

Struktur und Funktion von Sexualpheromonen der Diatomee *Seminavis robusta*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologe (Mikrobiologie) Johannes Frenkel

geboren am 1. September 1986 in Leipzig

Gutachter

1. Prof. Dr. Georg Pohnert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Wilhelm Boland (Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena)
3. Prof. Dr. Nils Kröger (Technische Universität Dresden)

Tag der Verteidigung: 04.07.2014

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
1. Zusammenfassung	1
2. Einführung	3
2.1. Diatomeen und sexuelle Reproduktion in Algen	3
2.2. Bekannte Pheromonsysteme der Heterokontophyten	7
2.3. Bekannte Pheromonsysteme der Grünalgen	10
2.4. Problematik der Strukturuntersuchung von Pheromonen	16
2.5. Sexuelle Reproduktion in Diatomeen	17
3. Kapitel I: Identifizierung des ersten Diatomeen-Pheromons	23
3.1. Grundlagen und Aufgabenstellung	23
3.2. Kultivierung von <i>S. robusta</i>	25
3.3. Das Paarungssystem von <i>S. robusta</i>	26
3.4. Strukturaufklärung des Lockstoffs	30
3.5. Synthese von Diprolin	33
3.6. Diprolin als Diatomeenpheromon	38
3.7. Diprolinabbau	43
3.8. Die biologische Bedeutung von Diketopiperazinen	45
4. Kapitel II: Trennung der Diprolin Enantiomere	49
4.1. Grundlagen und Aufgabenstellung	49
4.2. Cyclodextrine	50
4.3. Alternative Trennmethoden	52
4.4. Chirale Trennung von Diprolin	54
4.5. Test auf Racemisierung zu L/D-Diprolin	58
4.6. Diketopiperazine aus D-Aminosäuren	61

5.	Kapitel III: Synchronisierung des Paarungsablaufes	63
5.1.	Grundlagen und Aufgabenstellung.....	63
5.2.	Identifizierung des SIP ⁺ -Kandidaten.....	65
5.3.	Anreicherung von SIP ⁺	68
5.4.	Aufreinigung von SIP ⁺	71
5.5.	SIP ⁺ als Zellzyklusarretierungspheromon	75
5.6.	Strukturanalyse.....	76
5.7.	Strukturdiskussion.....	80
6.	Vergleich des Pheromonsystems von <i>S. robusta</i> mit den Systemen der Grünalgen und Heterokontophyta	82
6.1.	Diversität der Pheromone.....	82
6.2.	Synchronisierung der Paarung	85
6.3.	Schlussfolgerung	89
7.	Materialien und Methoden	90
7.1.	Festphasenextraktion.....	90
7.2.	UPLC/MS.....	90
7.3.	GC/MS	93
7.4.	HPLC.....	95
7.5.	SFC/MS.....	96
7.6.	Orbitrap	98
7.7.	Allgemeine Laborgeräte.....	99
7.8.	Kultivierungsbedingungen von <i>S. robusta</i>	99
7.9.	Das Paarungssystem von <i>S. robusta</i>	101
7.10.	Strukturaufklärung des Lockstoffs	103
7.11.	Synthese von Diprolin.....	103
7.12.	Diprolin als Diatomeenpheromon	106
7.13.	Diprolinabbau.....	107

7.14.	Andere Diketopiperazin-Produzenten	108
7.15.	Cyclodextrine	109
7.16.	SFC-Trennung von Diprolin.....	109
7.17.	Identifizierung des SIP ⁺ -Kandidaten	110
7.18.	Anreicherung von SIP ⁺	111
7.19.	Reinigung von SIP ⁺	112
7.20.	SIP ⁺ als Zellzyklusarretierungspheromon	113
7.21.	Strukturanalyse	114
7.22.	Diversität der Pheromone	115
8.	Literaturverzeichnis	116
9.	Anhang	137

Abkürzungsverzeichnis

CD	Circulardichroismus
CI	Chemische Ionisierung
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CoA	Coenzym A
EI	Electron impact ionization / Elektronenstoß-Ionisierung
ESI	Elektrospray Ionisierung
GC	Gaschromatographie / Gaschromatograph
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography / hydrophile Interaktionschromatographie
HLB	Hydrophilic-lipophilic balanced / Hydrophil-lipophil ausgeglichen
HPLC	High-performance liquid chromatography / Hochdruckflüssigchromatographie
LC	Liquid chromatography / Flüssigchromatographie
MAX	Mixed mode anion exchange / Mischmodus-Anionen-Austauscher
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
MT ⁺	Angezogener Paarungstyp
MT ⁻	Anziehender Paarungstyp
MRM	Multiple reaction monitoring
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungsverhältnis
NIST	National Institut of Standards and Technology
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy / Kernresonanzspektroskopie
NPLC	Normal phase liquid chromatography / Normalphasen-Flüssigchromatographie
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
PKS	Polyketid-Synthase
qTOF	Quadrupole/Time-of-Flight
Rs	chromatographische Peakauflösung
RP	Reversed phase / Umkehrphase
POSC	Polar organic solvent chromatography / Polare Organische-Lösungsmittelchromatographie

QqQ	Triple Quadrupole Massenspektrometer
SFC	Supercritical fluid chromatography / Überkritische Flüssigchromatographie
SIM	Single ion monitoring
SIP	Sex-induzierendes Pheromon
SPE	Solid phase extraction / Festphasenextraktion
SST	Species specific sexual size treshold / speziesspezifische sexuelle Größengrenze
UPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography / Ultra- Hochdruckflüssigchromatographie
UPC ²	Ultra-performance convergence chromatography
ZAP	Zellzyklus arretierendes Pheromon

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopie von Diatomeenzellwänden.	3
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>S. robusta</i>	4
Abbildung 3: Gameten und Gametangien in Heterokontophyten.	7
Abbildung 4: Paarung in <i>Chlamydomonas</i>	11
Abbildung 5: Sexuelle Reproduktion in <i>Volvox</i>	13
Abbildung 6: Sexuelle Reproduktion in <i>Closterium</i>	15
Abbildung 7: Gameten in Diatomeen.	19
Abbildung 8: Paarungsverhalten in <i>S. robusta</i>	23
Abbildung 9: Kultivierung von <i>Seminavis robusta</i> in verschiedenen Medien.	25
Abbildung 10: Biologischer Nachweis des Lockstoffs.	27
Abbildung 11: Metabolomischer Vergleich.	29
Abbildung 12: Strukturaufklärung des Lockstoff-Kandidaten.	32
Abbildung 13: Synthese von Diprolin.	33
Abbildung 14: Koinjektion von Diprolin und dem Algenmetaboliten.	34
Abbildung 15: Mögliche Konfigurationen von Diprolin.	35
Abbildung 16: CD-Spektroskopie von synthetischem und natürlichem Diprolin.	36
Abbildung 17: GC/MS Analyse des Diprolin-Syntheseprodukts.	37
Abbildung 18: Synthetisches Diprolin im Attraktionsbioassay.	40
Abbildung 19: Kinetik der Pheromonbildung.	41
Abbildung 20: Bakterieller Einfluss auf das Paarungssystem.	43
Abbildung 21: Cyclodextrin-Analytik.	52
Abbildung 22: Chirale SFC/MS.	55
Abbildung 23: Anwendung von SFC nach Methodenoptimierung.	57
Abbildung 24: Enantiomerenverhältnisse von Diprolin während des Pheromonauf- und abbaus.	59
Abbildung 25: Zellzyklusarretierung in <i>S. robusta</i>	64
Abbildung 26: Methodenoptimierung.	65
Abbildung 27: Identifizierung von SIP ⁺	67
Abbildung 28: Anreicherung von SIP ⁺	69
Abbildung 29: SIP ⁺ -Kandidat in verschiedenen Paarungstypen.	70
Abbildung 30: Metabolomische Analyse.	71

Abbildung 31: Protokoll zur Identifizierung von SIP ⁺	73
Abbildung 32: Aufreinigung von SIP ⁺	74
Abbildung 33: Wirkung von SIP ⁺ als ZAP ⁺	76
Abbildung 34: Strukturanalyse von SIP ⁺	77
Abbildung 35: NMR-Messung der SIP ⁺ Fraktion.	80
Abbildung 36: Pheromonstrukturen aus Grünalgen und Heterokontophyten.	83
Abbildung 37: Das Pheromonsystem von <i>Seminavis robusta</i>	88

1. Zusammenfassung

Mikroalgen gehören zu den wichtigsten Primärproduzenten der Erde, wobei die Diatomeen zu den artenreichsten Gruppen der Mikroalgen zählen. Aufgrund des starren Aufbaus der mineralischen Zellwand verringert sich die Zellgröße der Diatomeen nach jeder Zellteilung. Die Initialgröße kann meist nur durch sexuelle Reproduktion wiederhergestellt werden. Die sexuelle Reproduktion erfordert eine Kommunikation der Zellen, die über Pheromone vermittelt wird. Diese ermöglichen eine Anlockung der Paarungspartner und die Synchronisierung der sexuellen Vorgänge. Trotz der herausragenden Bedeutung und stetiger Erforschung der sexuellen Reproduktion in Diatomeen, wurden keinerlei Pheromonstrukturen in diesen Mikroalgen beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Erforschung des Pheromonsystems der Diatomee *Seminavis robusta* sowie die Strukturaufklärung des ersten Diatomeenpheromons. Zur Eingrenzung der möglichen Substanzklasse des Pheromons wurde zunächst ein umfassender Literaturüberblick erstellt, um festzustellen, ob eine Konsistenz in der Pheromonchemie der Organismen vorhanden ist, die mit Diatomeen verwandt sind oder physiologische Gemeinsamkeiten zu den Diatomeen aufweisen. Dazu zählen die Braunalgen und Oomyceten, die zusammen mit den Diatomeen die phylogenetische Gruppe der Heterokontophyta bilden; ebenso wie Grünalgen, welche wie die Diatomeen oft einzellige und photosynthetisch aktive, (meist) aquatische Organismen sind. Allerdings ließ sich in den Organismen eine große Diversität in der Pheromonchemie feststellen, welche einfache Aminosäuren, niedrigmolekulare Plastochinone, Steroide, Diterpene und Kohlenwasserstoffe sowie hochmolekulare Glykoproteine umfasst. Bei der Untersuchung des Diatomeenpheromons aus *S. robusta* können somit keine Pheromonkandidaten oder potenzielle Substanzklassen getestet werden. Die verschiedenen Pheromonsysteme in Grünalgen und in den Heterokontophyta werden in der Einführung der Dissertation vorgestellt. Zunächst wurden die Kultivierung von *S. robusta*, Extraktionstechniken des Mediums, sowie ein Bioassay zum Nachweis der Pheromonwirkung optimiert. Dadurch konnte herausgefunden werden, dass das Pheromonsystem dieser Diatomee aus drei Pheromonen besteht, wovon zwei die sexuellen Vorgänge induzieren und synchronisieren und das dritte als Lockstoff dient. Die Untersuchung des Lockstoffs erfolgte über metabolomische und massenspektrometrische Methoden, wobei „L-Diprolin“, das zyklische Dipeptid aus der Aminosäure L-Prolin, als potenzieller Lockstoff identifiziert wurde. L-Diprolin wurde synthetisiert und mittels verschiedener Bioassays als erstes Diatomeenpheromon bestätigt.

Dabei konnte auch festgestellt werden, dass das synthetische Enantiomer D-Diprolin eine vergleichbare Aktivität hat.

Eine Racemisierung von L-Diprolin während der Pheromonperzeption könnte die biologische Aktivität von D-Diprolin erklären. Diese Untersuchungen erforderten die Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung des Lockstoffs während des Paarungsvorganges. Um diese zu analysieren, wurden verschiedene chirale chromatographische Techniken getestet. Dabei erwies sich überkritische Flüssigchromatographie als geeignet, um eine Trennung der synthetischen Diprolinenantimere zu verwirklichen. Durch diese Technik konnte die Stereochemie von Diprolin während des Paarungsvorganges untersucht und die Existenz von D-Diprolin in den Extrakten nachgewiesen werden. Die geringe Konzentration von D-Diprolin in den Proben impliziert jedoch keine Racemisierung von L-Diprolin während der Pheromon-Rezeptor-Interaktion. Die Prävalenz und Aktivität von D-Diketopiperazinen und Pheromonenantimere in der Natur wird diskutiert.

Die Synchronisierung der sexuellen Vorgänge in *S. robusta* wurde ebenfalls untersucht. Durch eine Kombination von metabolomischer Analyse und Bioassay-geleiteter Fraktionierung konnte die Identität eines Sex-induzierenden Pheromons ermittelt werden. Dabei wurde eine sulfatierte und polyhydroxylierte Substanz mit einer Masse von 843.209 Da als Pheromon identifiziert und durch zweidimensionale Chromatographie verifiziert. Versuche zur Strukturaufklärung mittels Kernresonanzspektroskopie schlugen fehl. Dafür konnte in weiteren Bioassays gezeigt werden, dass dieses Pheromon sowohl für die Induktion der Diprolinbildung, als auch für die Arretierung des Zellzyklus der Algen verantwortlich ist.

Im letzten Abschnitt wurden die bisher bekannte Pheromonchemie und die Strategien zur Synchronisierung der sexuellen Prozesse in Mikroalgen und Heterokontophyten unter Einbeziehung der Erkenntnisse aus *S. robusta* zusammengefasst und miteinander verglichen.

2. Einführung

2.1. Diatomeen und sexuelle Reproduktion in Algen

Diatomeen gehören mit einer Zahl von 30.000 – 100.000 rezenten Spezies zu den artenreichsten Gruppen der Algen (Mann und Vanormelingen 2013). Sie haben einen Anteil von etwa 20% an der weltweiten Kohlenstofffixierung (Field 1998) und von 40% an der gesamten Primärproduktion im Ozean (Nelson *et al.* 1995). Sie zählen sowohl im Phytoplankton als auch in benthischen Biofilmen oftmals zu den zahlreichsten und diversesten Organismen (Mann und Droop 1996; Consalvey *et al.* 2004). Diatomeen, auch Kieselalgen genannt, werden zu der polyphyletischen Gruppe der Mikroalgen gezählt, welche alle eukaryotischen, primär photosynthetisch aktiven und mikroskopisch kleinen Organismen umfassen. Diatomeen sind bekannt für ihre Vielfalt an biomineralisierten Zellwänden aus Silica, welche unter anderem eine mechanische Abwehr gegen Fraßfeinde darstellen (Hamm *et al.* 2003). Die Klassifizierung von Diatomeen in die paraphyletischen Gruppen Centrales (centrische Diatomeen) und Pennales (pennate Diatomeen) erfolgt nach der Morphologie der Zellwand (Theriot 2010). Die Zellwand der Centrales besitzt eine radiär symmetrische Form (Abbildung 1a), die der Pennales eine bilateral symmetrische (Abbildung 1b). Die Form der Zellwand korreliert meist auch mit verschiedenen physiologischen Eigenschaften der Algen (siehe 2.5, S.17)

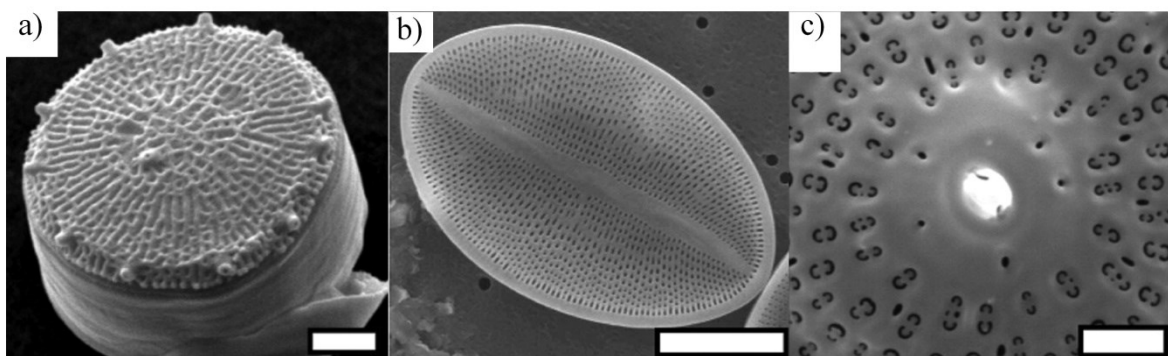


Abbildung 1: Elektronenmikroskopie von Diatomeenzellwänden. a) Centrische *Thalassiosira pseudonana*, Balken = 1 μm . b) Pennate *Cocconeis* sp., Balken = 10 μm . c) Feinstruktur der Poren von *Ditylum brightwellii*, Balken = 2 μm . Nachdruck und Adaption nach (Hildebrand 2008). Copyright (2008) American Chemical Society.

