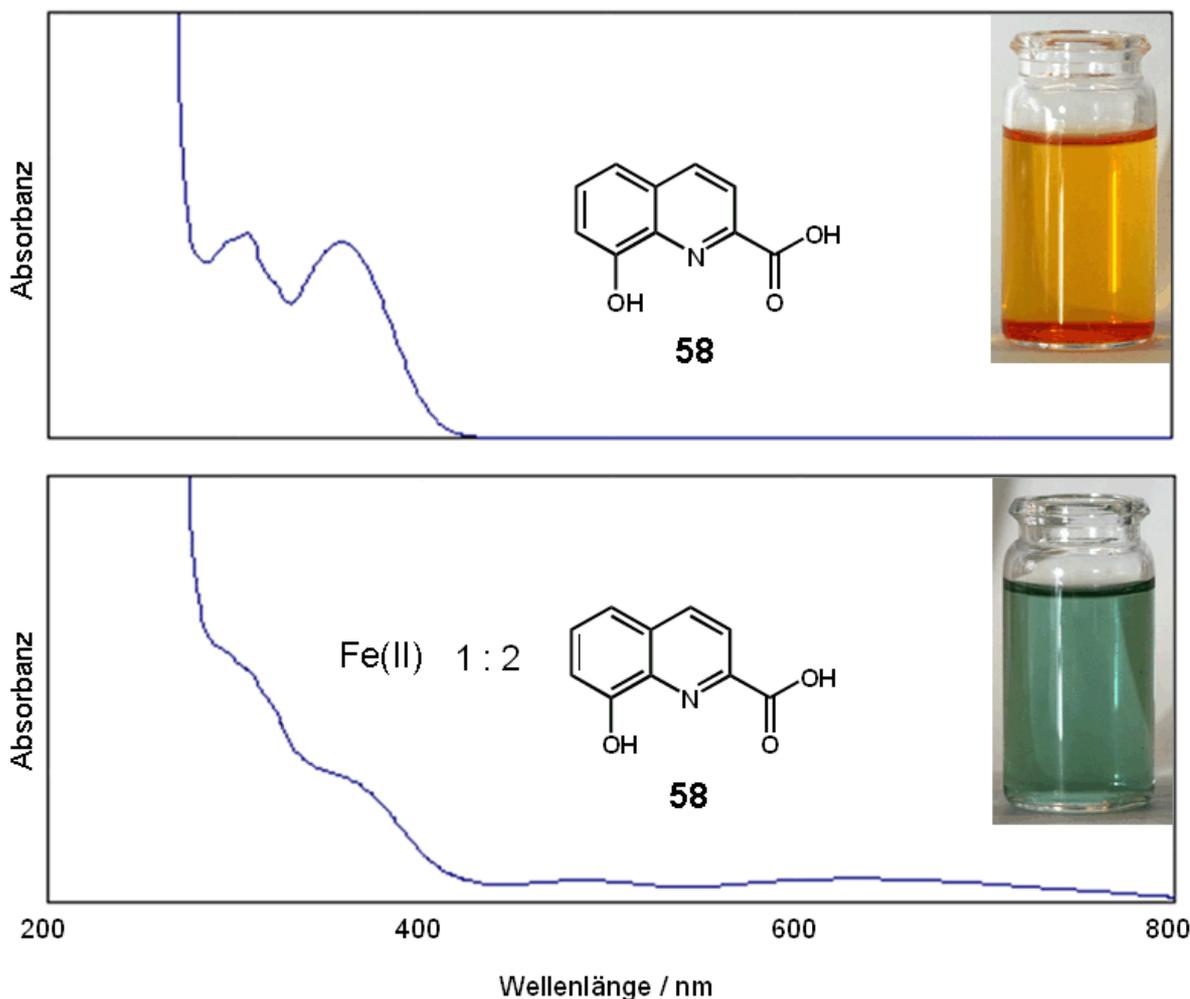


Abbildung 29: oben: UV-VIS-Spektrum der 8-HChC (**58**); unten: in Gegenwart von Fe^(II), die Absorptionsbanden bei 483 und 610 nm weisen auf die Entstehung eines Charge-Transfer-Komplexes hin

Die UV-Spektren der Komplexe der 8-HChC (**58**) mit Fe(II) und Fe(III) sind nahezu identisch. Während der Fe(II)-Komplex tief blau ist, beobachtet man jedoch beim Fe(III)-Komplex eine bläulich-grünliche Färbung. Der Farbunterschied ist möglicherweise auf die leichten Intensitätsunterschiede der Charge-Transfer-Bande bei 612 nm zurückzuführen. Da diese Farbunterschiede stabil waren, kann eine spontane Oxidation von Fe(II) zum Fe(III) in der Komplexlösung ausgeschlossen werden.

Kinetische Untersuchungen des Komplexes ergaben, dass die Charge-Transfer-Banden nach etwa 30 min ein Maximum erreichten (Abbildung 30).

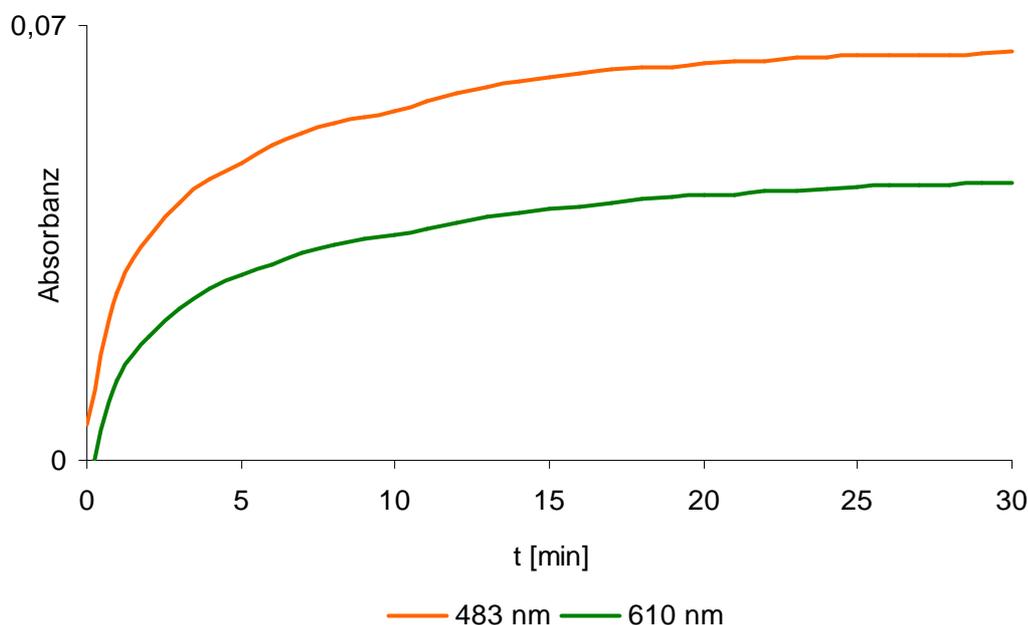


Abbildung 30: Intensitätszunahme der Charge-Transfer-Banden des Komplexes nach Zugabe von Fe(II)-Ionen zur 8-HChC (**58**)

3.4.5.3 Kristallisation des Komplexes der 8-HChC mit Fe(II)

In der Literatur sind bereits Komplexe der 8-HChC (**58**) mit Co(II) und Ni(II) mitsamt der jeweiligen Röntgenstruktur bekannt.^[107] Sollte die 8-HChC (**58**) im Darm von *Spodoptera* Larven eine Funktion als Siderophor besitzen, wäre es von großem Interesse, das Verhältnis von Ligand und Zentralatom im Komplex zu kennen. Zur Aufklärung von Komplexstrukturen ist die Röntgenstrukturanalyse die Methode der Wahl. Darum wurden umfangreiche Versuche getätigt, Kristalle des jeweiligen Fe(II)- bzw. Fe(III)-Komplexes zu gewinnen. Wie bereits beschrieben, wurden dazu verschiedene Eisensalze wie FeSO₄, FeCl₂ und Fe(ClO₄)₂ sowie verschiedene Lösungsmittel verwendet. Die Literatur beschreibt die Bildung von Kristallen nach ca. drei Tagen.^[107,111] Im diesem speziellen Fall wurde innerhalb dieses Zeitraumes keine sichtbare Kristallbildung beobachtet. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur und im Kühlschrank gelagert, um ein möglichst langsames Verdampfen des Lösungsmittels zu erreichen. Zunächst wurden mittels FeCl₂ und

$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ tiefblaue Kristalle einer maximalen Größe von ca. 30 μm erhalten. Da diese jedoch aufgrund der geringen Größe nicht für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren, wurden sie mittels IR-Spektroskopie charakterisiert (Kapitel 3.4.5.4). Die Kristalle wurden weiterhin als Impfkristalle für frische Lösungen zum Erhalt größerer Kristalle verwendet. Diese Versuche blieben jedoch ergebnislos.

Im Fall von FeSO_4 und der 8-HChC (**58**) in Ethanol konnten Kristalle einer Größe von ca. 200 μm gewonnen werden, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren. Dazu wurde eine hochkonzentrierte Lösung von FeSO_4 und Ligand im Verhältnis 1:2 in eine Kristallisierschale gegeben und diese mit Parafilm verschlossen. Kleine Löcher regulierten dabei das Verdampfen des Lösungsmittels (Abbildung 31). Da die Kristalle direkt an der Glasinnenseite am Übergang zur Komplexlösung entstanden, war die Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels in meinen Augen der entscheidende Faktor zur Gewinnung geeigneter Kristalle. Neben den Ansätzen in Kristallisierschalen stellte sich ein mittels Septum verschlossenes Reagenzglas ebenfalls als geeignet heraus. Das Verdampfen des Lösungsmittels wurde hierbei über eine Kanüle reguliert (Abbildung 31).

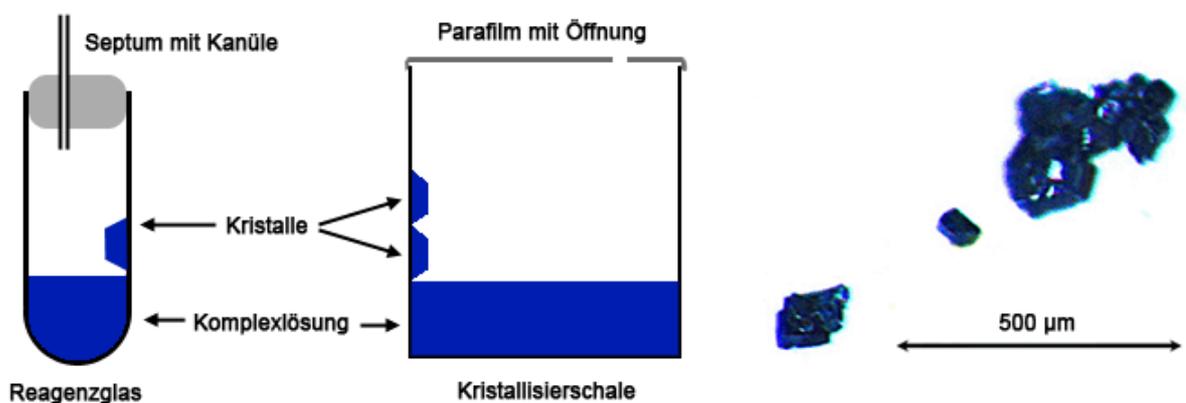


Abbildung 31: links: Versuchsaufbauten zur Kristallisation des Komplexes; rechts: Kristalle des Komplexes aus FeSO_4 und der 8-HChC (**58**), kristallisiert aus Ethanol;

In einer Kooperation mit Herrn Dr. Görls von der Friedrich-Schiller-Universität in Jena wurden diese Kristalle mittels Röntgenstrukturanalyse analysiert und die in Abbildung 32 dargestellte Strukturformel des Kristalls ermittelt. Die Orientierung von jeweils zwei Liganden um ein Eisenatom ist dabei mit den Komplexen der 8-HChC (**58**) mit $\text{Co}(\text{II})$ und $\text{Ni}(\text{II})$ vergleichbar.

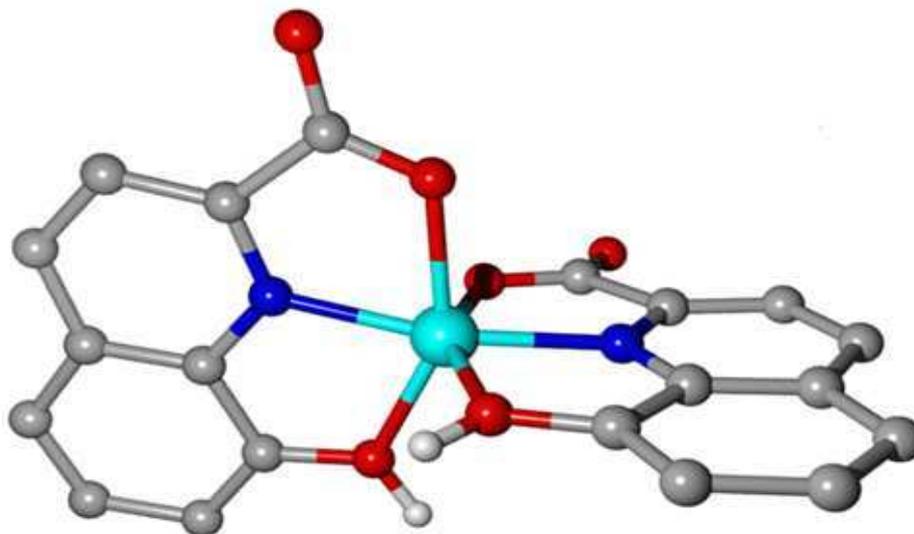


Abbildung 32: Röntgenstruktur des Fe(II)-8-HChC-Komplexes, kristallisiert aus FeSO_4 und 8-HChC (**58**) in Ethanol (weiß – H, grau – C, rot – O, blau – N, hellblau – Fe(II))

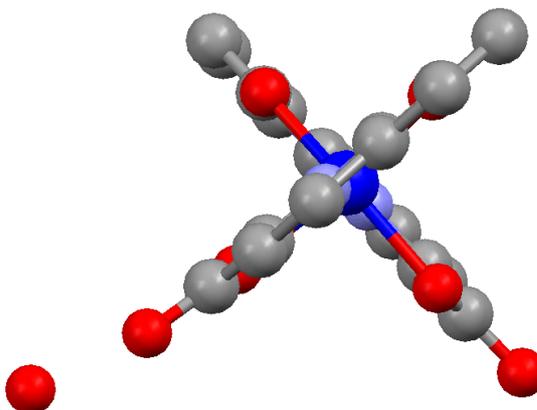


Abbildung 33: Orthogonale Orientierung der beiden Liganden, unten links ist ein Molekül Wasser zu erkennen

In Abbildung 33 ist gut die orthogonale Position der beiden Liganden zueinander zu erkennen. Die Säuregruppen der 8-HChC (**58**) sind deprotoniert, während die OH-Gruppen der Liganden protoniert bleiben. Um eine neutrale Gesamtladung zu erreichen, muss es sich also beim Zentralion um Fe(II) handeln. Das IR-Spektrum der Kristalle zeigt eine intensive OH-Schwingung, die weitaus intensiver ist, als die der OH-Gruppe des Liganden (Kapitel 3.4.5.4). Diese weist auf das Vorhandensein

von Kristallwasser hin. In Abbildung 34 ist die Raumstruktur des Komplexes dargestellt. Es ist gut erkennbar, dass pro Einheitszelle ein Molekül Wasser zwischen den Liganden koordiniert ist.