Die Bildung der auf Silica basierenden Zellwandbestandteile benötigt weniger Ressourcen als vergleichbare Strukturen aus organischem Material, was den Diatomeen eventuell einen evolutionären Vorteil gegenüber anderen Algen bietet (Kröger und Poulsen 2008; Raven 1983). Die Zellwand besteht aus zwei ungleich-großen Hälften, die Theken genannt werden, wobei die größere Epitheka die Hypotheka umschließt. Jede Theke besteht aus einer sogenannten Valve, welche gleichmäßige Strukturen aus Rippen und Poren (Pickett-Heaps *et al.* 1990) (Abbildung 1c) aufweist und mindestens einem, meist aber mehreren Gürtelbändern, welche die Valven verbinden. Während der Zellteilung werden die Valven und Gürtelbänder intrazellulär in SDV (englisch: Silica depositing vesicles) gebildet, welche durch Exocytose der SDV zur Zelloberfläche gebracht werden (Kröger und Poulsen 2008). Jede Tochterzelle übernimmt eine elterliche Theke und stellt innerhalb dieser Theke ein kleineres Gegenstück neu her (Abbildung 2a). Da eine Tochterzelle demnach kleiner als die Mutterzelle ist, führt diese asymmetrische Zellteilung zu einer allmählichen Verkleinerung der Durchschnittszellgröße einer sich asexuell fortpflanzenden Diatomeenpopulation, was schlussendlich zum Tod der Algen führt. Dies kann jedoch vermieden werden, indem die ursprüngliche Zellgröße durch sexuelle Reproduktion wiederhergestellt wird (Chepurnov und Mann 2004; Round *et al.* 1990).

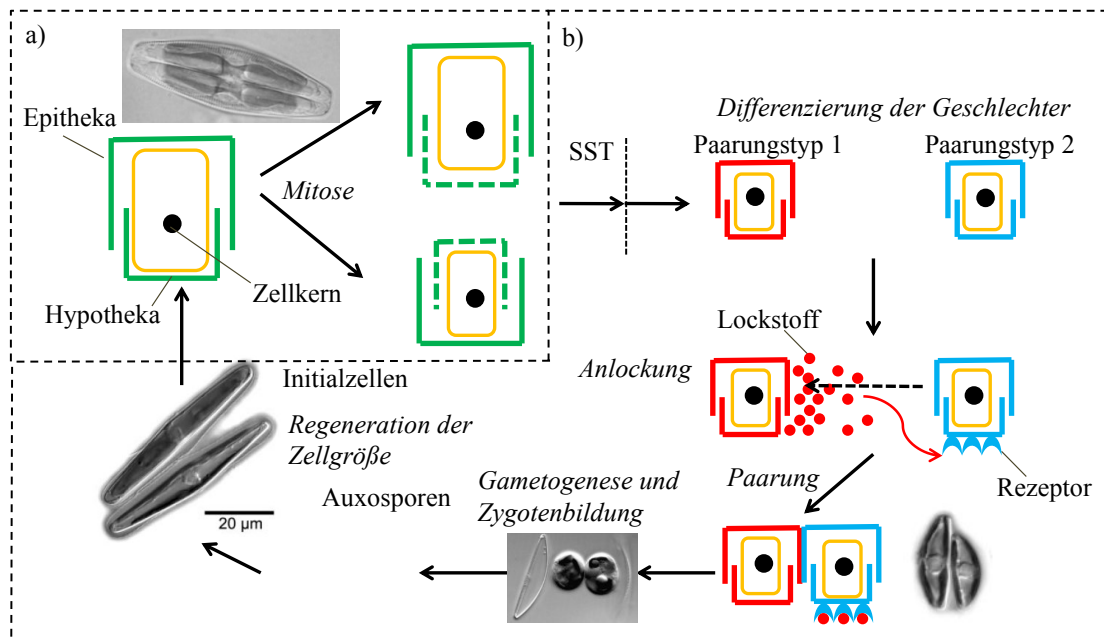


Abbildung 2: Lebenszyklus von *S. robusta*. a) Asexuelle Zellteilung. b) Sexuelle Reproduktion. SST = speziesspezifische sexuelle Größengrenze (51.6 μm). Nachdruck und Adaption der mikroskopischen Bilder der Zygoten nach (Chepurnov *et al.* 2002) sowie der paarenden Zellen, Auxosporen und Initialzellen nach (Chepurnov *et al.* 2008). Copyright (2002, 2008) John Wiley & Sons.

Sex stellt ein Schlüsselereignis im Lebenszyklus von Diatomeen dar, wird jedoch auch bei allen anderen Mikro- und Makroalgen auf verschiedene Art und Weise in den Lebenszyklus einbezogen. Da im Laufe des Kapitels neben Diatomeen auch andere ein- und mehrzellige Algen behandelt werden, müssen zunächst zum besseren Verständnis der sexuellen Reproduktion von Mikro- und Makroalgen wichtige Begriffe definiert werden. Die Definitionen orientieren sich an den Vorschlägen für die sexuelle Reproduktion von Diatomeen von Kaczmarska *et al.* (2013). Für eine einheitliche Terminologie werden die Begriffe im Folgenden auch für andere Organismenklassen angewandt. Die Lebenszyklen von Algen sind sehr vielfältig hinsichtlich des Ploidiegrads, der Dauer der asexuellen Phase, des Paarungssystems und der Größe der Gameten (Geschlechtszellen). Die Lebenszyklen können abhängig von der dominierenden asexuellen Phase haplontisch, diplontisch oder haplodiplontisch sein. Der Ploidiegrad beschreibt die Anzahl der Chromosomensätze in einem Zellkern. Bei einem einfach vorhandenen Chromosomensatz wird der Organismus als haploid bezeichnet, bei zwei Chromosomensätzen diploid. Mitose bzw. vegetatives Wachstum kann in der diploiden (diplontischer Lebenszyklus), haploiden (haplontischer Lebenszyklus) oder in beiden Phasen (haplodiplontischer Lebenszyklus) geschehen. Die sexuelle Reproduktion umfasst zunächst die Gametogenese, d.h. die Entwicklung der Gameten (Geschlechtszellen). Diese sind stets haploid und werden bei diplontischen Organismen durch Meiose produziert. In haplontischen und haplodiplontischen Organismen werden sie durch Aktivierung eines sexuellen Entwicklungsprogramms direkt aus haploiden, vegetativen Zellen gebildet. In einzelligen Lebewesen werden die Gameten produzierenden Zellen Gametangien genannt. In vielzelligen Algen sind die Gametangien strukturell komplexer. Sie enthalten die Gameten und entwickeln sich auf dem Thallus eines Gametophyten. Kompatible Gameten fusionieren zu einer diploiden Zygote. Doch zuvor müssen sich entweder die Gameten oder die Gametangien finden und paaren. Dies geschieht entweder gerichtet unter dem Einfluss von chemischen Signalen oder durch zufällige Begegnungen. Wenn eine erfolgreiche Paarung zwischen Gameten innerhalb einer klonalen Population möglich ist, wird das Paarungssystem homothallisch genannt. In heterothallischen Systemen ist die Paarung zwischen den Klonen nicht möglich, es werden sexuell kompatible und genetisch verschiedene Paarungstypen benötigt. In einigen Algengruppen sind auch gemischte Strategien mit Klonen vorhanden, die sich bevorzugt, aber nicht ausschließlich, homothallisch bzw. heterothallisch fortpflanzen. Ein weiteres wichtiges Kriterium

zwischen verschiedenen Gruppen sind morphologische und physiologische Unterschiede der Gameten. Dabei sind Isogameten komplett identisch. Im Gegensatz dazu besitzen die Gameten bei der anisogamen Befruchtung unterschiedliches Aussehen und/oder Verhalten. Im Falle von mobilen Gameten und gerichteter Bewegung, vermittelt durch chemische Signale, wird der anlockende Organismus (Gamet, Gametangium oder Paarungstyp) weiblich genannt, das angezogene Individuum wird männlich genannt. Ein extremer Fall der Anisogamie ist die Oogamie, bei der die deutlich größeren, immobilen, weiblichen Gameten Eier und die mobilen, männlichen Gameten Spermien genannt werden. Bei der Oogamie werden die männlichen Gametangien Antheridien und die weiblichen Gametangien Oogonien genannt. Wenn in der Anisogamie die morphologische Unterscheidung von weiblichen und männlichen Strukturen schwierig oder unmöglich ist, werden sie mit Ziffern oder als Paarungstyp (englisch Mating type: MT) "MT⁺" und "MT⁻" bezeichnet. In vielen Algengruppen gibt es Spezies mit entweder isogamer, anisogamer oder oogamer sexueller Reproduktion, wobei die letzten beiden Mechanismen sich wahrscheinlich aus der basaleren isogamen Vermehrung entwickelt haben.

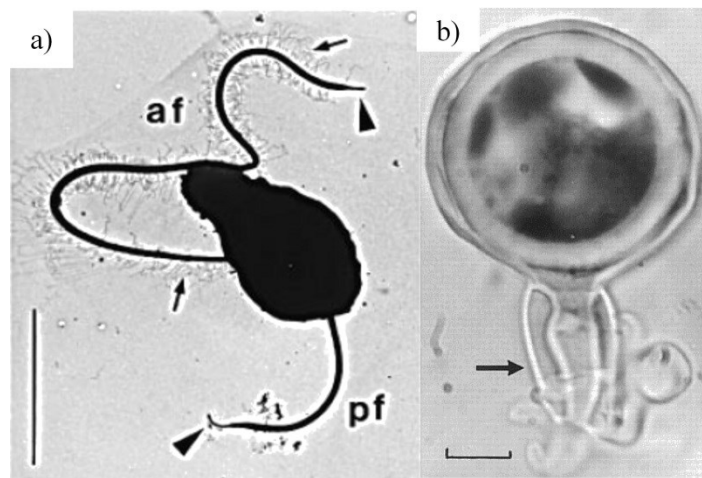
Die Gametangienbildung und Gametogenese wird durch Umweltsignale oder durch direkte Kommunikation der Paarungspartner induziert. Dies geschieht entweder durch direkten Kontakt oder mittels diffusibler chemischer Signale, welche unter Umständen gleichzeitig die Anlockung der männlichen Gameten vermitteln. Diese chemischen Signale, welche eine Auswirkung auf Individuen der gleichen Art haben, werden Pheromone (griechisch: pherein, [übertragen], hórmón [anregen]) (Karlson und Lüscher 1959) genannt. Während Hormone innerhalb eines Organismus wirken, werden Pheromone in die Umgebung sekretiert. Pheromone gibt es nicht nur in Algen, sondern auch in nahezu allen anderen eukaryotischen Lebewesen. In der Insektenwelt wirken Pheromone meist in sehr niedrigen Konzentrationen und haben verschiedenste Funktionen, wie die Übertragung der Informationen über Ressourcenvorkommen oder Gefahren. Zudem vermitteln sie soziale Interaktionen, indem sie Territorien markieren oder zur Orientierung eingesetzt werden (Karlson und Lüscher 1959). Jedoch ist die Kontrolle und Steuerung der sexuellen Reproduktion die wichtigste Funktion von Pheromonen in Insekten, Algen und vielen anderen Organismen. Die Pheromonchemie ist in Algen äußerst divers und umfasst polare, apolare, hoch- und niedrigmolekulare Moleküle (Pohnert und Boland 2002; Maier 1993; Maier und Müller 1986; Jaenicke 1982). Aufgrund dieser Vielfalt ist es hilfreich, wenn man die potenzielle Substanzklasse eines unerforschten Pheromons einschränken kann,

indem bekannte Pheromonstrukturen aus verwandten Organismen betrachtet werden.

In Diatomeen sind jedoch bisher keine Pheromone beschrieben wurden. Auf der Suche nach potenziellen Substanzklassen werden daher im Folgenden die Braunalgen und Oomyceten genauer beleuchtet. Diese lassen sich unter Betrachtung des rDNA-Stammbaums zusammen mit den Diatomeen in der phylogenetischen Gruppe der Heterokontophyta einordnen (Riisberg *et al.* 2009).

2.2. Bekannte Pheromonsysteme der Heterokontophyten

Die Heterokontophyta sind eine höchst diverse Gruppe, in der die ursprünglichen Gameten zwei verschieden geformte Flagellen besitzen. Davon ist eins mit kleinen Härchen besetzt, während das andere glatt ist (Riisberg *et al.* 2009) (Abbildung 3a).



Besonders interessant ist die Betrachtung der vielzelligen, nichtmineralisierten Braunalgen, in denen eine Vielzahl von Pheromonstrukturen bekannt ist. Braunalgen enthalten den Farbstoff Fucoxanthin, der die Braunfärbung der blattartigen Strukturen verursacht. Das erste Braunalgenpheromon wurde von Müller *et al.* aus *Ectocarpus siliculous* isoliert (Müller *et al.* 1971). Diese

Abbildung 3: Gameten und Gametangien in Heterokontophyten. a) Männlicher Gamet der Braunalge *Ectocarpus siliculous*. Sichtbar sind die zwei verschiedenen Flagellen: Das vordere Flagellum (af) besitzt kleine Härchen (Pfeile), das hintere Flagellum (pf) ist glatt. Größenbalken = 5 µm. Nachdruck und Adaption nach (Maier 1997). Copyright (1997) Taylor and Francis. b) Oogonium und Antheridium (Pfeil) des Oomycets *Phytophthora*. Größenbalken = 10 µm. Nachdruck und Adaption nach (Brasier *et al.* 1999). Copyright (1999) National Academy of Sciences, U.S.A.

heterothallische Spezies besitzt wie die meisten Braunalgen einen haplodiplontischen Lebenszyklus. Der diploide Sporophyt entsteht aus den Zygoten durch asexuelle Zellteilung.

Unter bestimmten Bedingungen werden durch Meiose Zoosporen produziert, welche sich durch asexuelle Teilung zum Gametophyten entwickeln. Die weiblichen und männlichen Gametophyten bilden mobile Gameten, welche zu Zygoten fusionieren (Coelho *et al.* 2012). Der erste Lockstoff, der männliche Gameten anzieht, wurde als Ectocarpin bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen stark apolaren, aus Fettsäuren hergeleiteten Kohlenwasserstoff (Müller *et al.* 1971). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Substanz durch thermische Umlagerung eines Vorläufermoleküls gebildet wird (Boland *et al.* 1995). Ectocarpin besitzt mit 10 mM eine schwache Aktivität, verglichen zum thermolabilen Pheromon Pre-Ectocarpin (5 pM, Abbildung 36, S.83) (Boland *et al.* 1995). Der Inaktivierungsprozess findet (mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten) komplett ohne Katalyse durch enzymatische Aktivität statt und ist ausschließlich temperaturkontrolliert. Eventuell verhindert diese spontane Deaktivierung eine Irreführung der Zellen bei alten und nicht mehr aktuellen Signalen, die neu produzierte Pheromongradienten überlagern würden. Ectocarpin wurde auch in verwandten Spezies gefunden und dient sogar in Vertretern anderer Gattungen (wie *Sphacelaria rigidula* und *Adenocystis utricularis*) (Müller *et al.* 1985; Müller und Gassmann 1980) als Lockstoff. Allerdings ist nicht bekannt, ob Ectocarpin oder der Vorläufer das native Pheromon in den letztgenannten Spezies ist. Die Erkennung und Fusion der Gameten wird wahrscheinlich durch membranassoziierte Lectin-Glykoprotein Komplexe vermittelt (Schmid 1993). Zusätzlich zu den Lockstoffen gibt es weitere Pheromone, welche die Freisetzung der Gameten aus den Gametangien induzieren. Beispielsweise die Freisetzung der Gameten in *Laminaria digitata* durch einen epoxidierten Kohlenwasserstoff, welcher Strukturähnlichkeiten zu Ectocarpin besitzt, synchronisiert (Maier und Müller 1982; Müller *et al.* 1979). In Braunalgen wurden noch zahlreiche weitere, volatile und lipophile C₈ und C₁₁ Kohlenwasserstoffpheromone mit verwandter Struktur isoliert, welche in verschiedenen Übersichtsartikeln dargestellt werden (Amsler und Fairhead 2006; Pohnert und Boland 2002).

Interessanterweise konnten Ectocarpin und andere Braunalgenpheromone auch in Diatomeen gefunden werden. Zur Biosynthese von Ectocarpin nutzen Braunalgen mehrfach ungesättigten C₂₀ Fettsäuren (Stratmann *et al.* 1992). Braunalgen und Diatomeen zeigen bemerkenswerte Ähnlichkeiten in den biosynthetischen Abläufen, da sie identische Fettsäuren als Substrate nutzen und die katalysierenden Lipoxygenasen die gleichen Positionsspezifitäten besitzen (Pohnert und Boland 2002; Rui und Boland 2010; Stratmann

et al. 1992). Die Funktion der Kohlenwasserstoffe in Diatomeen konnte allerdings bisher nicht mit sexueller Reproduktion, sondern mit chemischer Abwehr gegen Fraßfeinde wie Copepoden verknüpft werden (Hay *et al.* 1998; Pohnert und Boland 1996; Schnitzler *et al.* 2001).

Die einzig andere Gruppe innerhalb der Heterokontophyten, in der Pheromonstrukturen beschrieben wurden, stellen die Oomyceten dar. Dabei handelt es sich um diplontische, vielzellige Organismen, die ähnlich wie Pilze filamentös in strangartigen Strukturen wachsen, die den vegetativen Thallus aufbauen. Im Gegensatz zu Braunalgen und Diatomeen betreiben Oomyceten keine Photosynthese, sondern haben eine saprophytische oder pathogene Lebensweise. Die aus der sexuellen Reproduktion hervorgehende dickwandige Zygote, genannt Oospore, dient oftmals als Verweilstadium, um ungünstige Lebensbedingungen zu überstehen. In der heterothallischen Spezies *Achlya bixsexualis* produziert der weibliche Thallus das Steroidpheromon Antheridiol (Abbildung 36, S.83) (McMorris und Barksdale 1967; McMorris und Arunachalam 1975), welches Antheridien in dem männlichen Thallus induziert. Anschließend produziert der männliche Thallus ein ähnliches Steroidpheromon, das Oogoniol (Abbildung 36, S.83) (Barksdale und Lasure 1974; McMorris *et al.* 1975), welches wiederum Oogonien im weiblichen Thallus induziert. Die durch Meiose erzeugten Gameten verbleiben in den Oogonien und Antheridien. Nun bildet das Antheridium strangartige Ausläufer, die auf die Oogonien zuwachsen und mit ihnen fusionieren. Das Wachstum ist zielgerichtet und muss durch einen Pheromongradienten geleitet sein. Dabei ist es möglich, dass Antheridiol oder ein unbekanntes, drittes Pheromon, als Lockstoff dient.

Forschungen zur Pheromonchemie wurden ebenfalls in der Gattung *Phytophthora* durchgeführt, welche sowohl homothallische als auch heterothallische Spezies enthält (Savage *et al.* 1968; Ko 1988). In heterothallischen Arten ist jedes Individuum dazu in der Lage, Oogonien und Antheridien zu bilden, welche nach Verschmelzung eine sogenannte Oospore bilden. Allerdings werden zwei genetisch verschiedene Paarungstypen A1 und A2 für eine erfolgreiche Befruchtung und Oosporenbildung benötigt (Savage *et al.* 1968; Fry und Goodwin 1997) (Abbildung 3b). Das Pheromon $\alpha 1$ wird durch Paarungstyp A1 produziert und induziert Oosporen in A2. Die Struktur wurde als azyklisches Diterpen identifiziert (Qi 2005; Yajima *et al.* 2008). Das Pheromon $\alpha 2$, welches durch Paarungstyp A2 sekretiert wird und Oosporen in A1 induziert, ist ebenfalls ein acyclisches Diterpen und besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu $\alpha 1$ (Ojika *et al.* 2011) (Abbildung 36, S.83).

Da sich die Produktion von $\alpha 1$ dosisabhängig nach Zugabe von $\alpha 2$ erhöht, wird vermutet dass $\alpha 2$ direkt aus $\alpha 1$ gebildet wird. Die beschriebenen Pheromone wurden aus *P. nicotiana* isoliert, waren aber ebenso in der Lage, Oosporen in anderen *Phytophthora* Spezies zu induzieren (Qi 2005; Ojika *et al.* 2011). Pheromonstrukturen der Oomyceten wurden jedoch bisher nicht in Diatomeen gefunden. Ebenso lässt sich eine hohe strukturelle Diversität der Pheromone zwischen Braunalgen und Oomyceten beobachten. Rückschlüsse über potenzielle Substanzklassen lassen sich demnach nicht für die Diatomeenpheromone ziehen.

2.3. Bekannte Pheromonsysteme der Grünalgen

Braunalgen und Oomyceten verwenden hydrophobe Lockstoffe. Daher ist es möglich, dass in der verwandten Gruppe der Diatomeen die Pheromone ebenfalls apolar sind. Es muss deswegen betrachtet werden, ob generell apolare Pheromone im wässrigen Milieu von Algen eingesetzt werden. Diese Fragestellung soll unter Einbezug der Grünalgen untersucht werden. Diese stellen neben den Braunalgen die einzige Algengruppe dar, in der Pheromonstrukturen bisher bekannt sind. Grünalgen sind eine paraphyletische Gruppe, welche Vertreter aus den Taxa der Chlorophyta und Charophyta beinhaltet. In den Chlorophyta ist die sexuelle Reproduktion nur in einigen wenigen Spezies bekannt. Viele Vertreter sind mikroskopisch klein und besitzen einen haplontischen Lebenszyklus. Jedoch gibt es auch makroskopische Algen mit haplodiplontischer Lebensweise, wie etwa in verschiedenen Spezies innerhalb der Ulvophyceae. Die Pheromonchemie wurde am gründlichsten in den Volvocales untersucht, welche sowohl einzellige Spezies wie *Chlamydomonas reinhardtii* als auch koloniale und multizelluläre Arten wie *Volvox carterii* umfassen.

In Grünalgen dient Sex im Lebenszyklus oftmals zum Überleben ungünstiger Umweltbedingungen. In *Chlamydomonas reinhardtii* wird die Gametogenese durch Stickstoffmangel ausgelöst (Starr *et al.* 1995). Dabei wird die Synthese von sexspezifischen Glykoproteinen, genannt Agglutinine, auf den Flagellen induziert (Adair 1985; Coleman 2012; Musgrave und van den Ende 1987; Snell 1985). Kompatible Gameten können miteinander paaren, sobald ihre Flagellen zufällig in Kontakt kommen (Starr *et al.* 1995). Dies initiiert die Produktion eines Enzyms, welches das Abstoßen der Zellwand und die Verwicklung der Flagellen bewirkt. Anschließend fusionieren die

Gameten zu einer quadriflagellaren schwimmenden Zelle, die letztendlich eine immobile Zygote bildet (Abbildung 4).

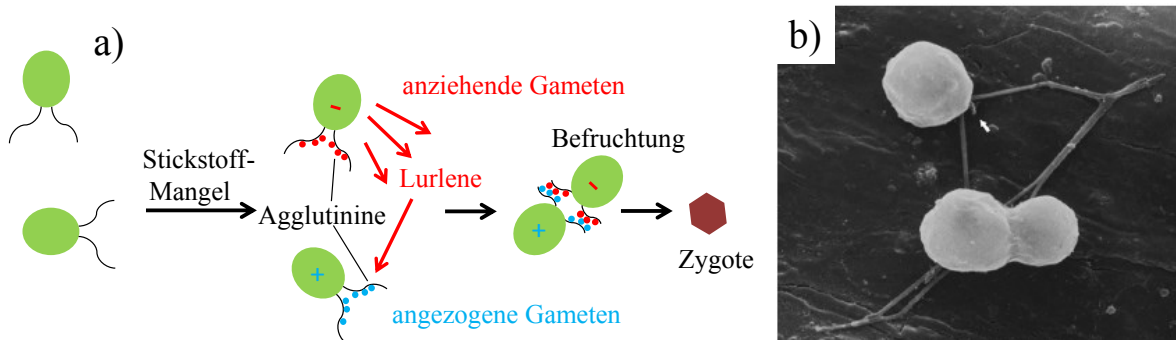


Abbildung 4: Paarung in *Chlamydomonas*. a) Schematische Darstellung der sexuellen Fortpflanzung in *Chlamydomonas*. Einige Spezies verwenden Lurle, um ihren Partner anzulocken. Durch Agglutinine können die Zellen aneinander haften. b) Drei *Chlamydomonas* Zellen, die über ihre Flagellen aneinander haften. Die unteren fusionieren zu einer Zygote. Nachdruck und Adaption des mikroskopischen Bildes nach (Goodenough *et al.* 2007). Copyright (2007) Elsevier.

Während die Gametenpaarung in *C. reinhardtii* auf zufälligen Begegnungen kompatibler Zellen beruht, konnte in anderen *Chlamydomonas* Spezies das Vorhandensein von Pheromonen nachgewiesen werden (Maier 1993; Tsubo 1961). Der plastochinon-ähnliche Lockstoff Lurlensäure (Abbildung 36, S. 83) der mobilen MT^- Gameten von *C. allensworthii* lockt die ebenfalls mobilen MT^+ Gameten bereits in einer Konzentration von 1 pM an (Jaenicke und Marner 1995; Starr *et al.* 1995; Mori und Takanashi 1996b). Andere Isolate der gleichen Spezies setzen als Lockstoff das strukturverwandte Lurlenol (Abbildung 36, S. 83) ein, welches ebenfalls in picomolaren Konzentrationen aktiv ist (Jaenicke und Starr 1996; Mori und Takanashi 1996a). Die Paarung zwischen Stämmen mit verschiedenen Lurlenen ist nicht möglich. Der phylogenetische Vergleich, basierend auf der Sequenzierung der "Internal Transcribed Spacer" 1 und 2 Regionen, bestätigt das Vorhandensein von mindestens zwei kryptischen Linien innerhalb der Spezies, was wiederum die Existenz der zwei verschiedenen Pheromonsysteme erklärt (Coleman *et al.* 2001).

Ein weiteres Beispiel für die Bildung von umweltresistenten Zygoten ist in *Volvox* verfügbar. So lebt die heterothallische Spezies *Volvox carteri f. nagariensis* in Teichen, welche im Sommer austrocknen. Diese Trockenheit können nur ruhende Zygoten, nicht aber die vegetativ aktiven *Volvox*-Kolonien überstehen (Hallmann *et al.* 1998).

Hitzeschock bewirkt die Produktion eines Sex-induzierenden Pheromons, welches die Sexualisierung und Gametogenese von sowohl männlichen als auch weiblichen Individuen steuert. In den Untergruppen *Merrillosphaera* und *Janetosphaera* konnte diese Substanz als Glykoprotein identifiziert werden, welches bereits bei einer Konzentration von 10^{-16} M aktiv ist (Starr 1974; Sumper *et al.* 1993). Bei *Volvox* handelt es sich nicht um einen echten mehrzelligen Organismus, sondern um eine Kolonie aus vielen Zellen, die durch eine hydroxyprolinreiche Extrazelluläre Matrix (Kirk *et al.* 1986; Sumper und Hallmann 1998) verbunden sind. Dabei gibt es somatische Zellen, welche für Photosynthese, Produktion der Matrix und für die Fortbewegung verantwortlich sind. Geschlechtliche und ungeschlechtliche Fortpflanzung wird durch die größeren Gonidien verwirklicht. Nach dem Hitzeschock wird das Sex-induzierende Protein zunächst von den somatischen Zellen produziert (Kirk und Kirk 1986) und induziert in den Gonidien die Produktion von Spermienpaketen (in männlichen Individuen) und Eizellen (in weiblichen Individuen). Nach der Freisetzung beginnen die Spermienpakete ebenfalls mit der Pheromonproduktion, welche im Wasser alle anderen Individuen der Population für den Paarungsprozess synchronisiert (Abbildung 5). Dabei ist das Pheromonsystem sehr sensitiv, da ein Spermium ausreicht, um die Sexualisierung von allen Individuen in einem Liter Wasser zu induzieren (Hallmann *et al.* 1998). Durch die Identifizierung des für das Pheromon kodierenden Gens (Tschochner *et al.* 1987) konnte die Struktur des 22 kDa Proteins mit 208 Aminosäuren aufgeklärt werden (Mages *et al.* 1988). Das Protein wurde durch heterologe Expression in Hefe und Säugetierzellen hergestellt und in Bioassays positiv getestet, wobei allerdings das native *Volvox* Pheromon in niedrigeren Konzentrationen wirksam war (Haas und Sumper 1991; Jaenicke *et al.* 1993). Verwandte Linien scheinen sich auf eine ähnliche Pheromonchemie zu verlassen, da das Pheromon aus *V. carteri f. weismannii* ebenso *V. carteri f. nagariensis* sexualisieren kann. Die Spezifität in der Induktion unterscheidet sich in den verschiedenen *V. carteri* Untergruppen. Einige Vertreter reagieren auf alle Pheromone von anderen Gruppen, wohingegen andere nur auf einige ansprechen bzw. komplett spezifisch nur auf das eigene Pheromon reagieren (Al-Hasani und Jaenicke 1992). Nach der Induktion durch das Sex-induzierende Pheromon werden in der Extrazellulären Matrix zusätzliche Proteine – sogenannte Peroporphine – produziert. Diese besitzen eine zum Pheromon ähnliche Struktur und könnten der Signalverstärkung dienen (Godl *et al.* 1995; Sumper *et al.* 1993). Zusätzlich beginnen die somatischen Zellen damit, sulfatierte Glykoproteine einzubauen, welche beim Transport

des positiv geladenen Pheromons zu den Gonidien eine Rolle spielen könnten (Wenzl und Sumper 1986). Außerdem induziert das Pheromon ein extrazelluläres Glykoprotein, welches fast ausschließlich aus Hydroxyprolin besteht (Ender *et al.* 1999). Das gleiche Protein wird nach Verwundung von *Volvox* gebildet. Somit lösen sowohl Verwundung und Pheromonrezeption die Expression der gleiche Gene aus, was eine molekulare Verbindung zwischen Umweltstress und sexueller Reproduktion vermuten lässt (Ishida 2007).

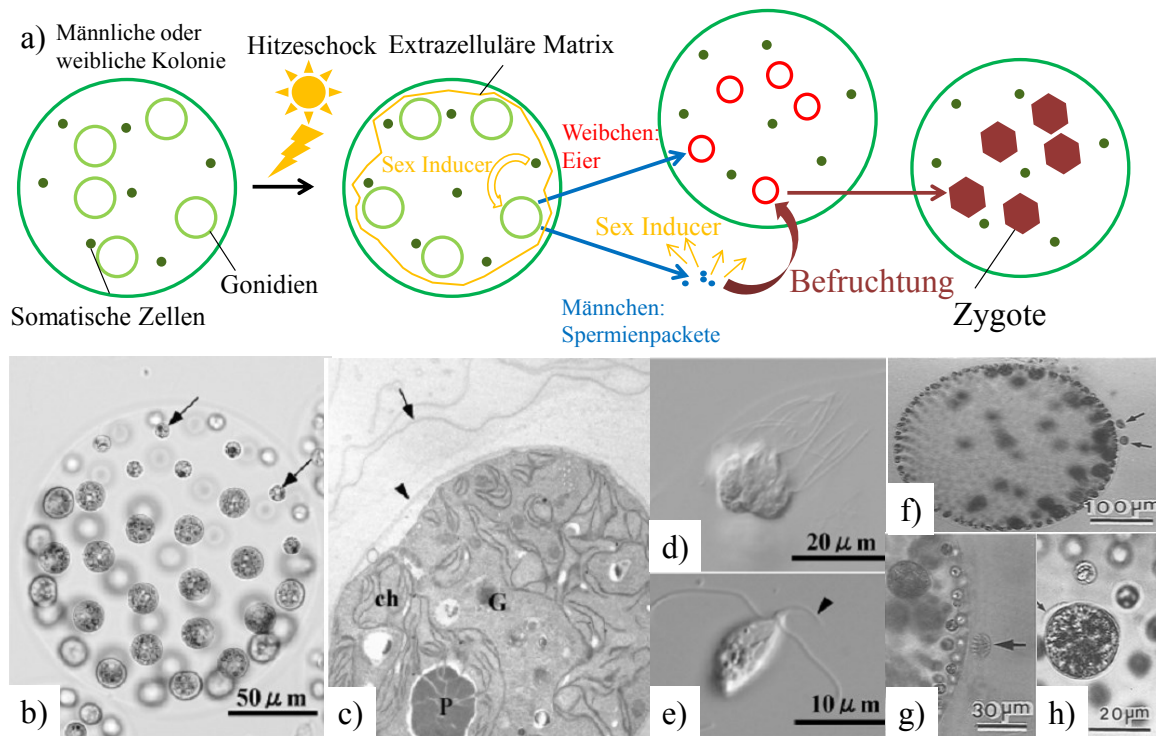


Abbildung 5: Sexuelle Reproduktion in *Volvox*. a) Schematische Darstellung der sexuellen Prozesse in *Volvox*. b) Asexuelle *Volvox*-Kolonie, Pfeile zeigen die somatischen Zellen. c) Pfeile zeigen die Abgrenzung der Kolonie durch die extrazelluläre Matrix, der Pfeilkopf eine somatische Zelle mit Chloroplast (ch), Golgi-Apparat (G) und Pyrenoid (P). d) Spermienpaket, e) Spermium, f-g) Spermienpaket lagert sich an eine weibliche Kolonie an, h) Zygote. Nachdruck und Adaption der mikroskopischen Bilder b-e nach (Nozaki *et al.* 2006), Copyright (2006) John Wiley & Sons; f-h nach (Nozaki 1996), Copyright (1996) Springer-Verlag.