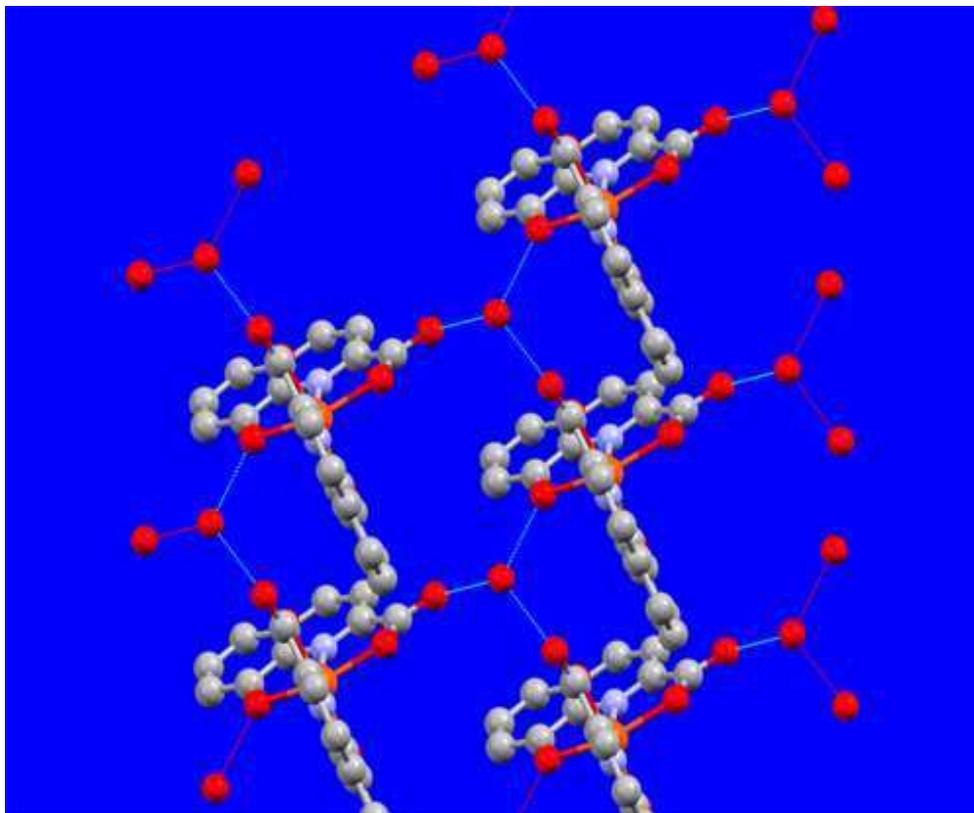


Abbildung 34: Koordination eines Wassermoleküls pro Einheit im Kristall des Fe(II)-8-HChC-Komplexes

Um auszuschließen, dass es sich beim Komplex um Fe(III) und statt des Wassers um ein Hydroxyd-Ion handeln könnte, wurde der Komplex in Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung bestimmt. Bei Anwesenheit der OH-Gruppe würde man einen alkalischen pH-Wert erwarten. Da die Messung einen neutralen pH-Wert ergab, kann man auf Fe(II) im Komplex schließen.

Für Fe(III) und 8-HChC (**58**) konnten keine Kristalle erhalten werden, die für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten waren. Die mögliche Kristallstruktur wird in Kapitel 3.4.5.4 mittels IR-Spektroskopie diskutiert.

3.4.5.4 IR-spektroskopische Untersuchungen der Kristalle

Da die zur Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle erst zum Ende dieser Arbeit erhalten werden konnten, wurden die kleineren Kristalle mit einer Größe von ca. 30 μm zunächst mittels IR-Spektroskopie charakterisiert.

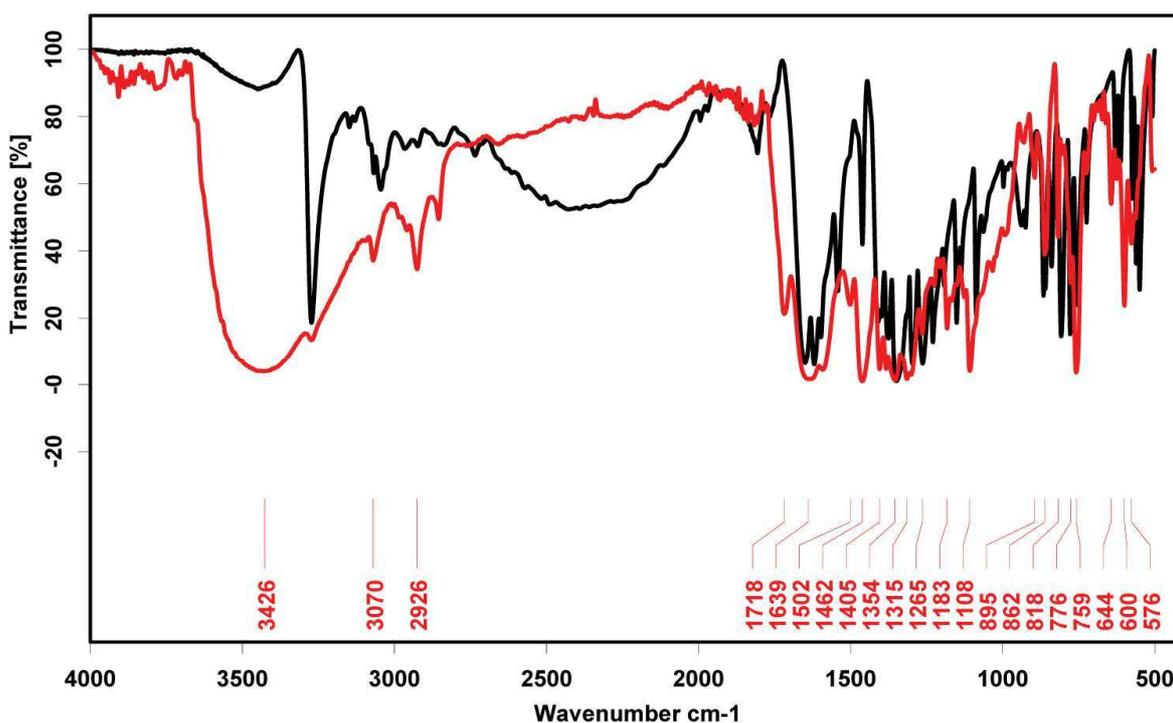


Abbildung 35: IR-Spektren des Fe(II)-8-HChC-Komplexes (rot) bzw. des Liganden (schwarz)

Abbildung 35 zeigt das IR-Spektrum eines Kristalls aus 8-HChC (**58**) und Fe(II) im Verhältnis 2:1 (rot). Die intensive OH-Bande bei 3426 cm^{-1} tritt beim freien Liganden selbst nicht in einer derartigen Intensität auf (schwarz) und deutet auf die Koordination freier Wassermoleküle im Kristall hin. Die breite Bande der Säurefunktion (2400 cm^{-1}) tritt im Kristall nicht auf und deutet auf deren Deprotonierung hin. Über die OH-Gruppe des Liganden lässt sich aufgrund der Überlagerung durch die intensive Wasserbande keine genauere Aussage treffen. Die aus dem IR-Spektrum gewonnenen Informationen bestätigen die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse (Kapitel 3.4.5.3).

Abbildung 36 zeigt die IR-Spektren eines blaugrünen Komplexkristalls der 8-HChC (**58**) mit Fe(III) (rot) im Vergleich mit dem freien Liganden (schwarz). Das

Fehlen der OH-Schwingung des Liganden (ca. 3500 cm^{-1}) im Komplex deutet auf deren Deprotonierung hin. Da die Säurefunktion der 8-HChC (**58**) auch im Komplex vorhanden ist, scheint diese nicht deprotoniert zu sein. Im Vergleich zur intensiven OH-Schwingung des Fe(II)-Komplexes aufgrund des Kristallwassers deutet deren Fehlen im Fe(III)-Komplex auf die Abwesenheit freier Wassermoleküle im Kristall hin.

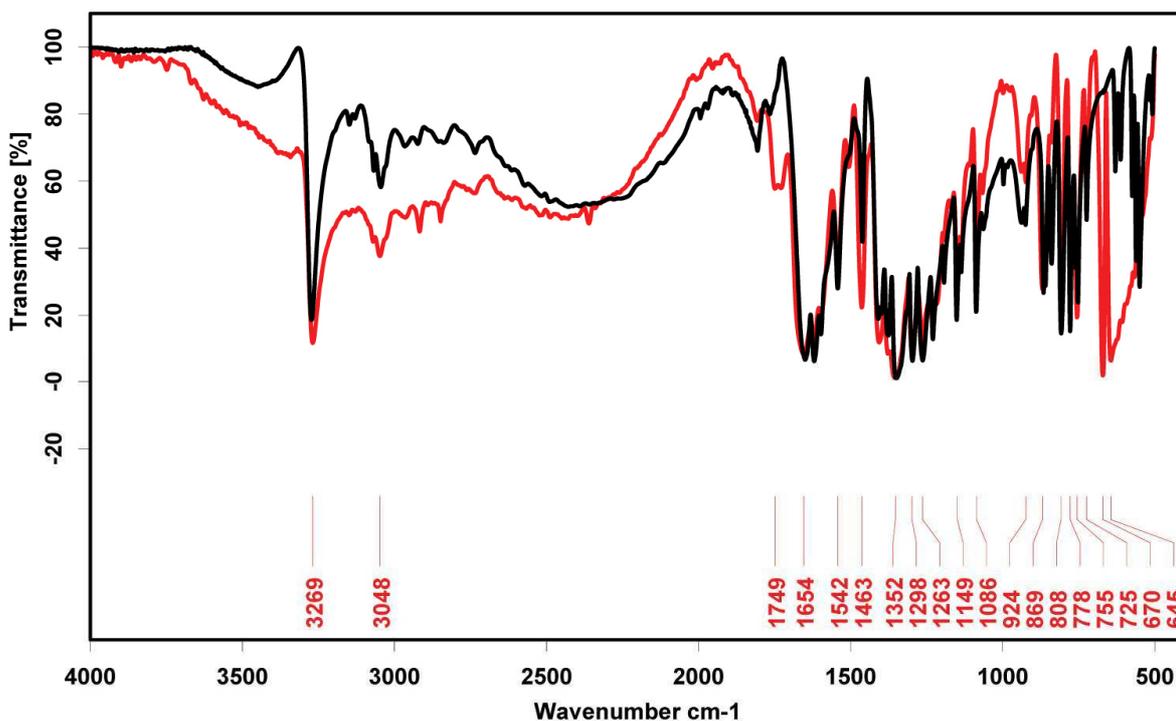


Abbildung 36: IR-Spektren des Fe(III)-8-HChC-Komplexes (rot) und des Liganden (schwarz)

3.4.6 Stabilität des Fe(II)-Komplexes unter physiologischen Bedingungen

Zur Charakterisierung der 8-HChC (**58**) als potentieller Siderophor im Darm von *Spodoptera* Larven sollte der entsprechende Fe(II)-Komplex auf dessen Membrandurchlässigkeit getestet werden. Da die polaren funktionellen Gruppen der Liganden im Komplex zum Zentralion hin koordiniert sind (Kapitel 3.4.5.3), sollte der Komplex nach außen hin relativ unpolar sein und theoretisch Zellmembranen passieren können. Der Versuch wurde mittels der in Kapitel 6.14 beschriebenen Apparatur durchgeführt.

Während dieses Versuchs wurde gezeigt, dass sich die blaue Komplexlösung nach Zugabe in die Pufferlösung spontan entfärbte und ein gelber Niederschlag ausfiel. Anschließende Versuche zur Aufklärung des Phänomens zeigten, dass sowohl die Präsenz von Kalium- als auch Natriumsalzen diesen Effekt hervorrief. Im Fall von Natrium fiel zunächst ein blauer Niederschlag aus, der sich jedoch nach einiger Zeit wie im Fall von Kalium gelb verfärbte. Bei dem gelben Niederschlag könnte es sich sowohl um die 8-HChC (**58**) als auch um FeOH handeln. Beobachtungen während der Kristallisationsversuche des Fe(II)-8-HChC-Komplexes haben gezeigt, dass der Ligand in Präsenz von Eisensalzen eine höhere Löslichkeit aufwies. Möglicherweise wird durch Zugabe von Natrium- oder Kaliumionen die Stabilität des Komplexes gestört und die verbesserte Löslichkeit der 8-HChC (**58**) wieder herabgesetzt.

Neben großen Mengen Kalium (Kapitel 3.4.5.1) ist auch die Präsenz von Natriumionen im Darm von *Spodoptera* Larven sehr wahrscheinlich. Diese Faktoren machen die Bildung und Stabilität von Fe-Komplexen der 8-HChC (**58**) im Darm sehr unwahrscheinlich und erklären unter anderem auch, warum der Komplex im Regurgitat nicht nachgewiesen werden konnte. Der Nutzen der 8-HChC (**58**) als Siderophor im Darm ist somit fraglich.

3.4.7 Einfluss der 8-HChC auf Chlorophyll

Das Blattmaterial im Darm von *Spodoptera* Larven enthält mit dem Chlorophyll große Mengen eines vierzähligen Chelatkomplexes mit Mg^{2+} als Zentralion. In diesem Zusammenhang wurde die 8-HChC (**58**) auf deren möglichen Einfluss auf die Stabilität des Chlorophylls hin untersucht. Die tiefgrüne Farbe des Chlorophylls entsteht durch den Charge-Transfer-Komplex des Porphyrinrings mit Mg^{2+} . Sollte die 8-HChC (**58**) die Stabilität des Komplexes herabsetzen, wäre dies durch einen Farbumschlag nachweisbar.

Dazu wurden 100 μg Chlorophyll in 1 ml Aceton gelöst und mit 0.5 ml 0.1 N NaOH versetzt. Die Hälfte des Volumens wurde entnommen und mit 1 mg 8-HChC (**58**) gemischt. Nach etwa 20 min konnte ein Farbumschlag von grün nach gelb beobachtet werden, der auf die Destabilisierung des Mg^{2+} -Komplexes durch die 8-HChC (**58**) hindeutete. Die Lösungen wurden mittels UV-VIS-Spektroskopie analysiert (Abbildung 37).

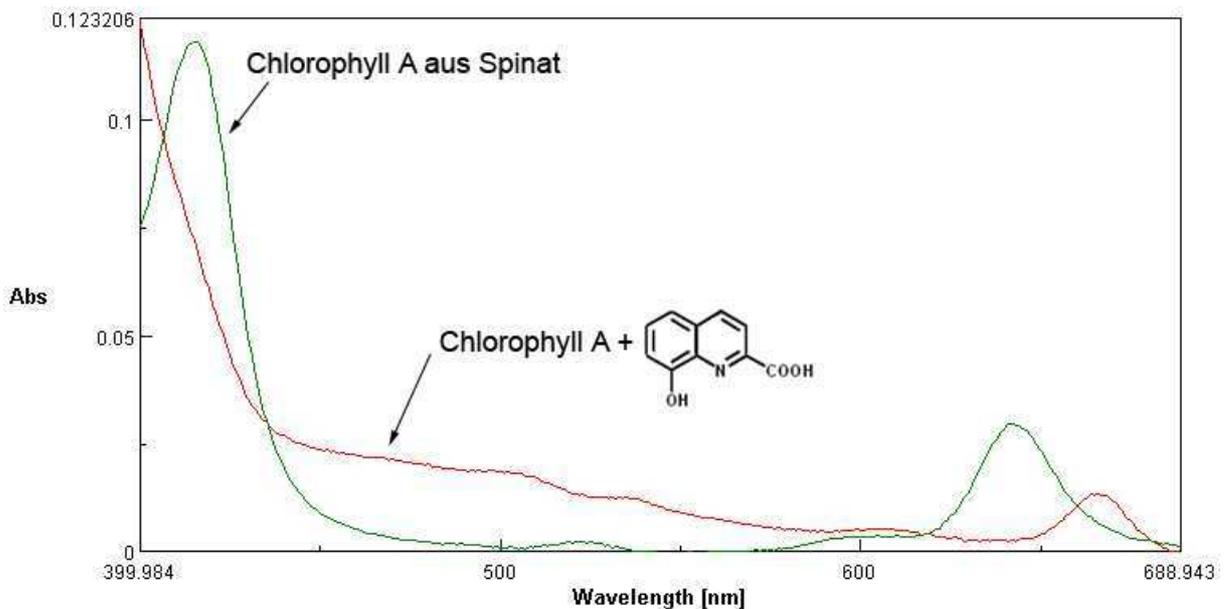


Abbildung 37: UV-VIS-Spektren von Chlorophyll (grün) und Chlorophyll versetzt mit der 8-HChC (**58**) (rot)

Die grüne Absorptionskurve zeigt die beiden charakteristischen Absorptionsmaxima von Chlorophyll A aus Spinat bei 420 und 645 nm. Durch Zugabe der 8-HChC (**58**) verschwindet die Bande bei 420 nm komplett. Die Absorption bei 400 nm stammt dabei von der 8-HChC (**58**). Die Bande des Chlorophylls bei 645 nm wird in Gegenwart der 8-HChC (**58**) um ca. 30 nm bathochrom verschoben und ist von geringerer Intensität. Da das verwandte 8-Hydroxychinolin (**59**) zur Quantifizierung von Magnesium eingesetzt wird, liegt eine Interaktion der 8-HChC (**58**) mit dem Mg^{2+} des Chlorophylls und die dadurch verursachte Destabilisierung des Porphyrin- Mg^{2+} -Komplexes nahe.