Bei der Sexualisierung anderer *Volvox* Arten sind andere Signale involviert (Starr 1974). In *V. carvensis* bewirkt L-Glutaminsäure die Gametogenese, allerdings nur in hohen Konzentration von 68 nM (Starr 1980). Andere *Volvox* Arten reagieren nicht auf L-Glutaminsäure (Jaenicke 1982), welche daher ein eher „exotisches“ Signal darstellt, da in

allen anderen aus *Volvox* bekannten Pheromonsystemen Glykoproteine involviert sind (Coleman 2012). Während die Synchronisierung und die Induzierung der sexuellen Reproduktion in *Volvox* strikt durch Pheromone reguliert werden, basiert die Begegnung der Gameten auf zufälligen Bewegungen.

Ein weiterer Lockstoff wurde in der heterothallischen, vielzelligen Mikroalge *Oedogonium* beschrieben. Weibliche *Oedogonium*-Individuen besitzen Gameten enthaltende Oogonien, die durch Chemoattraktion die männlichen Gameten anlocken können (Hill *et al.* 1989; Machlis *et al.* 1974). Der Lockstoff ist ein polares Molekül mit einer molekularen Masse zwischen 500 und 1500 Da, jedoch ist keine weitere Strukturbeschreibung verfügbar.

In *Ulva mutabilis* spielen Signalmoleküle bei der Steuerung der sexuellen Reproduktion eine große Rolle, die innerhalb des Organismus wirken. In dieser Makroalge wird die Differenzierung von sogenannten Blattzellen zu Gametangien durch ein Glykoprotein verhindert. Dieser Sporulationsinhibitor dient damit zur Aufrechterhaltung des vegetativen Stadiums und zur Synchronisierung der Sporulation (Stratmann *et al.* 1996). Die Produktion dieses Faktors nimmt während der Thallus-Entwicklung allmählich bis zu der Inhibierungs-Grenzkonzentration von 10^{-14} M ab. Ein zweiter, niedrigmolekularer Sporulationsinhibitor kontrolliert die räumliche Verteilung der sich entwickelnden Gametangien (Stratmann *et al.* 1996; Wichard und Oertel 2010). Gleich nach der Induktion der Gametogenese wird ein weiterer Regulator, der Schwärminhibitor produziert. Diese hochaktive Substanz mit einer Masse von 292 Da verhindert die Gametenfreisetzung von *U. mutabilis* und *U. lactuca*. Damit könnte dieser Metabolit durch Regulation des Zellzyklus als zusätzlicher Synchronisierungsfaktor der sexuellen Reproduktion dienen (Wichard und Oertel 2010).

Innerhalb der Charophyta wurde sexuelle Reproduktion und Pheromonchemie intensiv im *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Komplex untersucht, welcher zu den Schmuckalgen gehört (Sekimoto *et al.* 2012). In dieser heterothallischen Mikroalge sekretieren Zellen des Paarungstyps MT^+ ein Glykoprotein-Pheromon (PR-IP), das die Freisetzung des Protoplasten in MT^- Gameten bewirkt. Vorher muss jedoch die Produktion des PR-IP Pheromons durch ein anderes Glykoprotein-Pheromon (PR-IP Inducer) induziert werden, welches durch MT^+ gebildet wird. Anschließend können die freigesetzten Protoplasten zu einer Zygote fusionieren (Sekimoto *et al.* 1990) (Abbildung 6). Die Aminosäuresequenz des 18kDa PR-IP Inducers (Nojiri *et al.* 1995) ähnelt einem Sexpheromon mit ähnlicher Funktion in *Closterium ehrenbergii* (Fukumoto *et al.* 2002;

Fukumoto *et al.* 1997). Das Pheromon von *C. ehrenbergii* wurde heterolog exprimiert und zeigte in beiden *Closterien*-Spezies Aktivität. Eventuell sind die Pheromone aus den zwei Arten funktionell gleichwertig (Tsuchikane 2005). Zusätzlich wurde in *C. ehrenbergii* ein weiteres, extrazelluläres 20 kDa Glykoprotein gefunden, welches als Lockstoff dient und die Zellbewegung von MT^+ vor der Paarung induziert (Fukumoto *et al.* 1998) (Abbildung 6). Das Protein wird verstärkt bei Stickstoffmangel gebildet. Die sexuelle Reproduktion hängt in *C. ehrenbergii*, wie bei vielen anderen Grünalgen, von Umweltbedingungen ab.

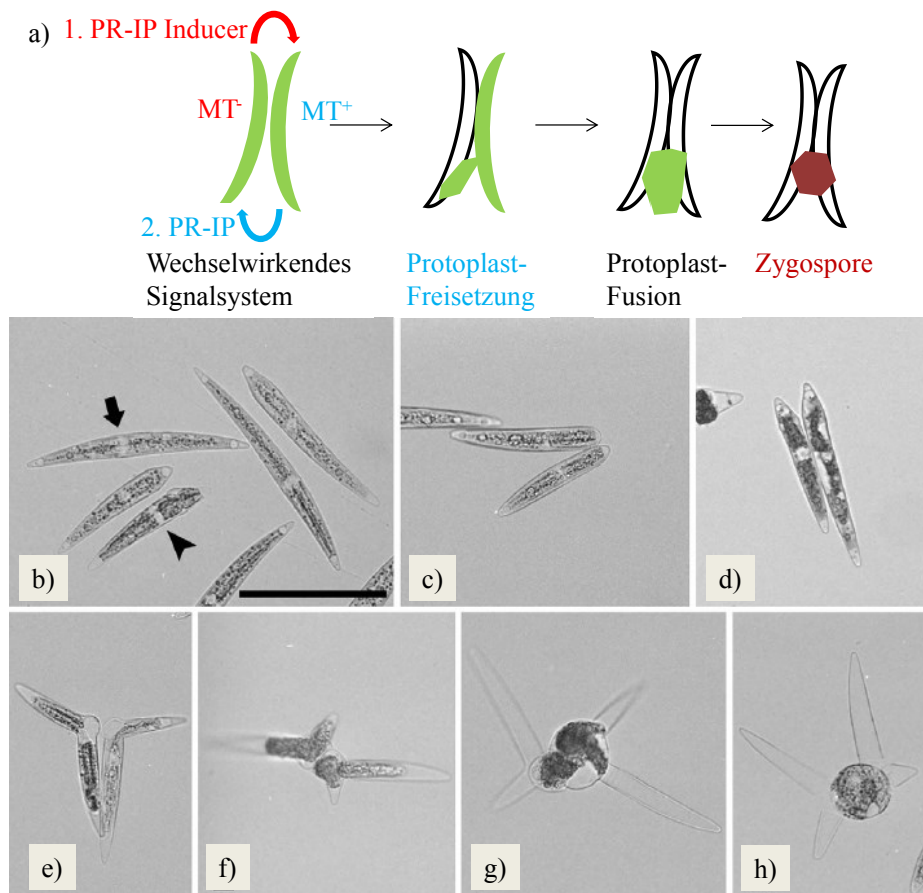


Abbildung 6: Sexuelle Reproduktion in *Closterium*. a) Schematische Darstellung des Pheromonssystems für die Induktion der Protoplast-Freisetzung (PR-IP) sowie des PR-IP Inducers, welche die Gametenentwicklung in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Komplex kontrollieren. b-h) Stadien der sexuellen Reproduktion in *Closterium*. b) Vegetative Zellen (Pfeile) und Gameten (Pfeilkopf). c) Durch sexuelle Zellteilung werden aus vegetativen Zellen Gameten gebildet. d) Paarung der Gameten, vermittelt durch einen Lockstoff in *C. ehrenbergii*. e-f) Protoplast Freisetzung von MT^+ und MT^- Gameten. g-h) Die Protoplasten fusionieren zu einer Zygote. Größenbalken: 100 µm. Nachdruck und Adaption der Bilder nach (Imaizumi *et al.* 2007). Copyright (2007) Elsevier.

2.4. Problematik der Strukturuntersuchung von Pheromonen

Die in den Grün- und Braunalgen vorgestellten Pheromonstrukturen stellen alle bekannten Algenpheromone dar. Das Wissen der Pheromonchemie ist somit auf sehr wenige Gruppen beschränkt. Zusätzliche Forschungsdaten über andere Algen Taxa mit teils großer ökonomischer und ökologischer Bedeutung sind nicht vorhanden. Ein Grund dafür ist oftmals der Mangel an detailliertem Wissen über den Lebenszyklus der Organismen. Ebenso ist es nicht immer möglich, die sexuellen Vorgänge unter Laborbedingungen zu kontrollieren, wodurch eine Pheromonextraktion nicht realisierbar ist. Auch in Gruppen, bei denen die komplexen Lebenszyklen und die sexuelle Reproduktion gut erforscht sind – wie in den oftmals toxischen Dinoflagellaten (Dinoflagellata), Goldbraunen Algen (Chrysophyceae) und Kalkalgen (Haptophyta) – sind keinerlei Pheromonstrukturen bekannt. Ein Ansatz für die Strukturaufklärung von Pheromonen stellt oftmals die Bioassay-geleitete Fraktionierung dar. Hierbei wird ein Bioassay genutzt, um das Vorhandensein der Zielsubstanz nachzuweisen. Nach verschiedensten Aufreinigungsschritten muss der Metabolit in ausreichend großen Mengen und Reinheit für eine Strukturaufklärung vorhanden sein. Die Bioassay-geleitete Fraktionierung erfordert meist eine sehr aufwendige Präparation einer großen Menge an Algenextrakt. Dies kann besonders herausfordernd für Substanzklassen wie die Divinylcyclopropane der Braunalgen sein, welche mit Halbwertszeiten von wenigen Minuten im wässrigen Medium sehr labil sind (Pohnert und Boland 2002). Ein weiteres Problem liegt in der Verfügbarkeit von zuverlässigen und zeitlich durchführbaren Bioassays. Einen Ansatz zur Überwindung dieses Problems stellen vergleichende metabolomische Analysen mittels Gas- oder Flüssigchromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie dar (Prince und Pohnert 2010). Hierbei kann beispielsweise das metabolische Profil einer pheromonproduzierenden Kultur mit der des anderen Paarungstyps, welcher das Pheromon nicht produziert, verglichen werden. Die Profile, die sich idealerweise nur durch die Existenz von einigen wenigen Signalmolekülen unterscheiden, können mittels automatisierter Datenauswertung analysiert und die Zielsubstanz identifiziert werden. Durch Metabolomik kann der Arbeitsaufwand teilweise drastisch reduziert werden, da von Beginn an gezielte Protokolle zur Aufreinigung der Metabolite zur Strukturaufklärung entwickelt werden können. Im Idealfall ist diese bereits durch Massenspektrometrie durchführbar, beispielsweise wenn Referenzspektren der Substanz in Datenbanken verfügbar sind. Allerdings besteht auch bei Metabolomik die Gefahr, dass die analytischen Methoden nicht sensitiv genug sind, um die

Pheromone zu identifizieren. Selbst nach erfolgreicher Strukturaufklärung muss die Identität durch die Synthese des Naturstoffs und einen Bioassay validiert werden, was sich besonders bei komplexen Strukturen als sehr schwierig herausstellen kann.

Eine weitere große Herausforderung bei der Identifizierung von Algenpheromonen ist, dass die Strukturdiversität enorm groß ist. Wie vorgestellt, umfasst sie sowohl kleine, unpolare Kohlenwasserstoffe als auch polare, hochmolekulare Glykoproteine. Somit ist weder im wässrigen Milieu bei Algen, noch innerhalb des Verwandtschaftsgrads der Heterokontophyten, eine Konsistenz in der Strukturklasse der eingesetzten Pheromone zu beobachten. Diese Diversität verhindert die Anwendung standardisierter Methoden, die auf die hinsichtlich der Pheromonchemie unerforschte Gruppe der Diatomeen angewandt werden können. Somit müssen Extraktions- und Messprotokolle neu entworfen werden und das Vorhandensein der Pheromone durch neue Bioassays nachgewiesen werden. Die Entwicklung eines Bioassays erfordert gute Kenntnisse über die Lebenszyklen und die sexuelle Reproduktion. Im Folgenden Abschnitt wird der aktuelle Forschungsstand und existierende Bioassays in Diatomeen vorgestellt.

2.5. Sexuelle Reproduktion in Diatomeen

Der diplontische Lebenszyklus der Diatomeen umfasst hauptsächlich asexuelle Reproduktion. Die Algen beginnen erst mit sexueller Reproduktion, wenn die Zellgröße aufgrund der asymmetrischen Zellteilung eine kritische, speziesspezifische sexuelle Größengrenze (SST) erreicht. Die beträgt etwa 30 – 40% der ursprünglichen Zellgröße (William und Lewis 1984). Die Zygote, welche aus der Fusion der Gameten entsteht, vergrößert sich und formt die Auxospore, welche einzigartige Zellwandelemente besitzt, um die charakteristische Zellform und Größe wiederherzustellen. Letztendlich bilden sich aus den Auxosporen Initialzellen mit der ursprünglichen Zellgröße (Abbildung 2, S. 4). Die vorwiegend planktisch lebenden Centrales sind oogam und besitzen oft ein homothallisches Reproduktionssystem. Sobald die Zellgröße unterhalb die SST fällt, differenzieren sich die Zellen zu Gametangien, die als Antwort auf bestimmte Umweltbedingungen Meiose durchführen und damit Eier oder eingeißelige Spermien produzieren (Mann 1993; Chepurnov *et al.* 2004; Kaczmarek *et al.* 2013) (Abbildung 7a-b). Oftmals dient Licht als auslösender Umweltfaktor, jedoch können auch biotische Interaktionen mit Bakterien dafür verantwortlich sein (Nagai und Imai 1998). Die sexuelle Reproduktion wird im Gegensatz zu anderen Mikroalgen, wie den Grünalgen, nur sehr

selten durch mangelnde Nährstoffe ausgelöst. Obwohl Oogamie im Allgemeinen mit Pheromonen assoziiert ist, um den Paarungserfolg zu erhöhen, konnten in diesem Zusammenhang bisher keinerlei Hinweise auf Signalstoffe gefunden werden.

Die meisten Pennales leben im Gegensatz zu den Centrales im Benthos. Die Diversität der Reproduktionsmechanismen ist äußerst hoch, da sie sowohl Isogamie als auch Anisogamie, die Oogamie ähnelt, aufweisen. Außerdem können die Organismen homothallisch und heterothallisch sein (Chepurnov und Mann 2004; Chepurnov *et al.* 2004; Kaczmarska *et al.* 2013; Quijano-Scheggia *et al.* 2009). Bei typischen sexuellen Vorgängen der Pennales wird die Bildung der Gametangien aus Zellen unterhalb der SST induziert, sobald sich zwei kompatible Paarungstypen paaren. Durch die anschließende Gametogenese werden zwei Isogameten pro Gametangium gebildet. Dieser Mechanismus wird auch als „normaler“ Typ der sexuellen Reproduktion bei den Pennales bezeichnet (Mann 1993). Im Gegensatz zu den Centrales besitzen die Gameten keine Flagellen und es bewegen sich meist nur die vegetativen Zellen. Diese besitzen dafür eine longitudinale Furche in der Zellwand, welche Raphe genannt wird und eine Gleitbewegung der Zellen auf dem Substratuntergrund ermöglicht. Pennales ohne Raphe werden araphid genannt und deren Mobilität wird durch andere Mechanismen (siehe S. 21) gewährt. Nach der Gametogenese stoßen die Gametangien ihre Zellwand ab und tauschen jeweils einen Gameten aus. Diese verschmelzen zu Zygoten (Mann 1993; Chepurnov *et al.* 2004) (Abbildung 7c-f).

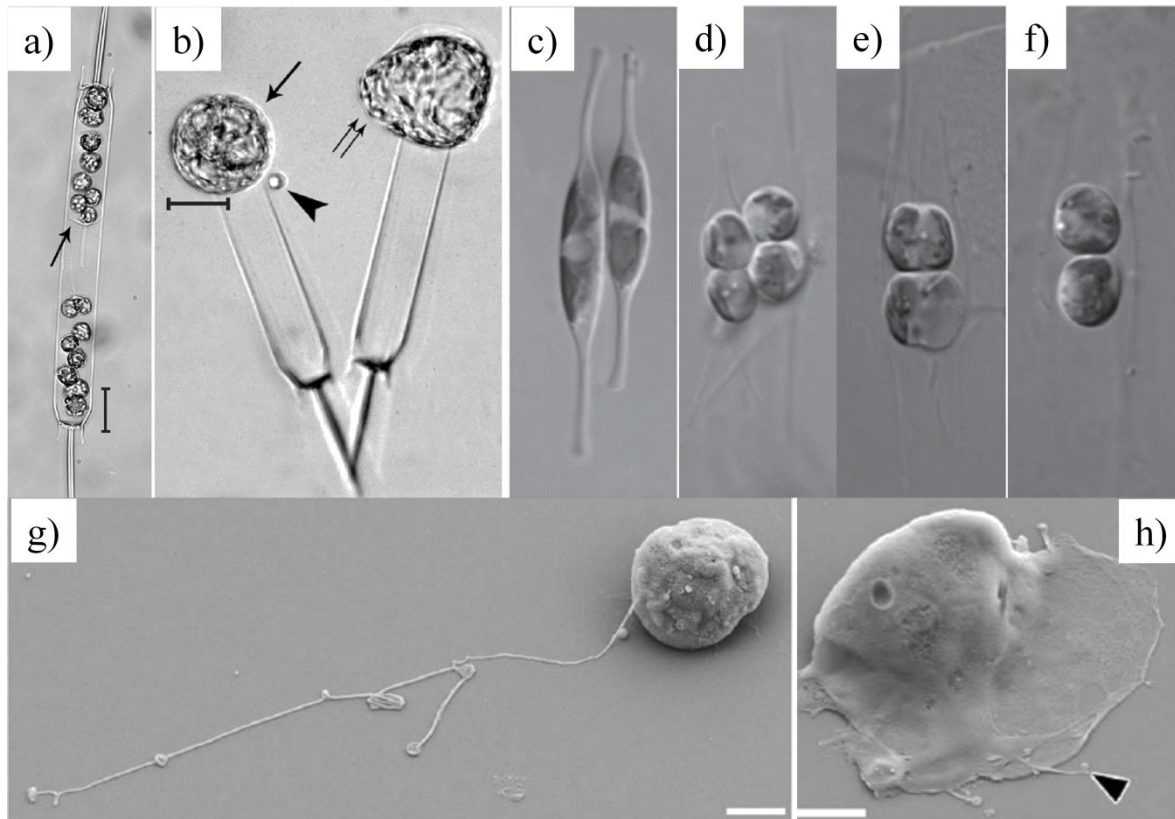


Abbildung 7: Gameten in Diatomeen. a – b) Centriscie *Ditylum brightwellii*, Größenbalken = 10 μm a) Antheridium mit rudimentärer Theke (Pfeil); b) Ei (Pfeil), Spermium (Pfeilspitze), und Auxospore (Doppelpfeil). Nachdruck und Adaption der Bilder nach (Koester *et al.* 2007). c – d) Raphide Pennales *Cylindrotheca closterium*, Bildung und Fusion von Gameten zu Zygoten. Nachdruck und Adaption der Bilder nach (Vanormelingen *et al.* 2013). Copyright (2007, 2013) Taylor and Francis. g – h) Araphide Pennales *Pseudostaurosira trainorii*, Größenbalken = 2 μm . g) Männliche Gameten mit verzweigten Threads, h) Amöboide/Pseudopodium ähnliche Strukturen der männlichen Gameten. Nachdruck und Adaption nach (Sato *et al.* 2011).

Paarungsvorgänge wurden in Diatomeen angesichts ihrer hohen Diversität nur in einer geringen Menge von Spezies beobachtet. Das liegt vor allem daran, dass Paarungen sehr selten vorkommen und die langen Perioden der asexuellen Teilung nur durch kurze Sexintervalle unterbrochen werden. So benötigen beispielsweise die sexuellen Vorgänge in *Pseudo-nitzschia* nur zwei bis vier Tage und kommen alle drei Jahre vor (Davidovich und Bates 1998). Ein weiterer Grund ist, dass einige Diatomeen (Beispiel: Gattung *Achnanthes*) die Fähigkeit besitzen, ihre Zellgröße durch asexuelle Vorgänge wie Apomixis und asexuelle Auxosporenbildung wiederherstellen können (Sabbe *et al.* 2004b).

Ebenso wurden sich vegetativ vergrößernde Zellen beschrieben, wie bei *Coscinodiscus wailesii* (Nagai *et al.* 1995). Bei den nach der Genomsequenzierung als Modellorganismen etablierten Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* (Centrales) (Armbrust 2004) und *Phaeodactylum tricornutum* (Pennales) (Bowler *et al.* 2008) fehlt die für Diatomeen typische asymmetrische Zellteilung und damit die sexuelle Reproduktion vollständig. Dies erleichtert die Langzeitkultivierung, was ein wichtiger Grund für die Etablierung dieser untypischen Vertreter der Diatomeen als Modellorganismus war (Kröger und Poulsen 2008).

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten jedoch bedeutende Fortschritte bei der Erforschung der Paarungssysteme der Diatomeen erzielt werden. So wurde beispielsweise bei der pennaten Diatomee *Achnanthes longipes* die nicht strikt heterothallische Paarung entdeckt, in der die sexuelle Reproduktion in einigen monoklonalen Kulturen möglich ist. Andere Klone der gleichen Spezies sind jedoch strikt heterothallisch, Paarung und Auxosporenbildung ist nur bei der Präsenz eines kompatiblen Paarungspartners möglich (Chepurnov und Mann 1997). Durch dieses System profitieren die Algen von den evolutionären Vorteilen, welche die sexuelle Reproduktion bietet. Gleichzeitig wird der Tod der Population verhindert, wenn kein geeigneter Paarungspartner vorhanden ist. Das typische Paarungsverhalten in raphiden Pennales kann nach der Mischung kompatibler Klone in der ökologisch bedeutenden Gattung *Pseudo-nitzschia* – darunter *P. multiseriata*, *P. pseudodelicatissima* (Davidovich und Bates 1998), *P. delicatissima* (Amato *et al.* 2005), und *P. multistriata* (D’Alelio *et al.* 2009) – beobachtet werden. Weitere Systeme wurden in *Seminavis robusta* (Chepurnov *et al.* 2002), *Amorpha proteus* (Sabbe *et al.* 2004a), *Cylindrotheca closterium* (Vanormelingen *et al.* 2013) und in der nicht strikt heterothallischen Diatomee *Haslea ostrearia* (Davidovich *et al.* 2009) beschrieben. Neben den genannten raphiden Pennales wurden auch verschiedene araphide Vertreter wie *Licmophora communis* (Chepurnov und Mann 2004) und *Tabularia tabulata* (Davidovich *et al.* 2012) untersucht. Im Vergleich zu den Pennales sind die Centrales schlechter erforscht. *Thalassiosira punctigera* pflanzt sich homothallisch fort, weist aber eine Inzuchtdepression auf, wenn keine verschiedenen Klone gemischt werden (Chepurnov *et al.* 2006). *Ditylum brightwellii* besitzt sowohl sexuelle als auch asexuelle Zellvergrößerungsmechanismen (Koester *et al.* 2007) und weitere Berichte über das Paarungssystem in den Centrales lassen sich in der Gattung *Actinocyclus* (Idei *et al.* 2012) finden. Die stetig steigende Zahl von erforschten sexuellen Systemen in verschiedensten

taxonomischen Klassen ermöglicht die Etablierung neuer Modellorganismen. Davon können die Biotechnologie und Forschung profitieren, da durch eine große Bandbreite von verfügbaren Arten diejenigen mit vorteilhaften Eigenschaften für den jeweiligen Einsatzzweck ausgewählt werden können (Chepurnov *et al.* 2008). Beobachtungen des Paarungsprozesses implizieren die Beteiligung von Pheromonen zur Partneranlockung (Mann und Chepurnov 2005). Der erste experimentelle Beweis, dass Pheromone bei der sexuellen Reproduktion von Diatomeen involviert sind, wurde jedoch erst kürzlich in der heterothallischen, araphiden Pennales *Pseudostaurosira trainorii* (Sato *et al.* 2011) erbracht. Die Gametogenese wird durch das Mischen von kompatiblen Klonen induziert. Dabei schwellen die Gameten an, drücken die Theken des Gametangiums auf und werden freigesetzt. Das Paarungssystem weist eine extreme Anisogamie auf, die männlichen Gameten können sich durch sogenannte "Threads" bewegen, welche als strangartige, aus Mikrotubuli bestehende Strukturen beschrieben sind (Sato *et al.* 2011). Diese werden zufällig in verschiedene Richtungen ausgeworfen. Durch Kontraktion der Threads werden die Zellen in die entsprechende Richtung gezogen. Sobald ein männlicher Gamet auf diese Weise zufällig in die Nähe eines weiblichen Gameten kommt, wird dieser amöboid. Durch pseudopodienähnliche Streckungen bewegt sich der männliche Gamet direkt auf den weiblichen Gameten bzw. das Gametangium (Abbildung 7g-h) zu. Die amöboide Gestalt hat im Gegensatz zu den runden Gameten keine feste Form, ebenso besitzen die pseudopodienähnlichen Verlängerungen eine dynamische Gestalt und sind dicker als die Threads. Beobachtungen des Paarungsvorganges zeigen deutlich, dass Pheromone in diesem Prozess eine Rolle spielen. Ein weibliches Sexpheromon, welches konstitutiv von vegetativen Zellen sekretiert wird, induziert die Meiose und somit die Sexualisierung von männlichen, vegetativen Zellen. Anschließend produzieren diese Zellen und/oder die daraus sich entwickelnden Gameten ein weiteres Pheromon, welches die Sexualisierung der weiblichen Zellen induziert. Da die amöboiden männlichen Gameten sich zielgerichtet zu den weiblichen bewegen, wird das Vorhandensein eines Lockstoffs und somit eines dritten Pheromons vermutet.

Ein weiterer Nachweis über die Existenz von Diatomeenpheromonen konnte in der heterothallischen Pennales *Seminavis robusta* erbracht werden. Diese benthische Spezies, die sich aktiv mittels einer Raphe auf dem Substratboden bewegen kann, besitzt den für Diatomeen typischen Lebenszyklus: Die Zellgröße, die bei 80 µm liegt, verringert sich durch asexuelle Teilung. Durch Paarung und sexuelle Auxosporenbildung wird diese

wiederhergestellt (Abbildung 2, S.4) (Chepurnov *et al.* 2002). Aus dem Kulturüberstand einer paarenden Kultur konnte durch einen Bioassay das Vorhandensein eines diffusiblen Lockstoffs nachgewiesen werden, welcher eingesetzt wird, um den Paarungspartner zu finden (Gillard 2009). Die Details zu diesen Experimenten werden in Kapitel 3.1 (S. 23) vorgestellt. Chepurnov (Chepurnov *et al.* 2008) beschreibt die Vorteile von *S. robusta* als Modellorganismus zur Erforschung der sexuellen Vermehrung, da sich diese erst durch das Mischen kompatibler Klone induzieren und damit gezielt synchronisieren und kontrollieren lässt. Die Zellpaarung, Gametogenese und Zygotenbildung ist äußerst effizient und überdurchschnittlich häufig zu beobachten. Die mikroskopischen Schritte fallen besonders leicht, da *S. robusta* auf Oberflächen von Petrischalen- und Multiwellplatten kultivierbar ist. Die Zellen können zudem leicht durch Schütteln oder durch einen Zellschaber vom Boden abgelöst und somit in neue Gefäße übertragen werden. Der Zellzyklus von *S. robusta* kann durch Dunkelheit synchronisiert werden. Dabei werden die Zellen in der postmitotischen G1-Phase des Zellzyklus arretiert, in der keine Synthese und Replikation der DNA und somit auch keine Zellteilung stattfindet. Die Zellen können erst nach Belichtung in die DNA-Synthesephase mit anschließender mitotischer Phase übergehen (Gillard *et al.* 2008). Synchronisierung und Licht erlauben eine effiziente Steuerung des Lebenszyklus und der sexuellen Prozesse. Da zusätzlich ein verlässlicher Bioassay zum Nachweis eines Lockstoffs zur Verfügung steht, ist *S. robusta* prädestiniert, um das erste Diatomeenpheromon zu erforschen.

3. Kapitel I: Identifizierung des ersten Diatomeen-Pheromons

3.1. Grundlagen und Aufgabenstellung

Für die Erforschung der Pheromonchemie von Diatomeen ist es unerlässlich, die sexuelle Reproduktion des Modellorganismus unter Laborbedingungen kontrollieren zu können. Dazu gehören Kenntnisse über die SST und das Vorhandensein von getrennten Paarungstypen. In der raphiden Pennales *Seminavis robusta* konnte die SST der Diatomeen durch das Mischen von kompatiblen Paarungspartnern mit verschiedenen Zellgrößen auf $51.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ bestimmt werden (Abbildung 8a) (Quelle: Persönliche Mitteilung von Valerie Devos, unveröffentlichte Dissertation, Universität Ghent). Nach Bestimmung der SST gelang es, den jeweiligen Paarungstyp der beteiligten Paarungspartner zu ermitteln (Gillard 2009). Dafür wurden paarungskompatible Klone in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Wenn Klon 1 (z.B. Zellgröße: $43 \mu\text{m}$, Abbildung 8b) im Überschuss oder in einem 50:50 Verhältnis mit Klon 2 (z.B. Zellgröße: $24 \mu\text{m}$, Abbildung 8b) gemischt wurde, bildeten die meisten Zellen Paare. Wenn jedoch Klon 2 im Überschuss vorlag, bildeten sich Cluster mit mehreren Zellen von Klon 2 um Klon 1. Dies zeigt, dass es sich bei Klon 1 um einen anziehenden Paarungstyp (MT^-) handelt, welcher durch einen mutmaßlichen Lockstoff Klon 2 (MT^+) anlockt (Abbildung 8b).

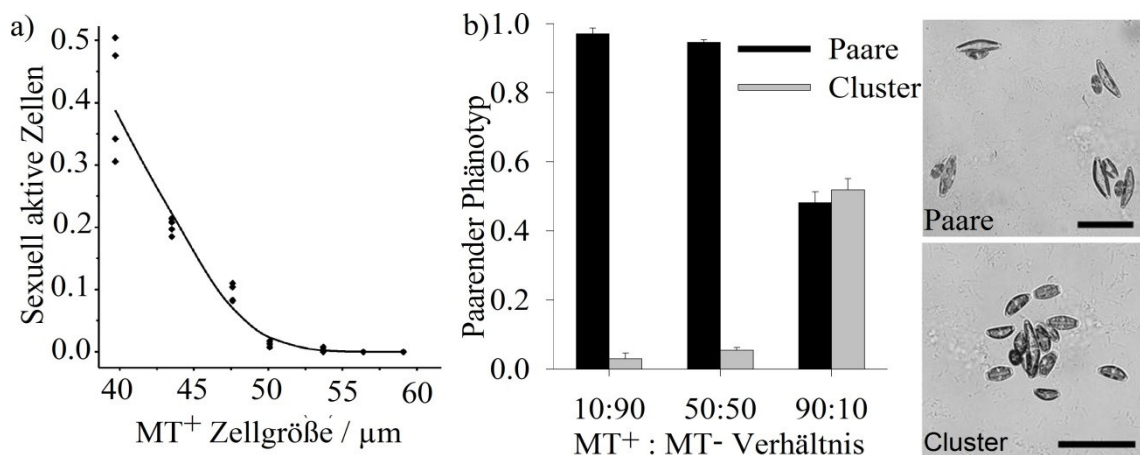


Abbildung 8: Paarungsverhalten in *S. robusta*. a) Bestimmung der SST durch das Mischen verschiedener Zellgrößen von Klon 1 (MT^-) mit dem kompatiblen Klon 2 (MT^+), dessen Zellgröße unterhalb der SST war. Quelle: Valerie Devos (unveröffentlichte Publikation, Universität Ghent). b) Bestimmung des Paarungstyps zweier kompatibler Klone durch das Mischen der Klone MT^+ und MT^- in verschiedenen Verhältnissen. Balken = $50 \mu\text{m}$. Abgeändert nach (Gillard 2009).