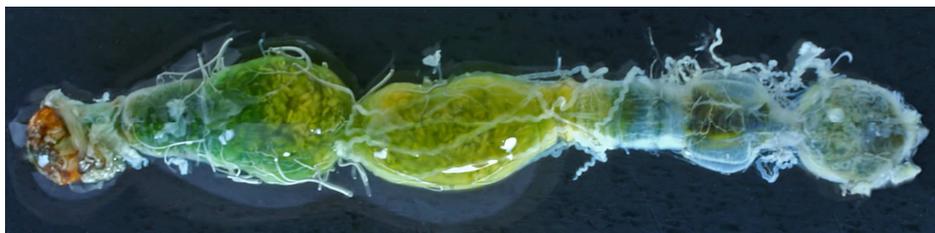


Abbildung 38: intakter Darm einer *Spodoptera littoralis* Larve (Foto: Alexander Schneeberg)

Abbildung 38 zeigt die Färbung des Nahrungsbreis im Darm von *Spodoptera* Larven. Man erkennt deutlich die Entfärbung des dunkelgrünen Chlorophylls bereits am Ende des Vorderdarms. In diesem Bereich erreicht die Konzentration der 8-HChC (**58**) ihr Maximum (Kapitel 3.4.2). Die vermutete Involvierung der 8-HChC (**58**) in die Verdauung des Chlorophylls im Darm ist rein spekulativ. Der beobachtete Effekt gibt Hinweise auf deren möglichen Nutzen im Darm, der im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Untersuchungen zur Homeostase der *N*-Acylglutamine in *Spodoptera* Larven

Mittels bildgebender ^{19}F -NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass *N*-(2,2'-Difluoroctanoyl)-glutamin (**75**) hauptsächlich im Vorderdarm von *Spodoptera* Larven zu 2,2'-Difluoroctansäure (**74**) hydrolysiert wird. *N*-(2,2'-Difluoroctanoyl)-glutamin (**75**) wurde mittels LC-MS in den einzelnen Darmabschnitten quantifiziert (Abbildung 39).

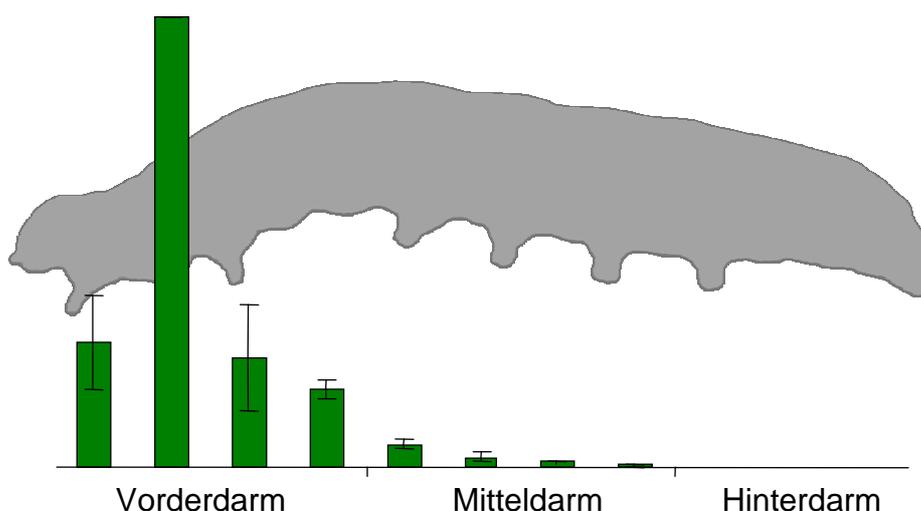


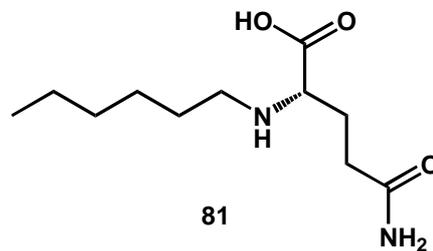
Abbildung 39: Verteilung von *N*-(2,2'-Difluoroctanoyl)-glutamin (**75**) im Darm von *Spodoptera* Larven

N-(2,2'-Difluoroctanoyl)-glutamin (**75**) ist etwa drei bis vier Stunden nach der Fütterung nicht mehr im Darm nachweisbar. Die hohe Hydrolysegeschwindigkeit liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass *N*-(2,2'-Difluoroctanoyl)-glutamin (**75**) mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie nicht detektiert werden konnte. Die entlang des Darms stetig sinkende Konzentration des gefütterten Konjugats deutet auf deren Hydrolyse in allen Darmabschnitten hin.

Synthese hydrolysestabiler Derivate der *N*-Acylglutamine

Zur Synthese von *N*-Alkylglutaminen wurde Glutamin (**33**) mit dem der Fettsäure äquivalenten Aldehyd und NaBH_3CN umgesetzt.^[86] Der Aldehyd wurde bei fehlender kommerzieller Verfügbarkeit aus der Umsetzung des entsprechenden Alkohols mit IBX gewonnen.^[87] Da länger-kettige Konjugate eine schlechte Wasserlöslichkeit

aufwiesen, wurde unter anderem das kurzkettige *N*-Hexylglutamin (**81**) synthetisiert (Schema 17).



Schema 17: Hydrolysestabiles *N*-Acylglutamin-Derivat: *N*-Hexylglutamin (**81**)

Hydrolyse von *N*-Acylhomoserinlactonen im Darm von *Spodoptera* Larven

Die Analyse des Insektendarms gab keine Hinweise auf *N*-Acylhomoserinlactone. Die nach Fütterung nicht mehr detektierbaren synthetischen *N*-Acylhomoserinlactone legten deren Abbau im Darm nahe. *In vitro* wurde gezeigt, dass unter den alkalischen Bedingungen speziell im Vorderdarm eine spontane Hydrolyse des Lactonrings erfolgt. Die dabei gebildeten *N*-Acylhomoserine waren jedoch weitgehend pH-stabil. Da nach der Fütterung jedoch auch die pH-stabilen *N*-Acylhomoserine nicht nachgewiesen werden konnten, wurde ein weiterer Abbauschritt vermutet. In Zusammenarbeit mit Rita Büchler konnte gezeigt werden, dass das darmbakterielle Enzym *N*-Acylaminosäurehydrolase (AAH)^[91] die Amidbindung der offenkettigen *N*-Acylhomoserine, jedoch nicht die der *N*-Acylhomoserinlactone spalten kann.

Es konnte eine Abbaukaskade der *N*-Acylhomoserinlactone im Darm postuliert werden, die neben der Hydrolyse des Lactonrings durch den alkalischen pH im Vorderdarm eine Spaltung der Amidbindung durch eine darmbakterielle *N*-Acylaminosäurehydrolase (AAH) enthält.^[91]

N-Acylglutamine als potentielle Inhibitoren des Quorum Sensing

Im Fall des Biosensors *Escherichia coli* RV308pSB40 wurde nach Zugabe von Regurgitat die Inhibierung der Biolumineszenz um etwa 50 % beobachtet. Tests mit verschiedenen bekannten Darmverbindungen zeigten, dass die *N*-Acylglutamine diesen Effekt verursachten. Diese Beobachtung legt nahe, dass die *N*-Acylglutamine aus dem Darm von *Spodoptera* Larven potentiell in der Lage sind, die bakterielle Kommunikation über *N*-Acylhomoserinlactone zu inhibieren.

Biosynthese der 8-HChC (58) im Insektendarm

Fütterungsstudien mit deuteriertem Tryptophan (96) zeigten, dass die 8-HChC (58) ein Produkt des Tryptophan-Metabolismus im Darm von *Spodoptera* Larven ist. Die Fütterung diverser Antibiotika lieferte keinen einwandfreien Nachweis für eine bakterielle Herkunft. Da die 8-HChC (58) nur in *Spodoptera* Larven und nicht in anderen Lepidopteren gefunden wurde, wird diese als ein Produkt des Insekts vermutet. Bei jüngeren Larven ist die Konzentration der 8-HChC (58) im Regurgitat am höchsten. Hat die *Spodoptera* Larve ihr Maximalgewicht erreicht, sinkt auch die Konzentration der 8-HChC (58) im Darm und liegt kurz vor der Verpuppung nahe null.

Einfluss der 8-HChC (58) auf die Duftemission von Mais

Mit Hilfe des Calcium-spezifischen Chelators BAPTA (103) konnte die Beteiligung von Calcium-Ionen in die Induktion der Duftstoffbiosynthese von Mais gezeigt werden. Dieser Effekt wurde bei der 8-HChC (58) nicht beobachtet. Dies konnte sowohl durch die Quantifizierung als auch durch Genexpressionsstudien nachgewiesen werden.

8-HChC (58) als Siderophor

Es konnte gezeigt werden, dass sich nach Zugabe von Fe(II)-Ionen zur 8-HChC (58) in wässrigen und alkoholischen Lösungen ein tiefblauer Charge-Transfer-Komplex ausbildet (Abbildung 40). Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten einen inhibierenden Effekt der 8-HChC (58) auf die Bildung eisenhaltiger Enzyme. Möglicherweise bindet die 8-HChC (58) Eisenionen. Jedoch wurde beobachtet, dass der Komplex unter physiologischen Bedingungen nicht stabil ist.

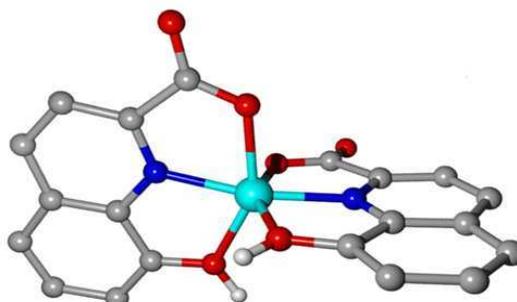


Abbildung 40: Röntgenstruktur des Komplexes aus 8-HChC (58) und FeSO₄

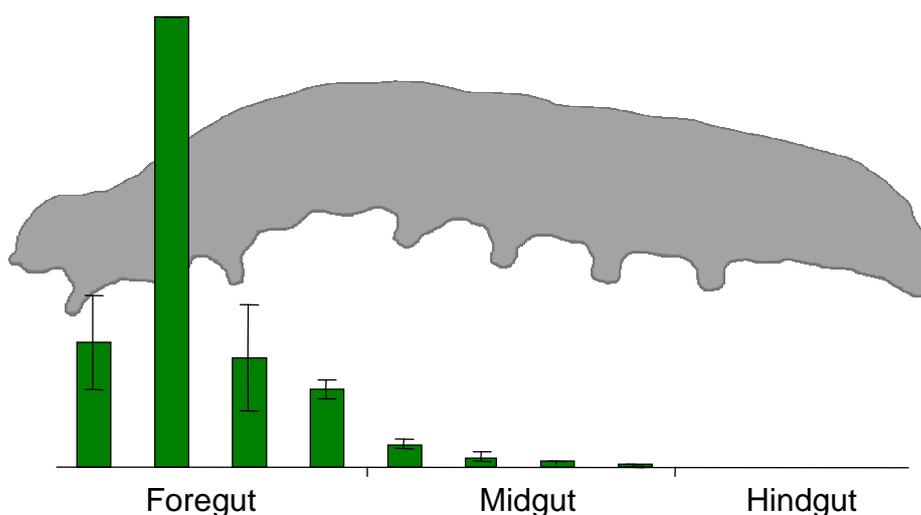
Einfluss der 8-HChC (58) auf Chlorophyll

Es konnte gezeigt werden, dass die 8-HChC (**58**) die Entfärbung von Chlorophyll zur Folge hat. Offensichtlich wird dabei der Charge-Transfer-Komplex des Porphyrin-Liganden und Mg^{2+} destabilisiert. Über den Wirkmechanismus und Nutzen dieser Beobachtung für das Insekt ist nach derzeitigem Wissensstand nichts Genaues bekannt.

5 Summary

Investigation of the homeostasis of *N*-acylglutamines in *Spodoptera* larvae

By ^{19}F -NMR spectroscopy the hydrolysis of *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) to 2,2'-difluorooctanoic acid (**74**) was shown to take place especially in the foregut of *Spodoptera* larvae. *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) was quantified in the different gut segments by LC-MS analysis (picture 1).

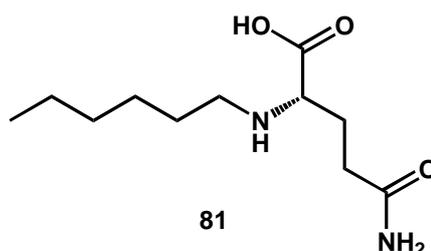


Picture 1: Distribution of *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) along the gut of *Spodoptera* larvae

Three to four hours after feeding *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) was not detectable in the gut anymore. This is an indication of a fast hydrolysis of the conjugate in the gut and may explain why the fluorine signal of *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) was not detectable by ^{19}F -NMR spectroscopy. The continuous decrease of *N*-(2,2'-difluorooctanoyl)-glutamine (**75**) along the gut points to an efficient hydrolysis of the conjugate in all parts of the gut.

Synthesis of hydrolysis stable derivatives of *N*-acylglutamines

N-alkylglutamines were synthesized by the treatment of the fatty acid respective aldehyde with glutamine and NaBH_3CN .^[86] When required the aldehyd was synthesized by the reaction of the alcohol with IBX.^[87] Because of the low water solubility of conjugates with longer fatty acid side chains such as the shorter *N*-hexylglutamine (**81**) was synthesized.



Scheme 1: hydrolysis stable derivative of *N*-acylglutamines: *N*-hexylglutamine (**81**)

Hydrolysis of *N*-acylhomoserine lactones in the gut of *Spodoptera* larvae

The analysis of the insect gut provided no evidence for the presence of *N*-acylhomoserine lactones. After the feeding of synthetic *N*-acylhomoserine lactones these were not detectable in the gut anymore. This observation points to their degradation in the gut. *In vitro* experiments have proved the hydrolysis of the lactone ring under alkaline conditions, especially in the foregut. *N*-acylhomoserines, which were formed by the hydrolysis, were partly pH stable. Because *N*-acylhomoserines were not found in the gut after feeding *N*-acylhomoserine lactones, a further degradation step was assumed. In cooperation with Rita B uchler the gut bacterial enzyme *N*-acylamino acid hydrolase (AAH) was shown to cleave the amide bond of hydrolyzed *N*-acylhomoserines but not of *N*-acylhomoserine lactones. Thus, a degradation cascade for *N*-acylhomoserine lactones in the gut was postulated. Apart from the alkaline hydrolysis of the lactone ring an enzymatic cleavage of the amide bond was assumed.