Mit Hilfe dieser voneinander getrennten Paarungspartner mit eindeutigem Paarungstyp war nun der experimentelle Nachweis eines Lockstoffs in einer paarenden Kultur möglich. In diesem von Gillard (Gillard, 2009) entwickelten Attraktionsbioassay erfolgt die Extraktion des Kulturüberstands einer paarenden Kultur mittels Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung einer hydrophil-lipophil ausgeglichenen (HLB) stationären Phase, die sowohl polare als auch apolare Substanzen bindet. Das HLB-Material wurde anschließend aus den Festphasenextraktionskartuschen entnommen und mit Wasser eine Suspension hergestellt. Das HLB-Material, welches aus kleinen Partikeln besteht, wurde nun zu MT^+ gegeben. Daraufhin begannen die Zellen, zu den Partikeln zu migrieren und sich an diese anzulagern. Der Lockstoff im Überstand der paarenden Kultur band demnach während der Extraktion an die HLB-Partikel, wurde aber auch teilweise wieder ins Wasser abgegeben und von MT^+ wahrgenommen. Die Anziehung von MT^+ wurde allerdings deutlich verstärkt, wenn MT^+ bereits vorher Kontakt mit Signalmolekülen der paarenden Kultur besaß. Dieser Effekt wird Konditionierung genannt. Die konditionierenden Substanzen verstärken vermutlich in MT^+ die Bildung eines Lockstoffrezeptors oder anderer Komponenten, die an der Pheromon-Signalübertragung beteiligt sind. Somit könnte die Konditionierung sowohl durch den Lockstoff als auch durch potenzielle andere Pheromone, die in einer paarenden Kultur vorhanden sind, erfolgen (Gillard 2009).

Durch diese Bioassays konnte die Pheromonwirkung in *S. robusta* nachgewiesen werden. Darüber hinaus gaben sie auch erste Hinweise darauf, dass die sexuelle Reproduktion durch ein komplexes Signalsystem gesteuert wird. Zusätzlich ließen sich hochmolekulare Glykoproteine als potenzielle Substanzklasse für den Lockstoff ausschließen, da diese nicht mittels HLB-SPE extrahierbar sind. Aufgrund dieser Forschungsergebnisse und der labortechnischen Vorteile (siehe 2.5, S.17), soll *S. robusta* in dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt werden, um die Pheromonchemie von Diatomeen zu untersuchen. Die Arbeit beschäftigt sich mit der Anzahl und Identität der im Paarungssystem von *S. robusta* beteiligten Pheromone. Dafür wurden zunächst die Kultivierungsbedingungen der Algen adaptiert und die Versuchsbedingungen des Attraktionsbioassays optimiert. Hier sollte die Einbindung von Metabolomik die traditionelle Bioassay-geleitete Fraktionierung (Prince und Pohnert 2010) unterstützen und die Prozedur zur Identifizierung des von MT^- eingesetzten Lockstoffs erleichtern. Letztendlich sollte so die Struktur des ersten Diatomeenpheromons aufgeklärt werden.

3.2. Kultivierung von *S. robusta*

Die für diese Arbeit verwendeten *S. robusta* Kulturen stammten von der Universität Ghent (Belgien), wo sie in gefiltertem und autoklaviertem, natürlichem Meerwasser von der belgischen Nordseeküste (Salinität 3.05%) kultiviert wurden. Dieses war angereichert mit Guillard's (F/2) Mariner Wasser Anreicherungslösung, die wichtige Nährstoffe, Spurenelemente und Vitamine enthält (Guillard 1975). Für die Versorgung der Diatomeen mit Silikat wurde außerdem 30 mg/L Na_2SiO_4 hinzugefügt. Da ein Import von belgischem Meerwasser auf Dauer zu aufwendig gewesen wäre, wurden zunächst potenzielle Ersatzmedien mit besserer lokaler Verfügbarkeit getestet. Dafür wurde das belgische Meerwasser entweder durch eine im Handel erhältliche Fertigsalzmischung („Instant Ocean“, Salinität 1.9%), oder durch natürliches Meerwasser von der deutschen Nordseeküste („Helgoland“, Salinität 2.9%) ersetzt. In beiden Fällen wurde die Anreicherungslösung und Silikat hinzugegeben. Als drittes Medium wurde künstliches Meerwasser („Seawater“, Salinität: 2.8%) mit Anreicherungslösung (Maier und Calenberg 1994) getestet, welches standardmäßig einen Silikatgehalt von 70 mg/L enthielt. Die Kultivierung der Algen erfolgte über 9 Tage, wobei die Wachstumsrate in allen Kulturmedien gleich hoch war. *S. robusta* erreichte die höchste Zelldichte im „Seawater“-Medium, was wahrscheinlich auf die höhere Silikatkonzentration zurückzuführen ist (Abbildung 9). Da das letztgenannte Medium günstig und schnell in großen Mengen herzustellen war, wurden alle weiteren Kultivierungsschritte in diesem Medium durchgeführt.

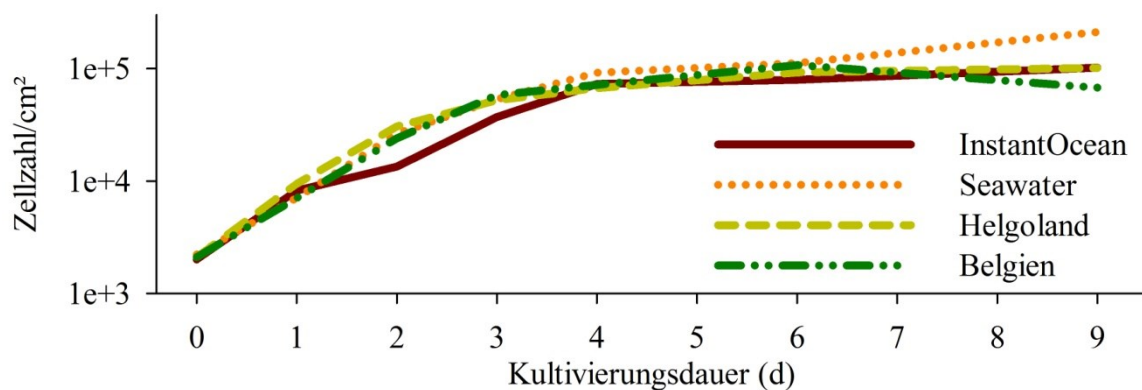


Abbildung 9: Kultivierung von *Seminavis robusta* in verschiedenen Medien. Die Kultivierung erfolgte bei 18°C in einem 12:12 h Licht:Dunkelheit Rhythmus mit kaltweißem Licht aus einer Fluoreszenzlampe bei etwa $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3. Das Paarungssystem von *S. robusta*

Nach der Adaption der Kultivierungsbedingungen von *S. robusta* musste der Attraktionsbioassay, welcher zum Nachweis der Aktivität des Lockstoffs genutzt wird, optimiert werden. Nach Gillard (Gillard 2009) erfolgte die Konditionierung von MT⁺ durch den Kulturüberstand einer paarenden Kultur (siehe 3.1, S. 23). Dafür wurden das Filtrat des Zellüberstandes der paarenden Kultur mittels HLB-SPE extrahiert und die beladenen HLB-Partikel in einen Filter mit einer semipermeablen Membran zu den Zellen gegeben. Die Membran erlaubt den Durchtritt kleiner Moleküle, nicht aber der Partikel. Wenn die HLB-Partikel gebundene Substanzen teilweise freisetzen, können diese Stoffe durch die Membran diffundieren und von den Algen wahrgenommen werden. Diese Konditionierung erfolgte für 48 h, bevor die Filter entfernt und die HLB-Partikel mit den gebundenen Pheromonen direkt zu den Zellen gegeben wurden. Anstelle der von Gillard genutzten HLB-Partikel wurde nun direkt der zellfreie Kulturüberstand der paarenden Kultur zur Konditionierung genutzt. Dies ist eine Zeit- und Kostenersparnis, da für die Konditionierung keine vorherige Festphasenextraktion durchgeführt werden musste und keine Filter mit semipermeabler Membran benötigt wurden. Diese Vereinfachung bewirkt zusätzlich eine Reduktion des Risikos, Kontaminationen einzubringen, welche die Funktionsweise des Attraktionsbioassays beeinträchtigen könnten. Ferner ist eine Konditionierungszeit von 48 h nicht notwendig, da sich die Zellen nach Mischung kompatibler Paarungstypen bereits nach acht Stunden beginnen zu paaren (Chepurnov *et al.* 2008) (siehe auch Abbildung 19, S.41). Aus diesem Grund wurden die mit dem Lockstoff beladenen HLB-Partikel für den Attraktionsbioassay bereits nach achtstündiger Konditionierungszeit zugegeben. Durch diese Maßnahmen konnte die Durchführung des Attraktionsbioassays beschleunigt, die Kontaminationen und Kosten gesenkt und damit die Wiederholbarkeit deutlich erhöht werden. Die mit dem Medium einer paarenden Kultur beladenen HLB-Partikel waren in der Lage, MT⁺ anzulocken, welcher zuvor mit dem zellfreien Medium einer paarenden Kultur konditioniert worden war. Ein Partikel wurde als „anziehend“ definiert, wenn mindestens sechs Zellen ihn berührten (Abbildung 10a). Der optimierte Attraktionsbioassay lieferte somit effizientere Ergebnisse verglichen mit Gillards Experimenten.

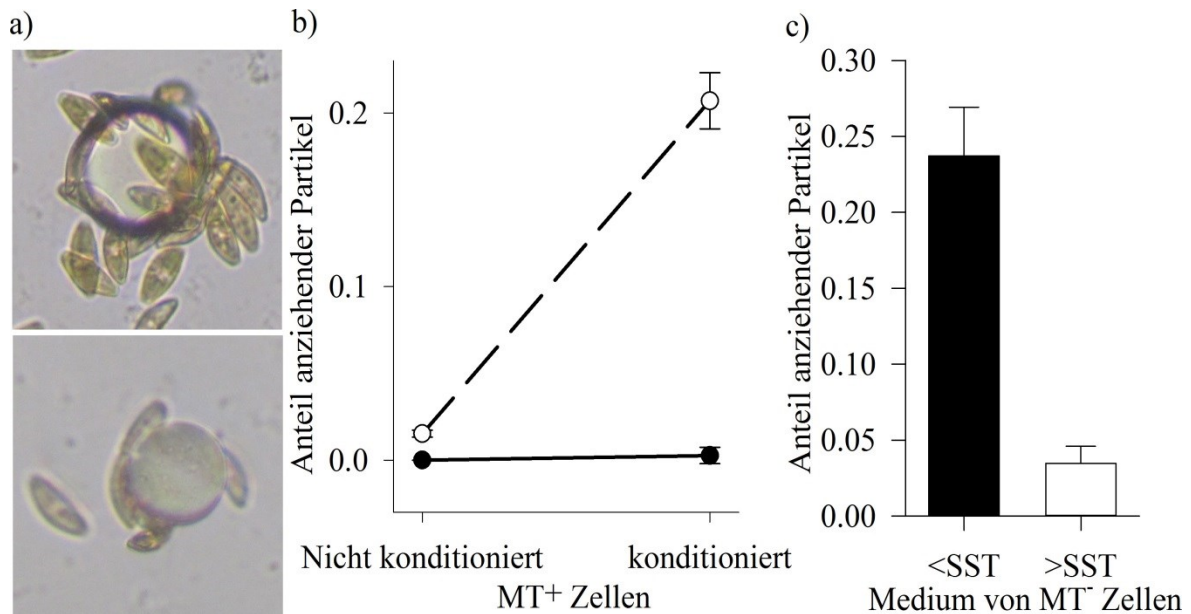


Abbildung 10: Biologischer Nachweis des Lockstoffs. a) Aktiver (oben) und inaktiver (unten) HLB-Partikel, die jeweils mit dem Medium einer paarenden Kultur oder einer alleinstehenden MT^- Kultur beladen wurden. b) Attraktionsfähigkeit von Partikeln (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 5$), die mit dem Extrakt des Kulturmediums von konditionierten (gestrichelter Linie) und nicht konditionierten (durchgezogene Linie) MT^- Kulturen beladen wurden auf nicht konditionierte und mit MT^- Medium konditionierte MT^+ Zellen. c) Attraktionsfähigkeit von HLB-Partikeln (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$), die mit Extrakt des Kulturmediums von konditionierten MT^- Zellen mit einer Zellgröße oberhalb und unterhalb der SST beladen wurden. Die Konditionierung erfolgte mit MT^+ -Medium (unterhalb der SST).

Letztendlich musste das HLB-SPE-Extrakt zur Detektion des Lockstoffs mit analytischen Methoden gemessen werden. Dabei ist es vorteilhaft, parallel die biologische Aktivität und die Metaboliten-Zusammensetzung des Extrakts zu untersuchen. Dafür wurden die an die HLB-Partikel gebundenen Substanzen mit Methanol eluiert. Ein Teil des Eluats wurde auf ein Aliquot frischer HLB-Partikel aufgetragen. Durch Verdampfen des Lösungsmittels binden die im Eluat vorhandenen Metabolite erneut an das HLB-Material, welches anschließend im Bioassay getestet werden kann. Der andere Teil des Eluats konnte direkt mittels analytischer Techniken vermessen werden. Nach Optimierung des Attraktionsbioassays wurde nun das Pheromonsystem genauer untersucht (Abbildung 10b). Dabei war besonders von Interesse, wie viele Pheromone am Paarungsprozess beteiligt

sind. Interessanterweise konnte MT^+ auch durch den Zellkulturüberstand einer alleinstehenden MT^- Kultur konditioniert werden (Abbildung 10b). MT^- muss demnach ein konditionierendes, Sex-induzierendes Pheromon produzieren. Jedoch war die HLB-Matrix, die mit dem Extrakt einer alleinstehenden MT^- Kultur beladen wurde, nicht in der Lage, konditionierte MT^+ Zellen anzulocken (Abbildung 10a,b). Demnach ist das Sex-induzierende MT^- Pheromon nicht identisch mit dem MT^- Lockstoff. Allerdings wurde der Lockstoff gebildet, wenn MT^- mit dem Filtrat einer alleinstehenden MT^+ Kultur für acht Stunden konditioniert wurde (Abbildung 10b). Eine Konditionierung von MT^+ bzw. MT^- war jedoch nur möglich, wenn diese mit dem Medium des Paarungspartners mit Zellgrößen unterhalb der SST erfolgte. Ebenso erfolgte die Produktion des Lockstoffs von MT^- nur dann, wenn sich dessen Zellgröße unterhalb der SST befand (Abbildung 10c). Daraus ergab sich folgender hypothetischer Ablauf während der sexuellen Fortpflanzung von *S. robusta*: Sobald die Größe beider Paarungstypen unterhalb die SST fällt, beginnen die Algen, Sex-induzierende, konditionierende Pheromone, zu sekretieren. Diese induzieren in dem jeweils anderen Partner die Bildung des Lockstoffs (in MT^-) bzw. des korrespondierenden Rezeptors oder andere am Paarungsablauf beteiligte Signalkomponenten (in MT^+) (Abbildung 37, S.88).

Die Sekretion des Lockstoffs durch MT^- konnte nun kontrolliert durch Konditionierung mit dem Filtrat von MT^+ induziert werden. Dies ermöglichte die Identifizierung des Lockstoffs mittels eines vergleichenden metabolomischen Ansatzes. Es wurde von einer starken Ähnlichkeit zwischen den extrazellulären metabolomischen Profilen einer konditionierten und einer nicht konditionierten MT^- Kultur ausgegangen. Die Unterschiede sollten sich vor allem aus dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit des Lockstoffs und gegebenenfalls der Sex-induzierenden Pheromone ergeben. Somit konnte die Analyse der Unterschiede von chromatographischen Profilen die Identifizierung des Lockstoffs ermöglichen. Es erfolgte Aufnahme des metabolomischen Profils von fünf Replikaten der Extrakte aus konditionierten und nicht konditionierten MT^- Kulturen, die parallel im Attraktionsbioassay getestet wurden (Abbildung 10b), mittels Umkehrphasen-Ultra-Hochdruckflüssigchromatographie / Massenspektrometrie (RP-UPLC/MS). Die Messungen ergaben komplexe Chromatogramme, die durch automatische Datenprozessierung ausgewertet wurden. Dafür wurden aus den Chromatogrammen mit der Software MarkerLynx m/z Retentionszeitpaare extrahiert. Mit den Paaren konnte in einer Hauptkomponentenanalyse die Ähnlichkeit der metabolomischen Profile der

verschiedenen Chromatogramme festgestellt werden. Die Hauptkomponentenanalyse der im positiven Elektrospray-Ionisierungs-(ESI)-Modus gemessenen Daten zeigte eine eindeutige Gruppierung der Replikate. Somit mussten deutliche Unterschiede zwischen den zwei Probentypen vorherrschen (Abbildung 11a).