Biosynthesis of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) in the insect gut

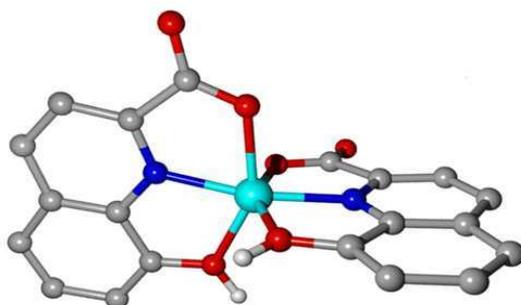
Feeding studies with deuterated tryptophan (**96**) proved the biosynthesis of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) in the gut of *Spodoptera* larvae. The feeding of several antibiotics delivered no clear evidence for a bacterial origin of this compound. Its exclusive presence in *Spodoptera* larvae but not in other Lepidoptera species suggests the production of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) by the insect. In younger larvae 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) was found in higher concentrations than in older ones.

Influence of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (58) on the volatile emission of maize

The treatment of maize plants with the calcium selective Chelator BAPTA (**103**) proved the involvement of calcium ions in the induction of their volatile emission. In case of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) this effect was not observed. That was proved by the quantification of the emitted volatiles as well as by gene expression analysis.

8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (58) as siderophore

8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) was shown to build an intensively blue charge transfer complex with iron(II) in aqueous and alcoholic solutions. The structure of the complex was determined by X-ray structure analysis of received crystals (picture 2). Under physiological conditions the disaggregation of the complex was shown.



Picture 2: X-ray structure of the charge transfer complex of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) and Fe(II)

The influence of 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (58) on chlorophyll

The treatment of chlorophyll with 8-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (**58**) caused its bleaching. Obviously, the charge transfer complex of the porphyrin ligand and Mg^{2+} is destabilized. Until now, nothing is known about the mechanism or the biological meaning of this process.

6 Experimenteller Teil

6.1 Spektroskopie

6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

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

Die chemische Verschiebung δ wird in ppm, die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das jeweilige Lösungsmittel, das als interner Standard verwendet wird.

^1H -Signale: CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm; CD_3OD $\delta = 3.31$ ppm

^{13}C -Signale: CDCl_3 $\delta = 77.70$ ppm; CD_3OD $\delta = 49.00$ ppm

Für die Untersuchungen mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie wurde ein Micro-Imaging Probenkopf „Micro 5“ der Firma Bruker Biospin verwendet, der mit austauschbaren RF-Inserts für 10 mm- bzw. 5 mm-Probenröhrchen ausgerüstet werden kann. Für die Analytik von *Spodoptera* Larven wurden 5 mm-Röhrchen verwendet.

6.1.2 Massenspektroskopie (MS)

6.1.2.1 Gaschromatographie – Massenspektroskopie (GC-MS)

Die Chromatogramme wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV mit folgenden Geräten aufgenommen:

Finnigan Trace MS zur Analytik biologischer Proben sowie zur Reinheitskontrolle

GC-Säule: Alltech EC 5, 15 m x 0.25 mm; 0.25 μm

Finnigan MAT Magnum zur Reaktionskontrolle in der Synthesechemie

GC-Säule: Alltech EC 5, 15 m x 0.25 mm; 0.25 μm

6.1.2.2 Flüssigkeitschromatografie – Massenspektroskopie (LC-MS)

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

HPLC: HP 1100 System; analytische HPLC-Säule: Grom-Sil 120 ODS-3 CP Microborsäule 120 mm x 2 mm, 3 μ m

MS: Thermoquest LCQ mit APCI und ESI Ionenquelle

6.1.3 UV-VIS-Spektroskopie

UV-VIS-Spektren wurden mit einem Jasco V-550 Spektrophotometer aufgenommen. Die Proben wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

6.1.4 IR-Spektroskopie

Infrarotspektren wurden mit einem Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer aufgenommen. Für feste Proben wurden KBr-Presslinge verwendet, flüssige Proben wurden als Film auf NaCl-Platten gemessen.

6.2 Chromatografie

6.2.1 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Zur Aufreinigung größerer Mengen Reaktionsgemisch mittels Reversed-Phase-Säulenmaterial (RP-18) wurde eine Büchi B688-Mitteldruckanlage verwendet.

6.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄ bzw. RP-18 F₂₅₄) der Firma Merck verwendet. Zur Detektion wurde die DC-Folie nach Anfärben im Tauchbad (Seebach's Reagenz oder Vanillin) mit einem Heißluftfön entwickelt.

6.2.3 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von synthetisierten Produkten wurde Säulenchromatographie mit Kieselgel von ICN (Silica 32-60, 60 Å) oder entsprechendem RP-18-Material durchgeführt. Die Eluenten sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

6.2.4 Biolumineszenzmessungen

Die Biolumineszenz von *Escherichia coli RV308pSB40* wurde mit einem Luminometer Lumiskan TL Plus der Firma Labsystems analysiert. Die zu untersuchende Flüssigkultur wurde in speziellen Küvetten vermessen. Die Proben wurden fünf Sekunden vor jeder Messung kurz geschüttelt.

6.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

6.3.1 Lösungsmittel

Für die Synthesen wurden käufliche trockene Lösungsmittel verwendet. Petrolether, Essigester und Ether wurden vor der Verwendung destilliert.

Vor luft- bzw. feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden Kolben im Hochvakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt. Argon wurde als Schutzgas verwendet.

6.3.2 Derivatisierungsmethoden zur GC-MS-Analyse

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

Zu ca. 500 µg der zu derivatisierenden Probe wurden in einem GC-Vial 50 µl MSTFA zugegeben und für 40 Minuten bei 60 °C im Thermomixer geschüttelt. Je nach Probenmenge wurde diese vor der GC-MS-Analyse mit Ether oder Dichlormethan verdünnt. 1 µl der Probe wurde injiziert.

6.3.2.2 Methylierung mit Diazomethan

Zu ca. 500 µg der zu derivatisierenden Probe wurden in einem GC-Vial etwa 500 µl einer ca. 5 %igen etherischen Diazomethanlösung gegeben. Nach 5 min wurde das überschüssige Diazomethan und der Ether mit einem Argonstrom abgedampft.

6.3.3 Chemikalien

Antibiotika wie Tetracyclin, Kanamycin und Gentamycin waren verfügbar bei Sigma-Aldrich. X-Gal wurde über AppliChem bezogen.

N-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) wurde bei Sigma-Aldrich gekauft. *N*-(3-Hydroxyhexanoyl)-homoserinlacton (**84**) wurde durch Reduktion von *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) mit NaBH₄ hergestellt.

6.3. Kulturmedien

LB-Agar für Kulturen von *Chromobacterium violaceum* CV026 und *E. coli* RV308pSB40 und zur Isolation von Darmbakterien aus *Spodoptera* Larven:

Trypton	10.0	g
Hefeextrakt	5.0	g
NaCl	10.0	g
Agar	15.0	g

Mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Im Fall von *Chromobacterium violaceum* CV026 wurde $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin zugesetzt. Bei *E. coli* RV308pSB40 wurde Tetracyclin (1 mg ml^{-1}) zugegeben.

Agro-Agar für *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4:

Pepton	5	g
Fleischextrakt	3	g
Mannitol	10	g
KH_2PO_4	0.5	g
Hefeextrakt	0.4	g
$\text{MgSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
Agar	15	g

Mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Actinomyceten-Agar zur Isolation von Darmbakterien von *Spodoptera* Larven:

Na-Caseinat	2.0	g
Asparagin	0.1	g
Na-Propionat	4.0	g
K_2PO_4	0.5	g
Glycerin	5.0	g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1.0	mg
Agar	15	g

Mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Die Medien wurden vor dem Einsatz für 20 Minuten bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ autoklaviert.

6.4 Aufzucht der *Spodoptera* Larven

Die in dieser Arbeit verwendeten Schmetterlingslarven von *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera exigua* (Bayer Cropscience, Monheim) sowie *Spodoptera eridania* (BASF Corporation, Florham Park NJ, USA) wurden aus Eiern auf speziell hergestellter künstlicher Nahrung (siehe unten) aufgezogen. Die Raupen wurden in Plastikbehältern mit Gazedeckel bei einer konstanten Temperatur von 23 – 25 °C und 16 Stunden Tageslichtrhythmus gehalten.

Die Herstellung der künstlichen Raupennahrung erfolgte nach folgender Prozedur:^[116] 500 g weiße Bohnen wurden über Nacht in 100 ml Wasser aufgequollen. Die Masse wurde mit 9 g Ascorbinsäure, 9 g Paraben, 4 ml wässrigem 36,5 %igem Formaldehyd, sowie 75 g Agar versetzt und mit 100 ml Wasser gekocht. Nach dem Abkühlen entstand eine feste, weiße Masse.

Das Futter wurde in Scheiben verfüttert und zweimal pro Woche ausgetauscht.

Alternativ wurden die Raupen auf Mais- oder Limabohnenpflanzen gehalten.

6.5 Sammeln von Regurgitat

Um Regurgitat der verschiedenen Lepidoptera Larven zu sammeln, wurden diese mit einer Federstahlpinzette am Hinterkopf gepackt und mit sanftem Druck solange gereizt, bis ein Tropfen des Regurgitats an der Mundöffnung erschien. Dieser wurde mit einer Glaskapillare gesammelt.

Zur Analyse wurde das Regurgitat zum Ausfällen der Enzyme mit etwa derselben Menge Methanol versetzt und bei 16000 U min⁻¹ für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels LC-MS verwendet.

6.6 Allgemeine Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen

Zur Anzucht der Versuchspflanzen wurde zuvor sterilisierte Pflanzerde der Firma Capriflor verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch dreiminütige Mikrowellenbestrahlung in einem handelsüblichen Mikrowellenofen (Daewoo, Quick Cookmate).

6.6.1 Anzucht der Limabohnen

Die Samen der Limabohne *Phaseolus lunatus* wurden von der Firma L L Olds Seed Co. Aus Madison, WI (USA) bezogen. Sie wurden in Gefäßen mit einem Durchmesser von 5.5 cm auf einem ca. 5 cm hohen Belag der Pflanzerde gelegt und anschließend mit Erde in doppelter Samenstärke überschichtet. Für die Inkubationen wurden 12 – 15 Tage alte Pflanzen verwendet. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit. Die Pflanzen wurden in einer Photophase von 14 Stunden pro Tag durch Leuchtstoffröhren mit einer Leistung von ca. 270 $\mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$ belichtet.

6.6.2 Anzucht von Mais (Delprim Hybrid)

Es wurden jeweils sieben Samen von *Zea mays* (cv. LG11) in eine Pflanzschale von ca. 15 cm Durchmesser gelegt und mit etwas Erde überschichtet. Für die Inkubationen wurden 10 - 14 Tage alte Pflanzen verwendet. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer bei 23 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit. Die Pflanzen wurden in einer Photophase von 14 Stunden / Tag durch Leuchtstoffröhren mit einer Leistung von ca. 270 $\mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$ belichtet.

6.7 Alkalische Hydrolyse von *N*-Acylhomoserinlactonen

Für die Hydrolyse der *N*-Acylhomoserinlactone bei verschiedenen pH-Werten wurden unten aufgeführte Puffer verwendet. Die Tris-Puffer wurden mit HCl eingestellt und vor deren Einsatz durch Ultrafiltration sterilisiert.

pH 7: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) HCl (500 mM)

pH 8: Tris HCl (100 mM)

pH 9: Tris HCl (100 mM)

pH 10: Na_2HCO_3 100 mM / NaHCO_3 100 mM;

pH 11: *N*-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure (CAPS) NaOH 100 mM

Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu 2 mL einer intensiv gerührten wässrigen *N*-Acylhomoserinlacton-Lösung (5 mM *N*-Hexanoylhomoserinlacton **(42)**, 1 mM *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton **(34)**, 1 mM *N*-(3-Hydroxy-

hexanoyl)-homoserinlacton (**84**) wurden 2 mL Hydrolysepuffer gegeben. Nach 15 s, 5 min, 10 min, 20 min und 50 min wurden je 0.5 ml Probe entnommen und mit 0.5 ml Tris Puffer pH 7 versetzt. Der pH-Wert wurde dabei auf einen Wert von ca. pH 7.2 eingestellt und die Hydrolyse des Lactonrings gestoppt. Die Proben wurden umgehend mittels LC-MS analysiert. Als interner Standard diente *N*-(*n*-Phenylvaleroyl)-glutamin (**76**)^[81] (4 µL einer 2.0 mg ml⁻¹ Stammlösung).

6.8 Analytik von *N*-Acylhomoserinlactonen

6.8.1 Analytik von *N*-Acylhomoserinlactonen mittels LC-MS

Als Lösungsmittel dienten Wasser (A, 0.5 % Essigsäure) und Acetonitril (B, 0.5 % Essigsäure). Bei einer Flussrate von 0.2 ml min⁻¹ wurden die Proben bei folgendem Gradienten analysiert: 100 % A (0 – 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 30 min), 100 % B (30 – 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 – 55 min).

Parallele UV-Detektion diente im Fall der alkalischen Hydrolyse von *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (**34**) zur Identifizierung der dabei entstehenden Tetramsäure ($\lambda_{\max} = 278$ nm).

6.8.2 Analytik von *N*-Acylhomoserinlactonen mittels GC-MS

Für die Analytik mittels GC-MS wurden die Proben unter folgendem Temperaturprogramm aufgetrennt: 50 °C (0 – 3 min), 50 °C bis 300 °C (3 – 21 min), 300 °C (21 - 24 min). Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

6.9 Reporterorganismen: Kulturbedingungen und

Bioassays

Agrobacterium tumefaciens NT1/pZLR4 und *Chromobacterium violaceum* CV026 wurden auf Platten bei 28 °C gehalten. Die Stammkulturen wurden alle fünf Tage auf neue Platten ausgestrichen.

Für die Bioassays wurden 20 ml Flüssigmedium mit einer Impföse der Bakterienstammkultur versetzt und über Nacht bei 28 °C geschüttelt. Anschließend

wurden 2 ml Flüssigkultur mit 18 ml Medium mit 15 g l^{-1} Agar versetzt und auf Petrischalen verteilt.

Die Bakterien wurden auf LB-Platten bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Stammkulturen wurden alle fünf Tage auf neue Platten ausgestrichen.

Für die Bioassays wurden 20 ml Flüssigmedium mit einer Impföse der Bakterienstammkultur versetzt und über Nacht bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml der Flüssigkultur mit 18 ml frischem Medium versetzt und erneut für eine Stunde bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt.

Zum Nachweis von *N*-Acylhomoserinlactonen im Regurgitat wurden 900 μl der Bakterienkultur mit 100 μl Regurgitat versetzt. Die Biolumineszenz wurde einmal pro Stunde gemessen. Die Probe wurde fünf Sekunden vor jeder Messung kurz geschüttelt. Ein konstanter Wert stellte sich nach ca. 24 bis 30 h ein.

Als Negativkontrolle für die Bioassays mit allen Bakterien wurde Trispuffer pH 7 verwendet. Als Positivkontrolle und zur Bestimmung der Nachweisgrenze der einzelnen Reporterorganismen für *N*-Acylhomoserinlactone wurden die einzelnen Proben mit *N*-Hexanoylhomoserinlacton **(42)** versetzt.

6.10 Isolation von Darmbakterien aus *Spodoptera* Larven

Raupen von *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera exigua* wurden bei -20°C für 5 min gekühlt und in Kosolin für 20 Sekunden gewaschen. Kopf und Hinterteil wurden abgetrennt und der Darm herausgezogen. Dieser wurde mit zwei Pinzetten am vorderen und hinteren Ende zusammen gehalten und für 20 Sekunden in Kosolin gewaschen. Der Darm wurde anschließend aufgeschnitten und auf LB- bzw. Actinomycetenagar ausplattiert. Die Platten wurden bei $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach zwei bis sieben Tagen wurden einzelne Spots gepickt und auf frische Platten ausgestrichen. Der Vorgang wurde gegebenenfalls wiederholt, bis die Kulturen einheitlich waren.

6.11 Duftsammlung mittels Closed-Loop-Stripping

Duftstoffe von Pflanzen wurden mittels der Closed-Loop-Stripping-Technik gesammelt. Dazu wurden Miniaturdrehschieberpumpen der Firma Fürgut (D-88139 Aitrach) verwendet.

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

12 – 15 Tage alte Limabohnen- bzw. 10 -14 Tage alte Maispflanzen wurden mit einer sauberen Rasierklinge direkt über dem Boden abgeschnitten und in ein 5 ml-Glasvial mit der enthaltenen wässrige Lösung der jeweiligen Testsubstanzen gestellt. Die Pflanzen wurden in einen Exsikkator gestellt und dieser mit einem Stopfen verschlossen. Mit der Miniaturpumpe wurde das Luftvolumen des Exsikkators über einen Aktivkohlefilter gepumpt. Die flüchtigen Duftstoffe adsorbierten dabei an der Aktivkohle. Nach in der Regel 24 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Die Aktivkohlefilter wurden entnommen und zweimal mit je 20 µl Dichlormethan – versetzt mit 200 µg ml⁻¹ Bromdecan (**106**) als internem Standard – eluiert. 1 µl der Probe wurde per GC-MS^s analysiert.

6.12 Fütterung von Antibiotika

Es wurden 12 Tage alte Pflanzen der Limabohne für 24 Stunden mit je einem Antibiotikum inkubiert. Eine weitere Pflanze wurde mit allen fünf Antibiotika zusammen inkubiert. Der oberste Spross wurde dabei entfernt, so dass das Antibiotikum ausschließlich in die beiden Keimblätter gelangen konnte.

Die Blätter der inkubierten Pflanzen wurden mit einer wässrigen Lösung des deuterierten Tryptophans (**96**) bestrichen und Raupen von *Spodoptera exigua* und *Spodoptera littoralis* fraßen für 24 h daran. Das Regurgitat wurde gesammelt und mittels LC-MS analysiert. Die 8-HChC (**58**) sowie die 8-Hydroxy-5,6,7-[²H₃]-chinolin-2-carbonsäure (**101**) wurden über deren Molpeaks quantifiziert. Als Standard wurde *N*-(*n*-Phenylvaleroyl)-glutamin (**76**) verwendet.

^sGC-Bedingungen: Säule: Alltech EC5, 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Trägergas: Helium, Flussrate: 1.5 ml min⁻¹, Temperaturprogramm: 50 °C 2 min, mit 10 °C min⁻¹ auf 200 °C, mit 30 °C min⁻¹ auf 280 °C, 1 min bei 280 °C, Injektortemperatur: 220 °C, Split: 1 : 10

6.13 Kristallisation des Komplexes der 8-HChC mit Fe(II)

Variante 1: Eisenchlorid und 8-HChC (58)

0.275 mmol $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ und 1.1 mmol 8-HChC (58) wurden in einem Methanol-Wasser-Gemisch 90:10 bis 70:30 gelöst.^[117] Die Kristalle des Komplexes wurden durch langsames Verdunsten der Lösung bei Raumtemperatur nach ein bis vier Wochen erhalten. Die Kristalle hatten eine maximale Größe von 20 μm und waren damit nicht für die Röntgenstrukturanalyse geeignet. Zur Untersuchung der Komplexlösung mittels UV-VIS-Spektroskopie wurde die Lösung 60fach mit dem entsprechenden Lösungsmittelgemisch verdünnt.

Variante 2: Eisenchlorid und 8-HChC (58) mit Imidazol

0.2 mmol 8-HChC (58) in 10 ml Ethanol und 0.1 mmol Imidazol in 10 ml Ethanol wurden mit 0.1 mmol $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml Ethanol versetzt.^[118] Die Lösung wurde mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Kristalle des Komplexes wurden durch langsames Verdunsten der Lösung bei Raumtemperatur nach ein bis vier Wochen erhalten. Es wurden keine für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle gewonnen.

Variante 3: Eisenperchlorat und 8-HChC (58)

0.275 mmol $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml Ethanol wurden zu 0.55 mmol 8-HChC (58) in 100 ml Ethanol gegeben.^[119] Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach ein bis vier Wochen wurden die Kristalle abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Die Kristalle waren nicht für die Röntgenstrukturanalyse geeignet. Auch in anderen Alkoholen wie Propanol und Methanol konnten keine für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle gewonnen werden.

Variante 4: Eisensulfat und 8-HChC (58)

0.275 mmol $\text{FeCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml Ethanol wurden zu 0.55 mmol 8-HChC (58) in 100 ml Ethanol gegeben.^[120] Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach ein bis vier Wochen wurden tiefblaue Kristalle des Komplexes abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Die gewonnenen Kristalle waren mit einer Größe von ca. 200 μm für die Röntgenstrukturanalyse geeignet.

Zur Untersuchung der Komplexlösung mittels UV-VIS-Spektroskopie wurde eine Probe der Lösung 30fach mit Ethanol verdünnt.

6.14 Membrandurchlässigkeit des Komplexes

In einem Glasgefäß gefüllt mit einer KCl-Pufferlösung hing eine Küvette, ebenfalls gefüllt mit Puffer. In der Küvette befand sich ein Loch von ca. 4 mm Durchmesser. Dieses wurde mit einem Lipidtropfen bestrichen und nach einigen Augenblicken entstand durch spontane Anordnung der Lipide die Doppelschicht. In die Lösung des Glasgefäßes hingen zwei Elektroden, die mit KCl-Lösung gefüllt waren. Die Elektroden überwachten die Stabilität der Membran. Nach Zugabe der Fe^(II)-8-HChC-Komplex-Lösung in das Glasgefäß sollten nach einigen Minuten Proben aus der Küvette entnommen werden, um mittels UV-VIS-Spektroskopie die Präsenz des Komplexes und damit ein eventuelles Passieren der Membran durch den Komplex zu überprüfen.

6.15 Untersuchungen zur Genexpression von Mais

6.15.1 Isolation von RNA aus Mais

Maispflanzen wurden z. B. mit *N*-Linolenoylglutamin (**28**), 8-HChC (**58**) oder beiden Verbindungen zusammen für 1 – 6 h inkubiert und anschließend in 55 ml Kunststoffubes bei -80 °C gelagert. Zur RNA-Extraktion wurde das „RNeasy Micro Kit“ von Qiagen verwendet und nach Standardprozedur verfahren. Zur Herstellung der dazu benötigten Puffer und Lösungen wurde ausschließlich RNase-freies Wasser verwendet. 10 µl β-Mercaptoethanol wurde mit 1 ml RLT-Puffer verdünnt. Maximal 100 mg des gefrorenen Pflanzenmaterials wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mittels Mörser und Pistill homogenisiert und in ein mit Stickstoff gekühltes 2ml-Tube überführt. Der Stickstoff wurde langsam abgedampft und das Blattgewebe noch vor dem Auftauen mit 450 µl RLT-Puffer versetzt. Die Suspension wurde geschüttelt, auf eine QIAshredder spin column (violett) gegeben und bei 4 °C für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 225 µl EtOH versetzt. Bei Abnahme des Überstandes ist darauf zu achten, dass ein nach dem Zentrifugieren im Überstand eventuell vorhandenes Pellet

in jedem Fall verworfen wird. Die Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Dabei eventuell entstehender Niederschlag wurde mitverwendet. Die gesamte Lösung, inklusive eventuellem Niederschlag, wurde auf eine Zentrifugensäule (pink), gefüllt mit einem Anionenaustauscher, gegeben. Nach Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm verblieb die RNA auf der Säule. Das Zentrifugat wurde verworfen. Im darauf folgenden Waschschrift wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer versetzt und erneut für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Waschlösung wurde verworfen. Zur Entfernung der DNA wurde die Probe mit DNase versetzt. Dazu wurde das „RNase-free DNase Set“ von Quiagen verwendet. 10 µl der DNase-Stammlösung wurden mit 70 µl RDD-Puffer versetzt. Da DNase leicht physikalisch denaturieren kann, sollte das Vermischen vorsichtig erfolgen. Das DNase-Gemisch wurde nun mittig auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm. Anschließend wurde die Säule 2x hintereinander mit je 500 µl RPE-Puffer versetzt und jeweils für 15 s und 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die jeweiligen Waschlösungen wurden verworfen. Die Säule wurde in ein neues 1.5 ml Eppendorff-Tube überführt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser versetzt. Durch anschließende Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm wurde die RNA von der Säule gewaschen.

6.15.2 cDNA-Synthese – Reverse Transkription

Da isolierte RNA relativ instabil ist, ist es empfehlenswert, diese umgehend in cDNA zu transkribieren. Dazu wurde eine Reverse Transkriptase verwendet, ein ursprünglich aus Retroviren isoliertes Enzym. Diese besitzen keine doppelsträngige DNA als Genom, sondern einzelsträngige RNA. Zur Vermehrung müssen Retroviren ihr Genom in das Wirtsgenom einer eukaryotischen Zelle integrieren. Da dieses aus doppelsträngiger DNA besteht, wandelt die Reverse Transkriptase die RNA des Virus in der Wirtszelle zunächst in einzelsträngige DNA um und synthetisiert daraus die doppelsträngige DNA.

Zum Starten der cDNA-Synthese wurden sogenannte Oligo-(dT)-Primer eingesetzt, die an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden. Diese und die Reverse Transkriptase SuperScript III sind im verwendeten „RT Kit“ von Invitrogen enthalten. Die Synthese wurde im Thermocycler von Eppendorf durchgeführt.

Für jede Probe wurde die in Tabelle 5 beschriebene Reaktionslösung hergestellt und unter nebenstehendem Temperaturprogramm inkubiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese

Zusammensetzung der Reaktionslösung	Temperaturprogramm
0.5 µl Oligo-(dT)-Primer	50 °C → 60 min
0.5 µl 0.1 M DTT	70 °C → 15 min
2.0 µl 5x Puffer	
0.5 µl dNTP RNA	
6.0 µl Probe (1000 ng ml ⁻¹)	
0.5 µl Superscript III	
10 µl Gesamtvolumen	

6.15.3 Quantifizierung der Genexpression mittels Realtime-PCR

Die Bestimmung des Expressionslevels der untersuchten Gene wurde mittels Realtime-PCR durchgeführt. Als PCR bezeichnet man die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction). Zur dabei durchgeführten Amplifizierung der in der Probe vorhandenen DNA-Fragmente benötigt man zwei Primer, die den Angriffspunkt für die temperaturbeständige DNA-Polymerase bilden. Dieses Enzym hängt an die 3'-OH-Enden der Primer neue Nucleotide an. Die PCR gliedert sich in fünf temperaturgesteuerte Schritte. In Schritt 1 erfolgt bei 95 °C die Denaturierung der DNA, das heißt, der Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge gespalten. Die Schritte 2 – 4 beinhalten die Denaturierung, die Primeranlagerung (Annealing) und die Kettenverlängerung (Elongation). Die Schritte 2 – 4 können beliebig oft wiederholt werden. Bei der Realtime-PCR ist eine gleichzeitige Amplifizierung und Quantifizierung der spezifischen Nukleinsäuresequenz durch Detektion des PCR-Produkts in Echtzeit möglich. Die PCR erfolgt dabei unter Präsenz des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Dieser bindet unspezifisch zwischen den DNA-Strängen und wird so in eine aktive Form überführt, aus der die Emission eines fluoreszierenden Signals resultiert. Das Emissionsmaximum liegt dabei bei 520 nm. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Menge des PCR-Produkts. Die PCR-Versuche wurden mit dem „Mx3000 real-time PCR-System“ und dem „Brilliant

SYBR Green QPCR Master Mix“ durchgeführt. Die konstruierten Primer für die jeweiligen Gene sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 6: Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer

Gen	Primer	Nucleotidsequenz
TPS1	fwd	5´ - GGG ACG AGC ATC ACA AAG TT - 3´
	rev	5´ - ATT TGC TCA AAC GCC ACT CT - 3´
TPS5	fwd	5´ - CAG CGG TTC TAC CTT CTT CG - 3´
	rev	5´ - GAG GCG GAG TCT AGT CGA TG - 3´
IGL	fwd	5´ - ACA CGA GCT TCA CGA GGA TT - 3´
	rev	5´ - CCA ATG ATC ACA CCA TCT GC - 3´
BX1	fwd	5´ - TAC AAG CCC ATC ATG TCT CG - 3´
	rev	5´ - CCT TCT GAA GCC TTG GTG AT - 3´
BX6	fwd	5´ - TTC TTC AAC ACG GAC GTG AG - 3´
	rev	5´ - CAA AGC AAA TGA AAG GAC GA - 3´
Actin	fwd	5´ - GGC AGA AGG ATG CGT ATG TT - 3´
	rev	5´ - TTA GCC TTT GGG TTG AGT GG - 3´

Tabelle 7: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm zur Realtime PCR

Zusammensetzung der Reaktionslösung	Temperaturprogramm
10.6 µl Wasser	94 °C → 2min
12.5 µl Mix (Enzym)	94 °C → 30 s
0.375 µl ROX (Farbstoff)	50 °C → 30 s
0.25 µl Rimer (fwd)	72 °C → 40 s
0.25 µl Primer (rev)	72 °C → 10 min
1.0 µl cDNA-Lösung	
24,975 µl Gesamtvolumen	

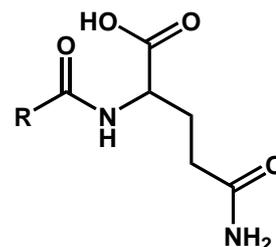
Zur Auswertung der Realtime-PCR wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode verwendet [70S]. C_T gibt dabei die Zahl der Wiederholungen der PCR-Reaktion (Zyklenzahl) an, ab der die Fluoreszenz messbar ist. ΔC_T beschreibt die Differenz der Fluoreszenz zwischen dem zu bestimmenden Gens und des Referenzgens, in diesem Fall Actin. $\Delta\Delta C_T$ ist

wiederrum die Differenz zwischen ΔC_T des untersuchten Pflanzenmaterials zu ΔC_T der Referenzpflanzen. Die Normalisierung erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Formel.

6.16 Synthese von Standardverbindungen

6.16.1 N-Acylglutamine

In einem 100 ml Zweihalskolben wurde zu einer Mischung aus 1.8 mmol Fettsäure in 20 ml trockenem THF unter Rühren bei 0 °C 275 μ l Triethylamin und 190 μ l Chlorameisensäureethylester gegeben.^[81,42] Nach 2 min wurden 3.9 mmol Glutamin (**33**), gelöst in 14 ml 0.3 N NaOH, rasch zugegeben und für 5 min bei 0 °C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und



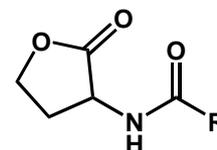
die Lösung weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit 2 N HCl abgebrochen und die Lösung 3x mit je 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC an RP18-Säulenmaterial (H₂O:MeOH 20:80) gereinigt.