Um Metabolite zu finden, die in den konditionierten MT^- Kulturen höher konzentriert sind als in den nicht konditionierten Kulturen, wurden die Intensitäten aller Signale in den Proben verglichen und der Grad der Hoch- bzw. Herabregulation bestimmt. Die stärkste Hochregulierung wies eine Substanz auf, die nach 1.06 min (ca. 16% Acetonitril / 0.1% Ameisensäure) eluierte. Sie besaß ein mutmaßliches kationisiertes Molekül $[M+H]^+$ mit $m/z = 195$ (Abbildung 11b). Daher wurde sie durch UPLC-Fraktionierung abgetrennt, auf die HLB-Matrix aufgetragen und ihre Aktivität im Attraktionsbioassay nachgewiesen. Durch das Überprüfen der Ionenspuren der UPLC/MS Messung konnte gezeigt werden, dass dieses Signal in den nicht konditionierten Kulturen fehlte. Somit war der Metabolit mit einer mutmaßlichen Masse von 194 Da ein guter Kandidat für den Lockstoff.

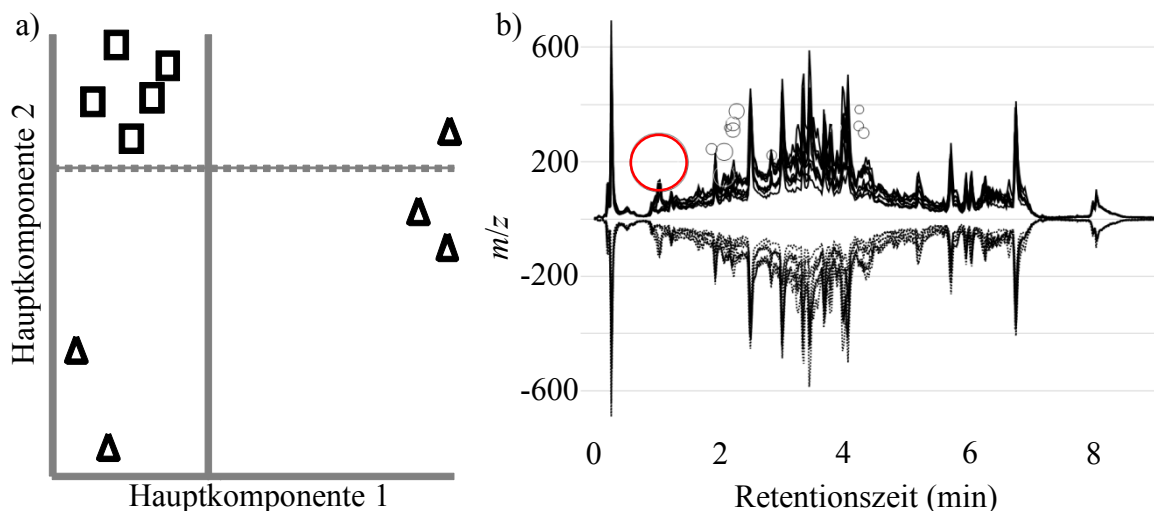


Abbildung 11: Metabolomischer Vergleich. a) Hauptkomponentenanalyse der im positiven ESI-Modus aufgenommenen RP-UPLC/MS Messungen der extrazellulären Extrakte aus konditionierten (Rechteck) und nicht konditionierten (Dreieck) MT^- Kulturen. b) Untersuchung von hoch- (positive Y-Achse) und herab- (negative Y-Achse) regulierten extrazellulären Metaboliten (dargestellt durch Kreise) in konditionierten MT^- Kulturen im Vergleich zu nicht konditionierten Kulturen. Je größer der Radius des Kreises, desto größer sind die Intensitätsunterschiede der Metaboliten in den zwei Probentypen. Die Y-Achse zeigt das m/z des Metaboliten, die X-Achse die dazugehörige Retentionszeit in den Chromatogrammen an. Der rot markierte Kreis zeigt das Signal mit $m/z = 195$.

3.4. Strukturaufklärung des Lockstoffs

Zur Strukturaufklärung wurde eine MS-basierte Analyse gewählt, da hier deutlich geringere Mengen an Substanz im Vergleich zu anderen Methoden, wie NMR, benötigt werden. Zudem sind Messungen ungereinigter Rohextrakte möglich. Durch kollisionsinduzierte Dissoziation in der vor dem UPLC/Time-of-Flight-(TOF)-Detektor vorhandenen Kollisionszelle konnte mit Argon als Kollisionsgas das kationisierte Molekül mit $m/z = 195$ fragmentiert und ein MS²-Spektrum aufgenommen werden. Es konnten jedoch auch bei hohen Kollisionsenergien (bis 100 eV) nur zwei weitere Fragmente (70.1, 98.1, Abbildung 12a) gemessen werden. Zudem ist die Auflösung der Masse nicht ausreichend, um eine Aussage über die Summenformel und Struktur zu treffen. Aufgrund umfangreicher vorhandener Datenbibliotheken für Elektronenstoß-Ionisierungs-(EI)-Spektren wurde Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie (GC/MS) als nächster Schritt für die Strukturaufklärung gewählt. Da der Lockstoffkandidat in der RP-LC bereits bei einem niedrigen Anteil organischen Lösungsmittels eluierte, kann von einer hohen Polarität dieses Metaboliten ausgegangen werden, was eine GC-Analytik ungeeignet erscheinen lässt. Da die Substanz jedoch auch über eine geringe Molekülgröße verfügt, wurde zunächst von möglichen Derivatisierungsschritten von funktionellen Gruppen abgesehen. Die gesammelte RP-UPLC-Fraktion, die den mutmaßlichen Lockstoff enthält, wurde direkt nach Aufnahme in Methanol mittels GC gekoppelt an hochauflösende TOF-MS vermessen. Dabei eluierte eine Substanz nach 12.35 min (235 °C), welche ein mutmaßliches Molekülion mit einem $m/z = 194.1056$ besaß. Die Molekülmasse der durch GC-EI-MS und LC gekoppelt an ESI-Tandem-Massenspektrometrie (MS²) vermessenen Substanzen stimmte überein. Zudem zeigten die Substanzen in beiden Modi ähnliche Fragmentierungsmuster. Dadurch war sichergestellt, dass es sich in beiden Fällen um die gleichen Moleküle handelt (Abbildung 12b). Der Abgleich des EI-Spektrums mit der Datenbank NIST/MS ergab Struktur **1** (Abbildung 12) als Strukturvorschlag, wobei die Massenspektren der Datenbank und des Analyten einen Match Faktor von 777 und einen Reversed Match Faktor von 783 aufwiesen. Allerdings ist die Molekülmasse von Struktur **1** um 56.0625 Da zu hoch. Das würde bedeuten, dass es sich bei dem Signal mit $m/z = 194.1056$ nicht um das Molekülion, sondern ein Fragment handelt. Dies widerspricht jedoch der ESI-MS Messung, welche das kationisierte Molekül $[M+H]^+$ mit $m/z = 195$ bestätigt. Allerdings besteht auch hier die Möglichkeit, dass Stoßaktivierung innerhalb der Ionenquelle zur Abspaltung der Ethylgruppen von Struktur **1** führt und so nur

ein Fragment (Struktur **2**, Abbildung 12) sichtbar ist. Daher wurde zusätzlich zu GC-EI-MS noch GC-CI-MS mit Methan als Reaktandgas durchgeführt, um die Molekülmasse herauszufinden. Hierbei konnten im Spektrum die Signale mit $m/z = 195$, 223 und 235 gefunden werden, welche den nach chemischer Ionisierung typischen Ionen $[M+H]^+$, $[M+C_2H_5]^+$ und $[M+C_3H_5]^+$ entsprechen (Abbildung 12c). Addukte, welche mit Struktur **1** (Summenformel: $C_{14}H_{22}N_2O_2$) korrespondieren, wurden nicht gefunden. Somit konnte die Masse 194.1056 als Molekülmasse des Lockstoff-Kandidaten festgelegt werden. Durch die hochaufgelöste Masse konnte eine elementare Zusammensetzung von $C_{10}H_{14}N_2O_2$ (Massengenauigkeit = 0.372 ppm) abgeleitet werden, was einem Unterschied von C_4H_8 gegenüber dem Bibliothekseintrag bedeutet. Das Entfernen von zwei Ethylgruppen von Struktur **1** unter gleichzeitiger Tautomerisierung zum Keton würde Struktur **2** (Abbildung 12) ergeben. Hierbei handelt es sich um das Dipeptid cyclo(Pro-Pro), welches durch die Zyklisierung der Aminosäure Prolin entsteht. Diese zu der Klasse der Diketopiperazine zugeordnete Substanz wird im Folgenden Diprolin genannt und als Strukturvorschlag für den Lockstoffkandidat angenommen.

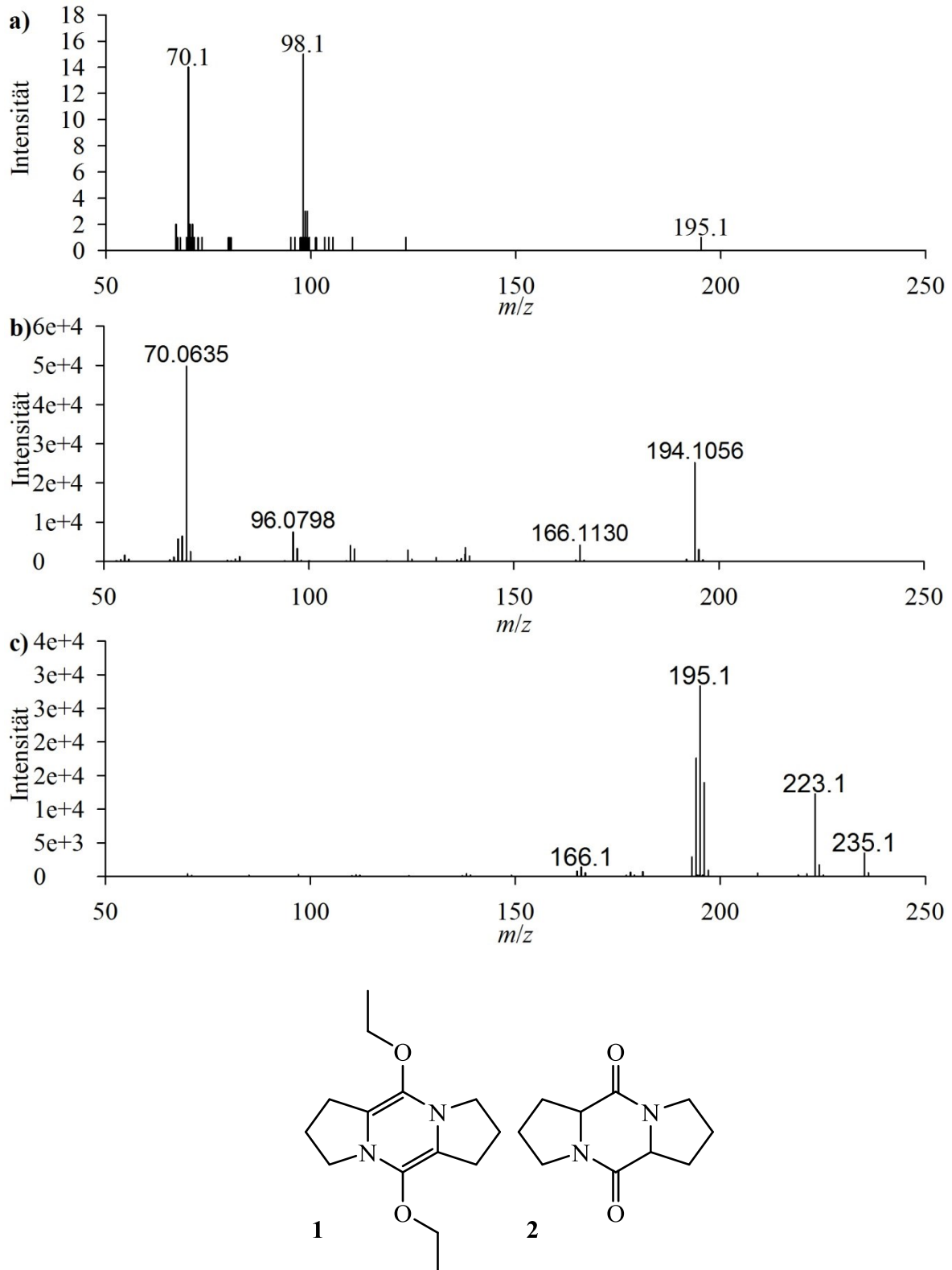


Abbildung 12: Strukturaufklärung des Lockstoff-Kandidaten. a) ESI-MS²-Spektrum. b) EI-Spektrum. c) CI-Spektrum. **1** Strukturvorschlag der NIST MS Search 2.0 Datenbank. **2** Struktur die aus den Massenspektren abgeleitet wird.

3.5. Synthese von Diprolin

Zur Strukturbestätigung erfolgte nun die chemische Synthese des Diprolins. Das Erhitzen von Prolin führt zur spontanen Kondensation der Carboxylgruppen mit der sekundären Aminogruppe und damit zur Zyklisierung (Nonappa *et al.* 2011). Diese einfache Synthesemethode erlaubte eine schnelle und effiziente Umsetzung von Prolin zu Diprolin (Abbildung 13b).

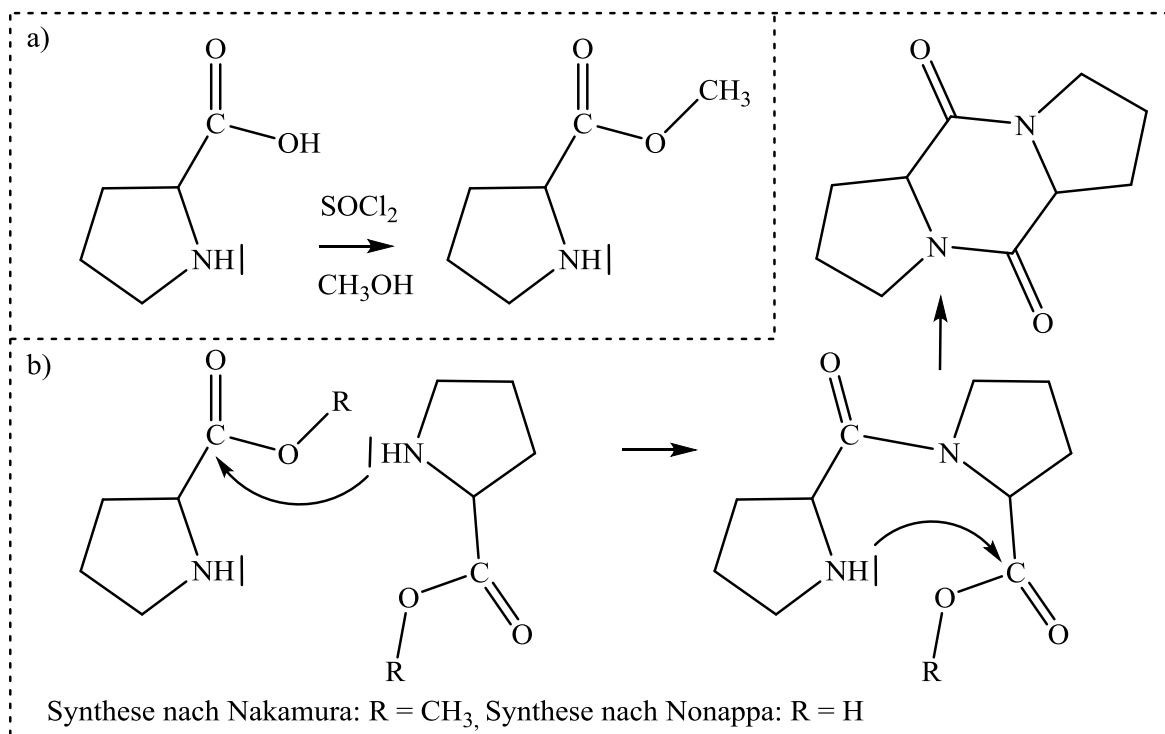


Abbildung 13: Synthese von Diprolin. a) Prolin wird über die Stufe des Säurechlorids mit Methanol zum Prolinmethylester verestert. b) Zyklisierung von Prolin durch Erhitzen (Synthese nach Nonappa) bzw. Zyklisierung des Prolinmethylesters (Synthese nach Nakamura) zum Diketopiperazin cyclo(Pro-Pro).