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate synthetisiert:

N-Hexanoylglutamin (**90**) (45 % Aubeute), *N*-Linolenoylglutamin (**28**) (72 % Ausbeute), *N*-Linoleoylglutamin (**29**) (62 % Ausbeute), *N*-(*n*-Phenylvaleroyl)-glutamin (**76**) (75 % Ausbeute)

6.16.2 N-Acylhomoserinlactone

Eine Suspension von 1 mmol L-Homoserinlacton x HCl (**107**) in 20 ml trockenem CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C mit 2.4 mmol Triethylamin versetzt. 1 mmol des entsprechenden Fettsäurechlorids wurde über 5 min zugetropft.^[88] Die Lösung wurde für 30 min bei 0 °C und für



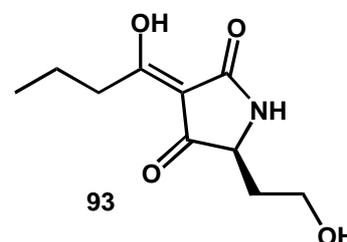
weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde mit 2x 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung, 2x 20 ml 1 M KHSO₄-Lösung und 1x 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO₄ getrocknet. Die Lösung wurde am

Rotationsverdampfer eingeeengt und mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt.

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate synthetisiert: *N*-Butanoyl-homoserinlacton (**39**) (45 %), *N*-Pentanoylhomoserinlacton (**85**) (67%), *N*-Hexanoyl-homoserinlacton (**42**) (83 %), *N*-Octanoylhomoserinlacton (**43**) (79 %), *N*-Decanoyl-homoserinlacton (**45**) (70 %), *N*-Undecanoylhomoserin-lacton (**86**) (55 %), *N*-Dodecanoylhomoserinlacton (**47**) (64 %)

6.16.3 3-(1-Hydroxybutyliden)-5-(2-hydroxyethyl)-pyrroliden-2,4-dion

Zu einem Vial mit 0.374 mmol (111 mg) *N*-(3-Oxo-hexanoyl)-homoserinlacton in 1 ml trockenem MeOH wurde NaOMe in MeOH (0.374 mmol, 0.747 ml, 0.5 M) bei Raumtemperatur unter Argon zugegeben.^[93] Die



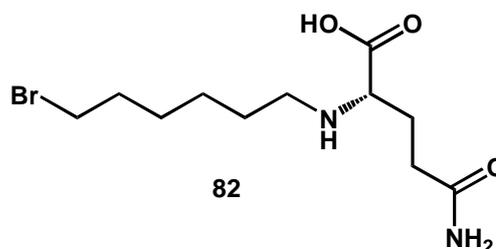
Reaktionslösung wurde für 3 h bei 55 °C gerührt. Das

Gemisch wurde über einen Ionenaustauscher (Dowex 50WX2-200, 2cm³) filtriert und mit 20 ml MeOH eluiert. Die kombinierten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Niederschlag aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert. Das Produkt wurde mittels Reversed-Phase HPLC gereinigt. Die Tetramsäure 3-(1-Hydroxybutyliden)-5-(2-hydroxyethyl)-pyrroliden-2,4-dion (**93**) wurde durch die Detektion eines Absorptionsmaximums bei 278 nm identifiziert.

Ausbeute: 75 mg (63 %)

6.16.4 *N*-(6-Bromhexyl)-glutamin

Zu einer Suspension aus 10 mmol (1.46 g) Glutamin (**33**) und 15 mmol (0.94 g) NaBH₃CN in 20 ml Methanol wurden in einem 50 ml Zweihalskolben 11 mmol (1.97 g) 6-Brom-



hexanal (**108**) gegeben. Das Gemisch wurde für 15 h bei Raumtemperatur gerührt.^[87] Der entstandene weiße Niederschlag wurde filtriert, mit MeOH gewaschen und ergab reines *N*-(6-Bromhexyl)-glutamin (**82**). Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer

eingengt. Es enthielt eine Mischung aus mono- und dialkyliertem Produkt. Es wurde über Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH 1:1 als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 77 %

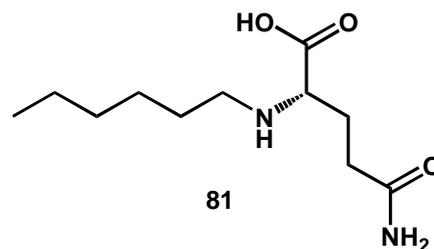
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.98 (pt, 4 H), 1.55 (m, 2 H), 1.77 (m, 2 H), 1.91 (m, 2 H), 1.91 (br, NH), 2.19 (m, 2 H), 2.56 (m, 2 H), 3.36 (m, 2 H), 3.39 (m, 1 H), 7.94 (br, NH, 2 H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 24.9, 25.7, 30.1, 30.8, 31.5, 46.8, 61.7, 173.0

APCI-MS m/z (%): [M + H]⁺ 311 (95), 309 (100), 293 (6), 263 (3), 229 (12), 211 (2), 183 (2)

6.16.5 *N*-Hexylglutamin

Zu einer Suspension aus 10 mmol (1.46 g) Glutamin (**33**) und 15 mmol (0.94 g) NaBH₃CN in 20 ml Methanol wurden in einem 50 ml Zweihalskolben 11 mmol (1.97 g) *n*-Hexanal (**80**) gegeben. Das Gemisch wurde für 15 h bei Raumtemperatur gerührt.^[87]



Der entstandene weiße Niederschlag wurde filtriert, mit MeOH gewaschen und ergab reines *N*-(Hexyl)-glutamin (**81**). Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Es enthielt eine Mischung aus mono- und dialkyliertem Produkt. Es wurde über Kieselgel und CH₂Cl₂/MeOH 1:1 als Laufmittel gereinigt.

(Ausbeute: 67 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.90 (t, 3 H), 1.25 – 1.45 (m, 8 H), 1.87 (m, 2 H), 1.91 (br, NH, 1 H), 2.48 (m, 2 H), 3.73 (t, 1 H), 5.0 (NH, 2 H), 10.0 (br, OH, 1 H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 13.2, 21.7, 26.0, 30.8, 46.9, 54.1, 61.7, 173.9, 177.5

APCI-MS m/z (%): [M + H]⁺ 231 (100), 214 (12), 186 (6), 167 (4)

7 Literaturverzeichnis

- [1] Merian M. S., *Der Raupen wunderbare Verwandlung und sonderbare Blumennahrung*, **1679**
- [2] Nultsch, *Allgemeine Botanik*, **1989**, 216-217
- [3] Schaller, *Vierteljahresschrift der Naturforschenden Gesellschaft Zürich*, **2002**, 147/4, 141-150 [4] v. Sengbusch, *Botanik*, **1989**, 282-285
- [5] Raven, *Biologie der Pflanzen*, **1988**
- [6] Sicherheitsdatenblatt Nicotin
- [7] Stoll A., Seebeck E., *Adv. Enzymol.*, **1951**, 11, 377
- [8] Mordue A. J., Blackwell A., *J. Insect Physiol.*, **1993**, 39, 903-924 [9] Lüttge, *Botanik*, **1989**, 216-217
- [10] Heil M., *Nature*, **2004**, 430, 205-208
- [11] Farmer, E. E. Ryan, *Plant Cell*, **1992**, 4, 129-134
- [12] Turlings T. C. J., Tumlinson J. H., Lewis W. J., *Science*, **1990**, 250, 1251-1253
- [13] Turlings T. C. J., Loughrin J. H., McCall, Röse U. S. R., Lewis J., Tumlinson J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1995**, 92, 4169-4174
- [14] Buchanan, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, **2000**, 851-929
- [15] Vick B. A., Zimmerman D. C., *Plant Physiol.*, **1984**, 75, 458-461
- [16] Hamberg M., Gardner H. W., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1992**, 1165, 1-18
- [17] Demole E. Lederer E., Mercier D., *Helv. Chim. Acta*, **1962**, 45, 675-685
- [18] Sembdner G., Parthier B., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **1993**, 44, 569-589
- [19] Meyer A., Miersch O., Buttner C., Dathe W., Sembdner G., *J. Plant Growth Regul.*, **1984**, 3, 1-8
- [20] Ueda J., Kato J., *Plant Physiol.*, **1980**, 66, 246-249
- [21] Hopke J., Donath J., Blechert S., Boland W., *FEBS Lett.*, **1994**, 352, 146-150
- [22] Boland W., Hopke J., Donath J., Nüske J., Bublitz F., *Angew. Chem. – Int. Edit. Engl.*, **1995**, 1600-1602
- [23] Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T. M., Müller M. J., Xia Z. Q., Zenk M. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1995**, 92, 4099-4105
- [24] Imbusch R., Müller M. J., *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, 28, 720-26

- [25] Vollenweider, Weber H., Stolz S., Chletelat A., Farmer E. E., *Plant J.*, **2000**, 24, 467-476
- [26] Stelmach B. A., Müller A., Hennig P., Gebhard S., Schubert-Zsilavec M., Weiler E. W., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 12832-12838
- [27] Spiteller D., Boland W., *Rundgespr. Kommission für Ökologie*, **2002**, 111-122
- [28] Dicke M., Van Baarlen P., Wessels R., Dijkman H., *J. Chem. Ecol.*, **1993**, 19, 581-599
- [29] Arimura G. I., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W., Takabayashi, *Nature*, **2000**, 406, 512-515
- [30] Arimura G. I., Ozawa R., Nishioka T., Boland W., Koch T., Kühnemann F., Takabayashi J., *Plant J.*, **2002**, 29, 87-98
- [31] Tschardt T., Thiessen S., Dolch R., Boland W., *Biochem. Syst. Ecol.*, **2001**, 29, 1025-1247
- [32] Turlings T. C. J., Tumlinson J. H., Lewis W. J., *Science*, **1990**, 248, 1251-1253
- [33] Maffei M., Bossi S., Spiteller D., Mithöfer A., Boland W., *Plant Physiol.*, **2004**, 134, 1752-1762
- [34] Frey M., Stettner C., Paré P. W., Schmelz E. A., Tumlinson, J. H., Gierl A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, 97, 14801-14806
- [35] Shen B., Zheng Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, 97, 14807-14812
- [36] Zimmermann S., Erhardt T., Plesch G., *Cell. Mol. Life Sci.*, **1999**, 55, 183-203
- [37] Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbock K., Scheel D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, 94, 4800-4805
- [38] Poovaiah B. W., Reddy A. S. N., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **1993**, 12, 185-211
- [39] Alborn H. T., Turlings T. C. J., Jones T. H., Stenhagen G., Louhgrin J. H., Tumlinson H., *Science*, **1997**, 276, 945-949
- [40] Paré P. W., Alborn H. T., Tumlinson J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, 95, 13971-13975
- [41] Pohnert G., Jung V., Haukioja E., Lempa K., Boland W., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11275-11280
- [42] Spiteller D., *Dissertation*, **2002**
- [43] Truitt C. L., Wie H. X., Paré P. W., *The Plant Cell*, **2004**, 16, 523-532
- [44] Csiszar A., Klumpp E., Koglin E., FZ-Jülich, *persönliche Mitteilung*, **2003**

- [45] Halitschke R., Schittko U., Pohnert G., Boland W., Baldwin I. T., *Plant Physiol.*, **2001**, 125, 711-717
- [46] Clark A. J., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **1959**, 234, 2578-2582
- [47] Rostás M., Blassmann, K., *Proceedings of the Royal Society B*, accepted, **2008**
- [48] Ruby E. G., Nealson K. H., *Biol. Bull.*, **1976**, 151, 574-586
- [49] Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., *Science*, **1999**, 284, 1318-1322
- [50] Bainton N. J., Bycroft B. W., Chhabra S. R., Stead P., Gledhill L., Hill P. J., Rees C. E. D., Winson M. K., Salmond G. P. C., Stewart G. S. A. B., Williams P., *Gene*, **1992**, 116, 87-91
- [51] Coburn P. S., Gilmore M. S., *Cell. Microbiol.*, **2003**, 5, 661-669
- [52] Swift S., Williams P., Stewart G. S. A. B., *Cell-Cell Signalling in Bacteria, American Society of Microbiology, Washington D. C.*, **1999**, 291-313
- [53] Wagner-Döbler I., Thiel V., Eberl L., Allgaier M., Bodor A., Meyer S., Ebner S., Pukall R., Schulz S., *ChemBioChem*, **2005**, 6, 2195-2206
- [54] Pesci E. C., Milbank J. B., Pearson J. P., McKnight S., Kende A. S., Greenberg E. P., Iglewski B. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, 96, 11229-11234
- [55] Chen X., Schauder S., Portier N., van Dorsselaer A., Pelcter I., Bassler B. L., Hughson F. M., *Nature*, **2002**, 415, 545-549
- [56] McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B., Williams P., *Microbiology*, **1997**, 143, 3703-3711
- [57] Visik K. L., Foster J., Doino J., McFall-Ngai M., Ruby E. G., *J. Bacteriol.*, **2000**, 182, 4578-4586
- [58] Eberhard A., Burlingame A. L., Eberhard C., Kenyon G. L., Nealson K. H., Oppenheimer N. J., *Biochemistry*, **1981**, 20, 2444-2449
- [59] *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002**, 3, 685-95
- [60] Ron E. Z., Rosenberg E., *Environ. Microbiol.*, **2001** 3, 229-236
- [61] Schildknecht H., Birringer H., Krauss D., *Zeitschrift für Naturforschung Part B*, **1969**, B24, 38-47
- [62] Fiedler H., Kaben U., *Pharmazie*, **1966**, 21, 233-238
- [63] Wang S. F., Braekman J. C., Dalozze D., *Experientia*, **1996**, 6, 628-630

- [64] Billker O., Lindo V., Panico M., *Nature*, **1998**, 6673, 289-292
- [65] Breiding-Mack S., *J. Bacteriol.*, **1986**, 7, 953-60
- [66] Smith T. M., Priestley N. D., Knaggs A. R., Nguyen T., Floss H. G., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1612-1614
- [67] Nörtemann B., Glässner A., Machinek R., Remberg G., Knackmuss G., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 6, 1898-1903
- [68] de Silva E. D., Miao Shichang, Anderson R. J., *Tetrahedron Letters*, **1992**, 21, 2917-2920
- [69] *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1776-1778
- [70] Molinski T. F., Faulkner D. J., *Tetrahedron Letters*, **1988**, 29, 2137-2138
- [71] Schennen A., Hölzl J., *Planta Med.*, **1986**, 52, 235-236
- [72] Mendéz J., Masa A., *Phytochemistry*, **1975**, 14, 4, 1136-1137
- [73] MacNicol P. K., *Biochem J.*, **1968**, 107, 473-479
- [74] Starratt A. N., Cavenex S., *Phytochemistry*, **1996**, 42, 5, 1477-1478
- [75] Gundlach H., Müller M. J., Kutchan T. M., Zenk H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 2389-2393
- [76] Reymond P., Farmer E. E., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1998**, 1, 404-11
- [77] Cheong Y. H., Chang H. S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S., *Plant Physiol.*, **2002**, 129, 661-77
- [78] Musser R. O., Hum-Musser S. M., Eichenseer H., Peiffer M., Ervin G., Murphy J. B., Felton G. W., *Nature*, **2002**, 416, 599-600
- [79] Konno K., Okada S., Hirayama C., *J. Insect Physiol.*, **2001**, 47, 1451-1457
- [80] Fauq A. H., Singh R. P., Meshri D. T., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, **2001**
- [81] Krumm T., *Dissertation*, **1998**
- [82] Ping L., Büchler R., Mithöfer A., Svatos A., Spittle D., Dettner K., Gmeiner S., Piel J., *Environ. Microbiol.*, **2007**, 9, 1572-1583
- [83] Yoshinaga N., Morigaki N., Matsuda F., Nishida R., Mori N., *Ins. Chem Microbiol.*, **2005**, 35, 175-184
- [84] Kuhn J., Pettersson E. M., Feld B. K., Burse A., Termonia A., Pasteels J., M., Boland W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, 101, 38, 13808-13813
- [85] Ohfuné Y., Kurakowa N., Higuchi N., Saito Masayuki, Hashimoto M., Tanaka T., *Chemistry Letters*, **1984**, 441-444
- [86] Frigerio M., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 12, 4537

- [87] More J. D., Finney N. S., *Organic Letters*, **2002**, 4, 3001
- [88] Chhabra S. R., Harty C., Hooi D. S. W., Daykin M., Williams P., Telford G., Pritchard D. I., Bycroft B. W., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 97-104
- [89] Cha C., Gao P., Chen Y., Shaw P. S., Farrand S. K., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **1998**, 11, 1119-1129
- [90] Halitschke R., Schittko U., Pohnert G., Boland W., Baldwin I. T., *Plant Physiol.*, **2001**, 125, 711-717
- [91] Funke M., Büchler R., Mahobia V., Schneeberg A., Ramm M., Boland W., *CheBioChem*, **2008**, 9, 12, 1953-1959
- [92] Yates E. A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S. R., Sockett R. E., Goldner M., Dessaux Y., Cámara M., Smith H., Williams P., *Infection and Immunity*, **2002**, 70, 10, 5635-5646
- [93] Kaufmann G. F., Sartorio R., Lee S., Rogers C. J., Meijler M. M., Moss J. A., Clapham B., Brogan A. P., Dickerson T. J., Janda K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, 102, 309-314
- [94] Dong Y., Wang L., Xu J., Zhang H., Zhang X., Thang L., *Nature*, **2001**, 411, 813-817
- [95] Li L. L., Malone J. E., Iglewski B. H., *J. Bacteriol.*, **2007**, 189, 12, 4367-4374
- [96] Nuhn P., *Naturstoffchemie*, **1997**, 671-674
- [97] Dewick P. M., *Med. Nat. Prod.*, **2002**, 311-313
- [98] Rodwell V. W., *Catabolism of the Carbon Skeletons of Amino Acids*, *Harpers Biochemistry*, **1993**
- [99] *New England Journal of Medicine*, **1952**, 247, 7, 267-269
- [100] *Beilstein* (14), 2625 / *Merck* 13, 9271
- [101] Witte W., Klare I. W. G., *Selective pressure by antibiotics as feed additives*, **1999**, 27, 35-38
- [102] *Zeitschrift für Chemotherapie*, **2005**, 5
- [103] Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Türbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D., Beck E., *Science*, **1999**, 285, 1573-1576
- [104] Murakawa T., Sakamoto H., Fukada S., Konishi T., Nishida M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1982**, 224-230
- [105] Okabe N., Makino T., *Acta Csyst.*, **1999**, C55, 300-302
- [106] Parise J. B., *Acta Cryst.*, **1986**, C42, 147-149

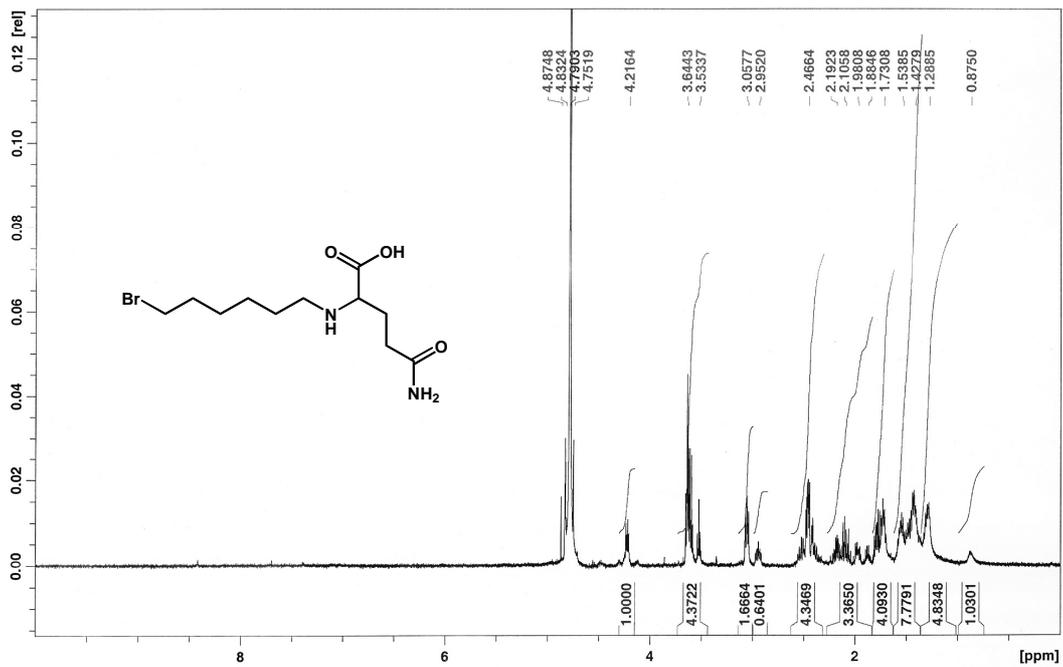
- [107] Okabe N., Muranishi Y., *Acta Cryst.*, **2002**, E58, m287-m289
- [108] Okabe N., Muranishi Y., *Acta Cryst.*, **2003**, E59, m244-m246
- [109] Dobrzynska D., Jerzykiewicz L. B., Duczmal M., *Polyhedron*, **2005**, 24, 407-412
- [110] Nakamura M., Kitamura C., Uexama H., Yamana K., Yoneda A., *Analytical Sciences*, **2005**, 21, X15-X16
- [111] Okabe N., Muranishi Y., *Acta Cryst.*, **2002**, C58, m475-477
- [112] Tsien R. Y., *Biochemistry*, **1980**, 19, 2396-2404
- [113] Schnee C., Köllner T. G., Gershenzon J., Degenhardt J., *Plant Physiol.*, **2002**, 130, 2049-2060
- [114] Frey M., Stettner C., Paré P. W., Schmelz E. A., Tumlinson J. H., Gierl A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, 97, 26, 14801-14806
- [115] Schmäzlin K., *Dissertation*, **2003**
- [116] Bergomaz R., Boppré M., *J. Lepidopterists´Soc.*, 1986, 131-137
- [117] Okabe N., Muranashi Y., *Acta Cryst.*, 2002, C58, m578-m580
- [118] Dobrzynska D., Jerzykiewicz L. B., Jezierska J., Duczmal M., *Crystal Growth & Design*, **2005**, 5, 5, 1945-1951
- [119] Dobrzynska D., Duczmal M., Jerzykiewicz L. B., Warchulska J., Drabent K., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 110-117
- [120] Koman M., Balaghova, Valigura D., *Acta Cryst.*, **1998**, 1279-1280

8 Anhang

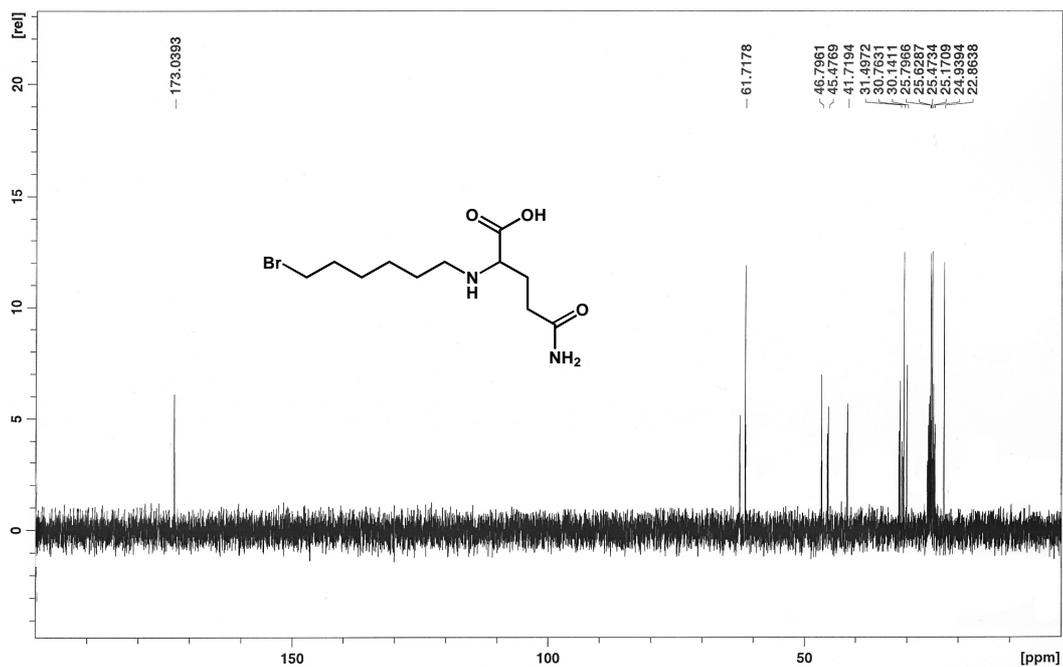
8.1 Spektren

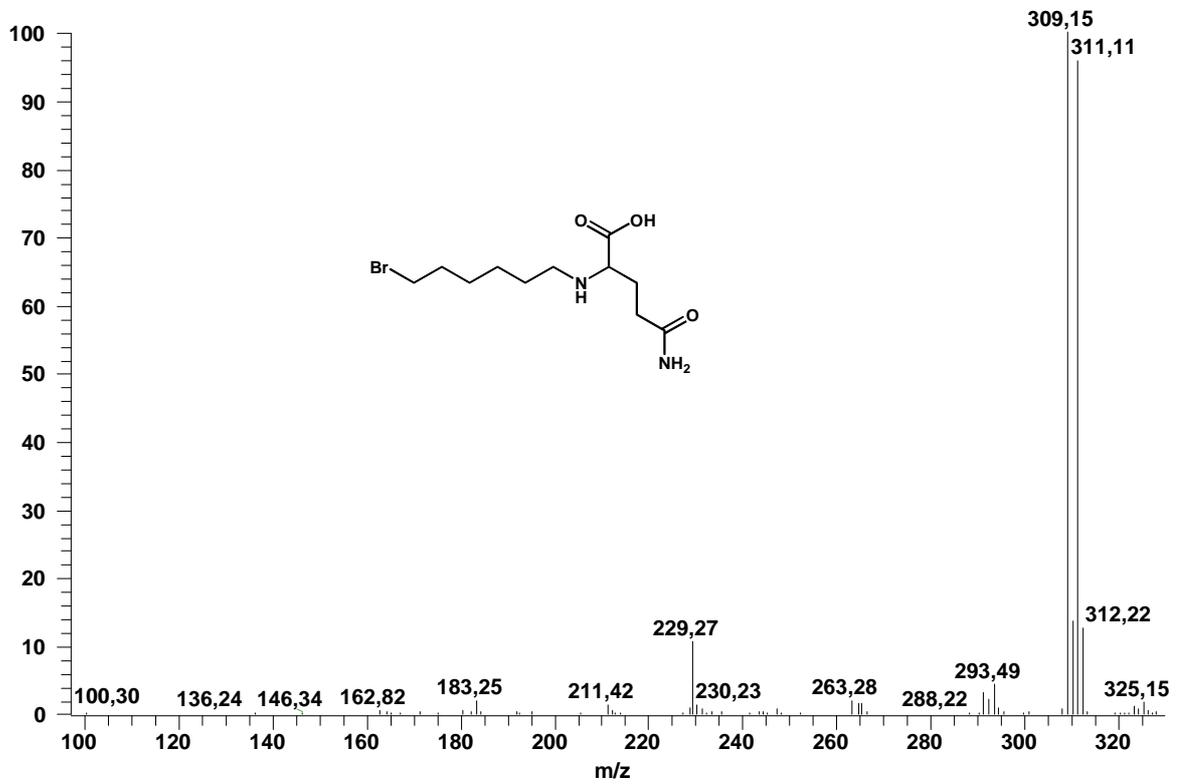
8.1.1 *N*-(6Bromhexyl)-glutamin

8.1.1.1 ^1H -NMR-Spektrum von *N*-(6Bromhexyl)-glutamin



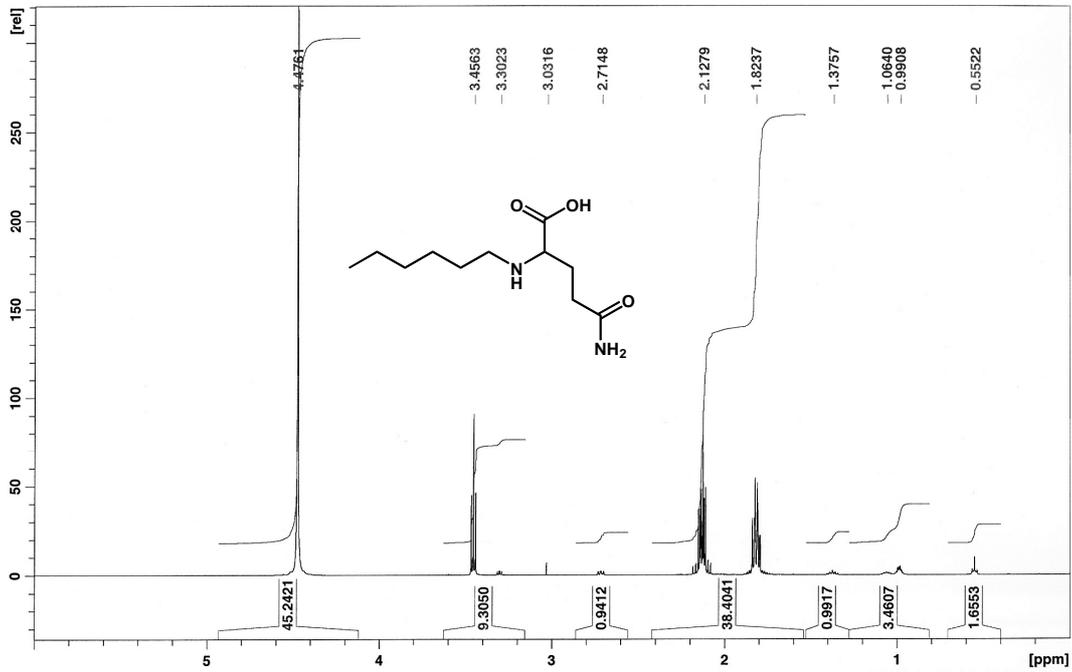
8.1.1.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von *N*-(6Bromhexyl)-glutamin