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Syntheseprodukts auf Kieselgel und präparativer HPLC wurde eine Koinjektion des synthetischen Standards und des Algenmetaboliten mittels RP-UPLC/MS und GC/TOF-MS durchgeführt. Hierbei koeluierten der Standard und der Lockstoff-Kandidat und beide Substanzen besaßen identische Massenspektren, was die Identität beider Substanzen bestätigt (Abbildung 14).

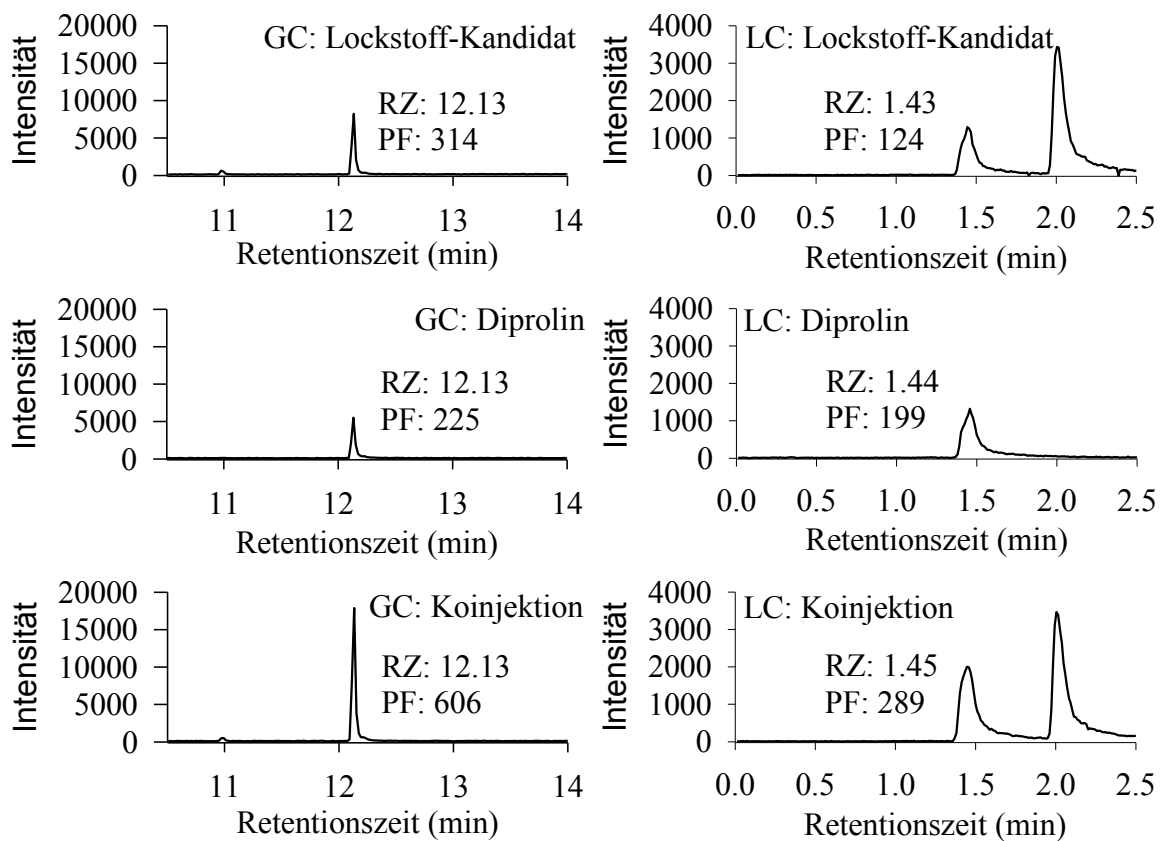


Abbildung 14: Koinjektion von Diprolin und dem Algenmetaboliten. Der aus den Algen isolierte Lockstoff-Kandidat und das synthetisierte Diprolin wurden in GC/TOF-MS und RP-UPLC/MS einzeln sowie zusammen injiziert und die Retentionszeit (RZ) und die Peakflächen (PF) verglichen. Die in der LC bei ca. 2 min eluierende Substanz stellt den internen Standard Coffein dar. Dargestellt sind die Ionenspuren $m/z = 70$ (GC, Fragment von Diprolin) und $m/z = 195$ (LC, kationisiertes Molekül von Diprolin/Coffein).

Zusätzlich wurde die Identität des Synthesestandards kernresonanzspektroskopisch (NMR) bestätigt (Anhang 1), wobei die chemischen Verschiebungen von ^1H und ^{13}C mit Literaturdaten (Jainta *et al.* 2008) übereinstimmen. Die Aufklärung der Stereochemie des Lockstoff-Kandidaten erfolgte mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie, da für diese Methode bereits Literaturdaten der Spektren existieren. Obwohl die meisten Lebewesen L-Aminosäuren für den Aufbau von Peptiden nutzen, konnten in Bakterien Diketopiperazine, welche aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, nachgewiesen werden (siehe 4.6, S. 61). Daher ist der Vergleich des Lockstoff-Kandidaten mit enantiomerenreinen, synthetischen Standards besonders wichtig, um eine eindeutige Aussage über die Stereochemie treffen zu können. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass Aminosäuren

unter Hitze nicht nur zyklisieren, sondern auch racemisieren können (Pätzold *et al.* 2006; Nonappa *et al.* 2011). Daher ist es möglich, dass das aus jeweils L-Prolin und D-Prolin synthetisierte cyclo(L-Pro-L-Pro) (L-Diprolin) und cyclo(D-Pro-Pro) (D-Diprolin) (Strukturen **3**, **4** in Abbildung 15) nicht enantiomerenrein sind.

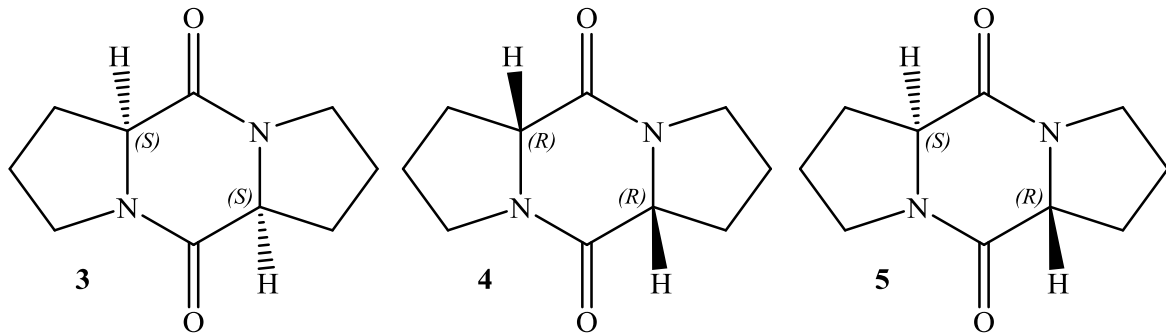


Abbildung 15: Mögliche Konfigurationen von Diprolin. **3** L-Diprolin / cyclo(L-Pro-L-Pro). **4** D-Diprolin / cyclo(D-Pro-D-Pro). **5** Diastereomer / cyclo(L-Pro-D-Pro).

Aus zwei Liter konditionierter MT⁻ Kulturen wurden etwa 100 µg des Lockstoff-Kandidaten gewonnen, indem der Zellüberstand mittels HLB-SPE extrahiert und das darin enthaltene Diprolin anschließend über präparative HPLC gereinigt wurde. Während das CD-Spektrum des Algen-Metaboliten den Literaturdaten von L-Diprolin entsprach (Carlson *et al.* 2006), waren die Spektren der synthetischen Standards weniger eindeutig und entsprachen nur tendenziell dem vorhergesagten Verlauf (Abbildung 16a). Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist, dass durch die Synthese beide Enantiomere zu fast gleichen Anteilen entstanden. Damit ist der Enantiomerenüberschuss von L-Diprolin bzw. D-Diprolin nur sehr gering, so dass sich die spiegelbildlichen Spektren teilweise überlagern und sich nahezu ausgleichen.

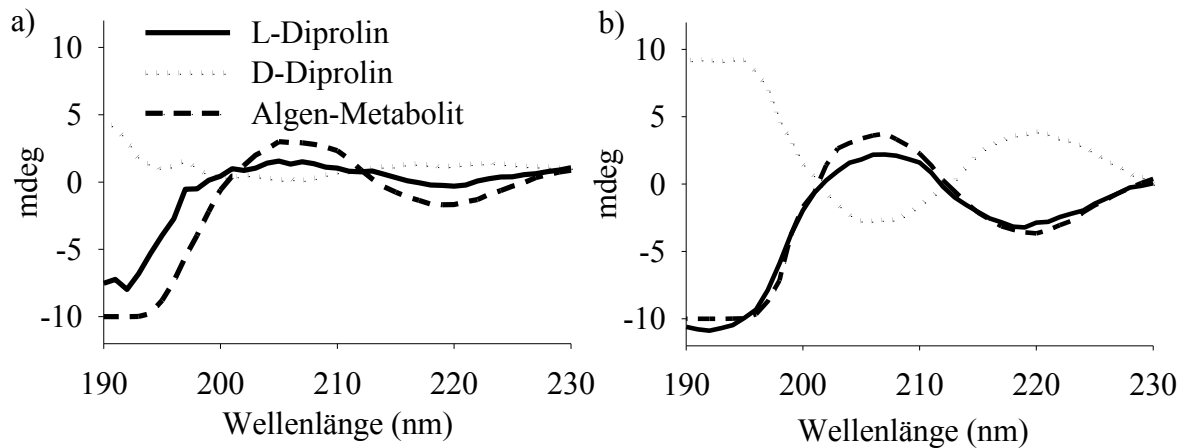


Abbildung 16: CD-Spektroskopie von synthetischem und natürlichem Diprolin. a) Die synthetischen Standards L-Diprolin und D-Diprolin wurden durch Erhitzen von Prolin hergestellt. b) Die Synthese der Standards erfolgte über Prolin-Methylester.

Um eine hitzebedingte Racemisierung von Prolin zu vermeiden, wurde eine Synthese unter mildereren Reaktionsbedingungen durchgeführt (Nakamura *et al.* 2006). Hierfür wurde zunächst der Prolinmethylester hergestellt, so dass anschließend durch einen nukleophilen Angriff des Stickstoffs die Verbindung zyklisieren konnte (Abbildung 13). Die Reinigung der Substanz erfolgte hier zunächst mittels Umkristallisation aus Ethylacetat. Bei dieser Methode war auffällig, dass bei der enantioselektiven Synthese von L-Diprolin und D-Diprolin auch deren Diastereomer entstand (Struktur **5**, Abbildung 15). Dies wurde durch das Auftreten von Doppelpeaks mit identischen Massenspektren mittels GC/MS festgestellt. In der Ausgangssubstanz Prolin waren die jeweiligen Enantiomere mit einem Anteil von <1% angegeben, sodass auch bei einer enantioselektiven Syntheseroute das Diprolin-Diastereomer in geringen Mengen entstehen kann. Allerdings war der Anteil des Diastereomers bei der D-Diprolin Synthese mit 29% und bei der L-Diprolin Synthese mit 10% deutlich höher als zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 17a-b). Wenn die Aufreinigung durch mehrfach aufeinanderfolgende Umkristallisierung vollzogen wurde, stieg auch der Anteil des Diastereomers an (Abbildung 17c)

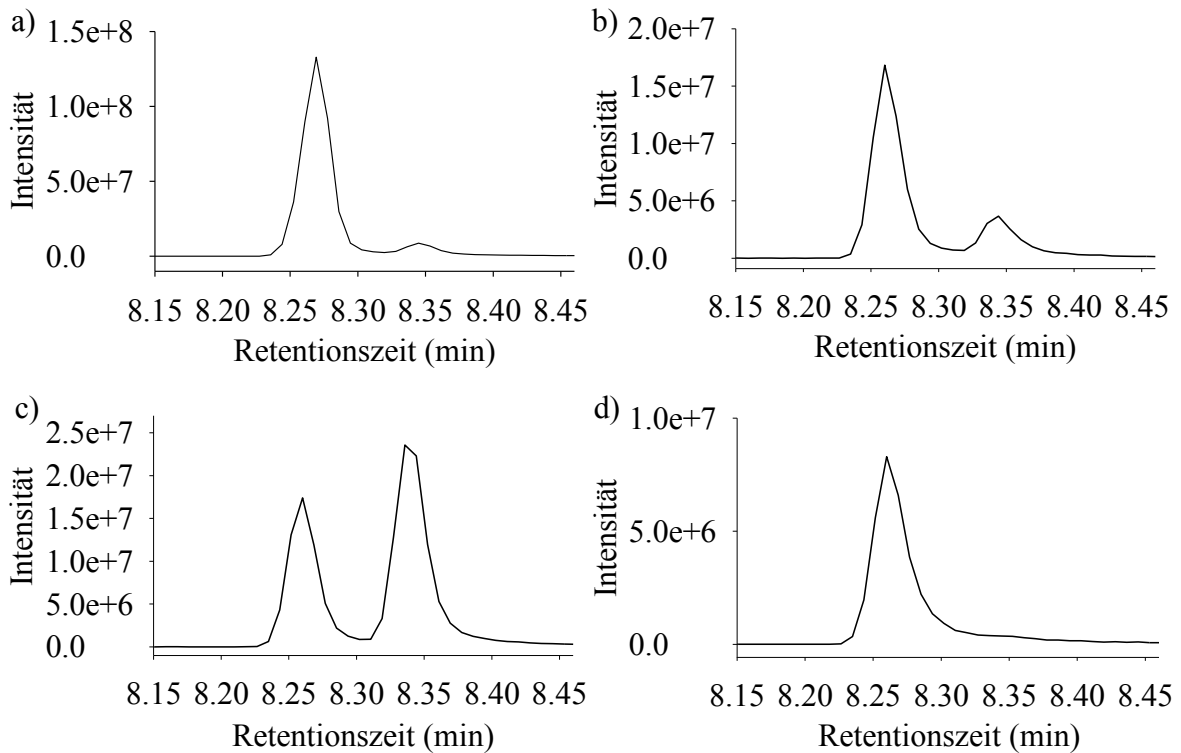


Abbildung 17: GC/MS Analyse des Diprolin-Syntheseprodukts. Die Retentionszeit des Diastereomers cyclo(L-Pro-D-Pro) beträgt 8.35 min, die von L- und D-Diprolin 8.25 min. a) L-Diprolin Synthese. b) D-Diprolin Synthese. c) D-Diprolin Synthese nach mehrmaliger Umkristallisation. d) L-Diprolin-Synthese nach Abtrennung des Diastereomers durch präparative HPLC. Die Diprolin Synthesen erfolgten nach Nakamura. Dargestellt ist die Ionenspur $m/z = 70$.

Die Ursache für den hohen Anteil des Diastereomers wurde nicht bestimmt. Möglicherweise ist die Zyklisierung von L-Prolin und D-Prolin mit der hier angewandten Synthesemethode thermodynamisch begünstigt. Alternativ könnte das Diastereomer bessere Kristallisationseigenschaften aufweisen und während des Prozesses der Umkristallisation bevorzugt angereichert werden. Die Abtrennung des unerwünschten Produktes erfolgte mittels präparativer HPLC (Abbildung 17d) und die beiden Enantiomere wurden erneut mittels CD-Spektroskopie vermessen. Diesmal entsprach das Spektrum von L-Diprolin dem des Lockstoff-Kandidaten, beide Substanzen sind damit identisch und *S. robusta* nutzt wahrscheinlich L-Prolin um L-Diprolin aufzubauen. Das CD-Spektrum des Enantiomers war erwartungsgemäß invertiert (Abbildung 16b), was zeigt, dass die synthetisierten Produkte entweder enantiomerenrein sind oder einen deutlichen Enantiomerenüberschuss des gewünschten Isomers aufweisen.

3.6. Diprolin als Diatomeenpheromon

L-Diprolin musste zwei wichtige Kriterien erfüllen, damit dessen Funktion als Pheromon in *S. robusta* bestätigt werden konnte. Zum einem musste die synthetische Substanz als Lockstoff fungieren und in der Lage sein, konditionierte MT^+ anzulocken. Allerdings können auch Nährstoffquellen Lockstoffe für *S. robusta* darstellen. Eine Chemoattraktion der Algen durch den anorganischen Nährstoff Silikat konnte bei Mangelercheinung bereits nachgewiesen werden (