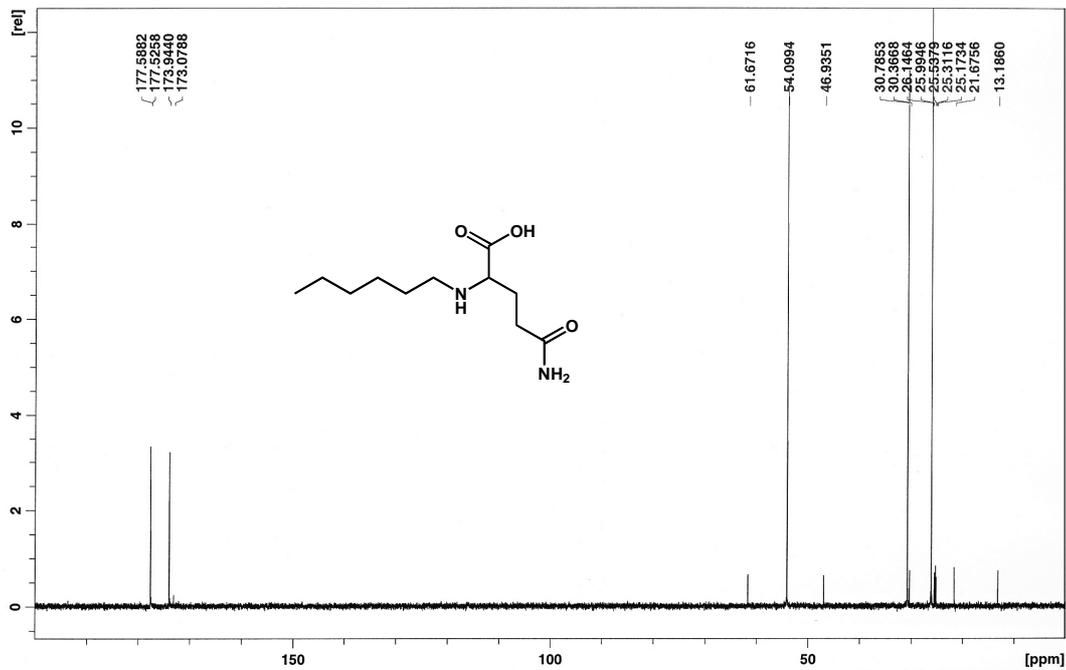
8.1.1.3 APCI-MS-Spektrum von *N*-(6Bromhexyl)-glutamin

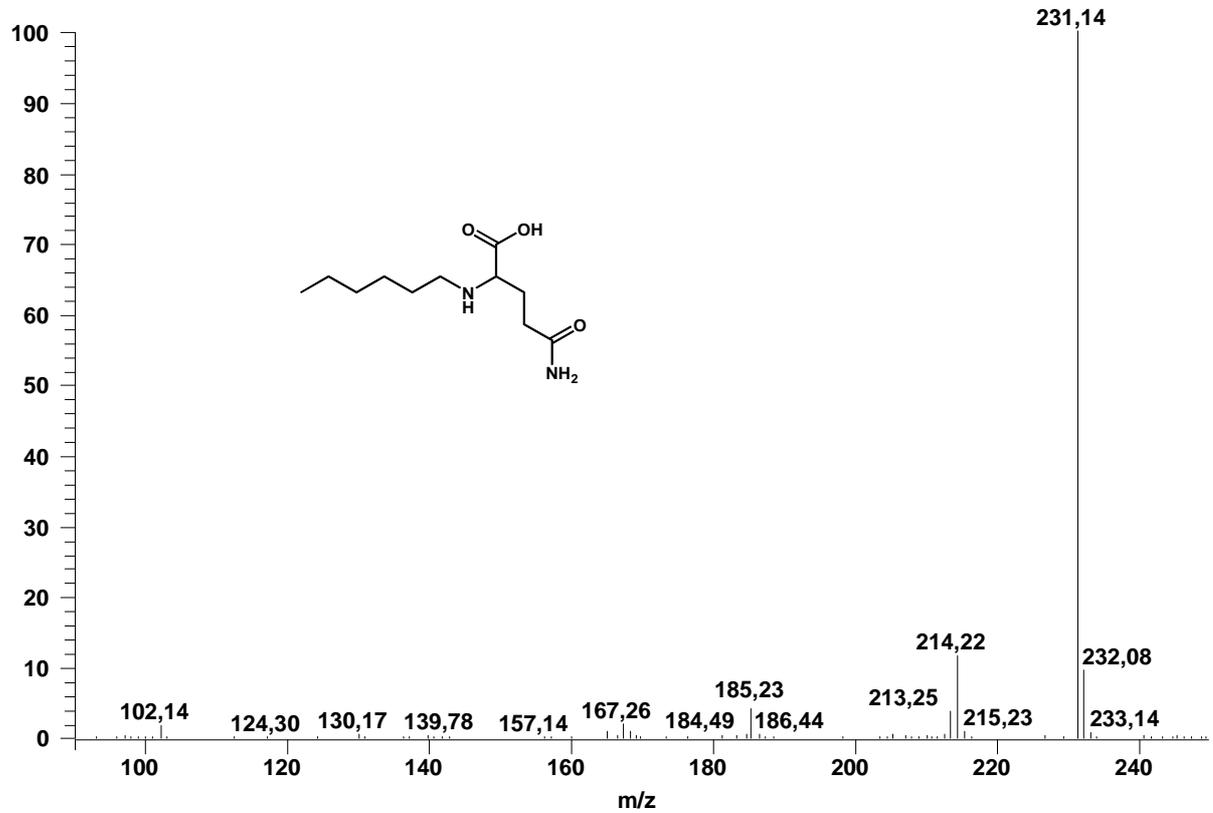
8.1.2 *N*-Hexylglutamin

8.1.2.1 ¹H-NMR-Spektrum von *N*-Hexylglutamin



8.1.2.2 ¹³C-NMR-Spektrum von *N*-Hexylglutamin



8.1.2.3 APCI-MS-Spektrum von *N*-Hexylglutamin

8.2 Abkürzungsverzeichnis

8.2.1 Allgemeine Abkürzungen

8-HChC	8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure
AAH	<i>N</i> -Acyl-Aminosäure-Hydrolase
ADP	Adenosindiphosphat
AHL	<i>N</i> -Acylhomoserinlacton / <i>N</i> -Acylhomoserinlactone
AI 1	Autoinducer 1
AI 2	Autoinducer 2
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
CLS	Closed Loop Stripping (Sammlung von Duftstoffen im geschlossenen System)
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on
DMNT	4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerophosphocholin
DXP	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
et. al.	und Kollegen
FMN	Flavinmononucleotid
FMNH ₂	reduziertes Flavinmononucleotid
fmol	Femtomol (10 ⁻¹⁵ Mol)
g	Gramm

GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
H	Proton
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSL	Homoserinlacton
IGL	Indol-Glycerol-Lyase
IR	Infrarotspektrometrie / Infrarotspektrometer
I_{rel}	relative Intensität
I	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten / Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol (Stoffmenge $6 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrum
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
m/z	Masse / Ladungsverhältnis
NADP⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NMR	Magnetische Kernresonanz
OH	Hydroxy

pg	Pikogramm (10^{-12} Gramm)
pmol	Pikomol (10^{-12} Mol)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Retentionszeit
t	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom (total ion count)
TPS	Terpensynthase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettspektroskopie
δ	chemische Verschiebung
μg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
μmol	Mikromol (10^{-6} Mol)

8.2.2 Abkürzungen NMR-Spektroskopie

br	breit
d	Dublett
m	Multiplett
pt	pseudo-Triplett
q	Quartett
s	Singulett
se	Sextett
t	Triplett

8.3 Tabellen

Tabelle 8: Wertetabelle für die Intensitätszunahme der Charge-Transfer-Banden des Komplexes aus 8-HChC (**58**) mit Fe(II), Abbildung 30

t [min]	483 nm	610 nm
0	0,00590	0,00405
1	0,02703	0,01279
2	0,03584	0,02006
3	0,04139	0,02450
4	0,04519	0,02766
5	0,04785	0,02991
6	0,05075	0,03161
7	0,05272	0,03344
8	0,05436	0,03470
9	0,05526	0,03558
10	0,05633	0,03625
11	0,05771	0,03734
12	0,05916	0,03825
13	0,05996	0,03914
14	0,06100	0,03994
15	0,06164	0,04041
16	0,06226	0,04088
17	0,06281	0,04153
18	0,06314	0,04201
19	0,06341	0,04245
20	0,06395	0,04257
21	0,06426	0,04269
22	0,06437	0,04331
23	0,06472	0,04322
24	0,06498	0,04355
25	0,06503	0,04388
26	0,06507	0,04428
27	0,06519	0,04422
28	0,06527	0,04444
29	0,06542	0,04464
30	0,06567	0,04468

Tabelle 9: Kristalldaten und Strukturdetails für den Komplex aus Fe^(III) und der 8-HChC

Identification code	FO3480
Empirical formula	C ₂₀ H ₁₆ FeN ₂ O ₇
Formula weight	452.20
Temperature	183(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 7.2542(15) Å α = 98.51(3)° b = 8.5777(17) Å β = 102.09(3)° c = 15.685(3) Å γ = 104.70(3)°
Volume	902.0(3) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.665 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.886 mm ⁻¹
F(000)	464
Crystal size	0.06 x 0.06 x 0.04 mm ³
Theta range for data collection	2.51 to 27.40°
Index ranges	-9<=h<=8, -11<=k<=9, -18<=l<=20
Reflections collected	6254
Independent reflections	4044 [R(int) = 0.0377]
Completeness to theta = 27.40°	98.3 %
Absorption correction	NONE
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4044 / 0 / 279
Goodness-of-fit on F ²	1.043
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0617, wR2 = 0.1460
R indices (all data)	R1 = 0.0960, wR2 = 0.1645
Largest diff. peak and hole	0.777 and -0.729 e.Å ⁻³

8.4 Publikationen und Vorträge

8.4.1 Publikationen

M. Funke, R. Büchler, V. Mahobia, A. Schneeberg, M. Ramm, W. Boland, Rapid Hydrolysis of Quorum-Sensing Molecules in the Gut of *Spodoptera* Larvae, ChemBioChem, 2008, 9, 12, 1953 – 1959

8.4.2 Vorträge und Poster

10.10.2008 Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen in Würzburg

Vortrag: “Rapid Hydrolysis of Quorum-Sensing-Molecules in the Gut of *Spodoptera* Larvae”

08/2007: International Symposium on Insect-Plant Relationship Uppsala, Schweden

Poster: “Rapid Hydrolysis of *N*-Acylhomoserine Lactones in the Gut of *Spodoptera* Larvae”

07/2007: ISCE Meeting Jena

Poster: “Rapid Hydrolysis of *N*-Acylhomoserine Lactones in the Gut of *Spodoptera* Larvae”

8.5 Lebenslauf

Name: Matthias Funke
Geburtsdatum: 03.07.1979 in Jena
Nationalität: deutsch
Eltern: Wolfgang Funke
Petra Funke (geb. Meyer)
Geschwister: Gabriele Funke

Schulbildung:

09-1986 – 08-1991 Besuch der Grundschule in Kahla / Thür.
09-1991 – 08-1998 Besuch des Leuchtenburg-Gymnasiums in Kahla / Thür.
09.07.1998 Erhalt des Abiturzeugnisses

Studium

10-1999 – 11-2003 Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
11-2003 – 09-2004 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Wilhelm Boland am MPI für Chemische Ökologie in Jena
Thema: „Zur Chemie des Insektendarms: *N*-Acylglutamin-konjugate und die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure“
17.09.2004 Erhalt des Diplomzeugnisses

Dissertation

10-2004 – 10-2008 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Anleitung von Prof. Wilhelm Boland am MPI für Chemische Ökologie in Jena
Thema: „*N*-Fettsäure-aminosäure-konjugate und die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven“

9 Dank

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Wilhelm Boland besonders herzlich für die Rundumbetreuung meiner Dissertation, für die vielen anregenden Diskussionen, Ideen, Ratschläge und bei Bedarf motivierenden Worte.

Herrn Prof. Ernst Anders danke ich für die Betreuung meiner Dissertation, die damit meine Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena ermöglicht hat.

Dr. Helmar Görls von der Friedrich-Schiller-Universität in Jena danke ich sehr für die Röntgenstrukturanalysen der Kristalle und die Geduld auf dem langen Weg zum perfekten Kristall.

Dr. Micheal Ramm vom Hans-Knöll-Institut in Jena danke ich für die Bereitstellung von Reporterorganismen zum Nachweis von *N*-Acylhomoserinlactonen und die hilfreichen Ratschläge bezüglich des Quorum Sensing.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Dieter Spittler für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Problembewältigung im Laboralltag und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Karla Tolzin-Banasch, Stefan Bartram und Axel Mithöfer danke ich sehr für das kurzfristige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Gen Arimura und Regina Stieber danke ich für die unbezahlbaren Tipps und vielen Ratschläge bei der Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial und die sehr positive Atmosphäre, die zur Auflockerung des monotonen Pipettier-Alltags beitrug.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. David Heckel des Max-Planck-Instituts für Chemische Ökologie in Jena für *Pieris rapae* Larven.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Ian T. Baldwin des Max-Planck-Instituts für Chemische Ökologie in Jena für Raupen des amerikanischen Tabakswärmers *Manduca sexta* Larven.

Ich danke Christiane Schnee aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jonathan Gershenzon des Max-Planck-Instituts für Chemische Ökologie in Jena für die Maissamen des Typs „*Delprim hybrid*“.

Sabrina Discher möchte ich für vieles danken: für die Inspiration bei der Vorbereitung von Vorträgen und Postern, für die gemeinsame Bewältigung der Tücken diverser Messgeräte, für die Unterstützung in allen Lebenslagen, kurzum für eine ausgesprochen gute „Banknachbarschaft“ und verlässliche Freundschaft.

Ein herzliches Dankeschön gilt Silvia Lindemann für die bereitwillige Unterstützung beim Ausfüllen von Formularen, die vielen netten Unterhaltungen und die Freundschaft, die die Zeit am Institut noch schöner gemacht hat.

Sindy Frick danke ich für die Beantwortung unzähliger molekularbiologischer Fragen, die vielen unterhaltsamen Mensagänge und die sehr angenehme Atmosphäre im Büro.

Jiri Svoboda, Mareike Richter, Roy Kirsch, Kerstin Ploß und Antje Burse möchte ich für die angenehme Büroatmosphäre und die vielen interessanten Gespräche danken.

Rita Büchler und Jelena Pesek danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und für die Flexibilität beim unbürokratischen Tauschen von Messzeiten.

Angelika Berg danke ich ganz besonders für die Pflege der Raupen, die Anzucht meiner Versuchspflanzen und nicht zuletzt für die Erfüllung der vielen Extrawünsche.

Andrea Fiedler möchte ich für die Unterstützung bei der Aufnahme von IR-Spektren der Kristalle danken.

Ich danke Michael Wenzler für die Messungen zur ^{19}F -NMR-Spektroskopie und Daniel Veit für die Anfertigung der Einsätze für die NMR-Röhrchen zur bildgebenden NMR.

Prof. Martin Heil danke ich sehr für die Unterstützung bei den Vorbereitungen zur Betreuung einer Seminarfacharbeit sowie die anregenden Diskussionen zu meiner Dissertation.

Ich möchte mich bei allen bisher nicht genannten aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe dafür bedanken, dass die Arbeitsatmosphäre stets so angenehm war und mir der Abschied dadurch umso schwerer fällt: Stefan Garms, Doreen Schachtschabel, Andreas Habel, Heiko Maischak, Sandy Rottloff, Margit Leitner, Fabio Rui, Anne Behrend, Ilka Schoenian, Daniela Schmid, Anja Strauß, Radhika Venkatesan, Stefan Bartram, Jeannette Kley, Anja David, Maritta Kuhnert, Paulina Dabrowska, Jana Becher, Nicolas Delaroque, Liyang Ping, Vertica Mahobia und Alexander Schneeberg.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von Herzen für eine wunderschöne, wohlbehütete Kindheit, die endlose Geduld speziell während meiner Gymnasialzeit und nicht zuletzt für die aufopferungsvolle Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne die ich heute nicht da wäre, wo ich bin. Ihr seid die beste Familie, die ich mir wünschen kann!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Freundin Ellen Kaufmann, die mich über die letzten Jahre durch alle Höhen und Tiefen des Studiums und der Dissertation begleitet hat, die sich mit mir über Erfolge gefreut und mir in weniger erfolgreichen Tagen liebevoll die nötige Motivation gegeben hat, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Sebastian Landschulze und Jasmin Ilgner danke ich von Herzen für die langjährige und verlässliche Freundschaft, die sehr zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen hat.

Ich danke Martin Presselt für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen während diverser Mountainbike-Touren durch Jenas Berge.

Selbständigkeitserklärung

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

Jena, den 14.11.2008
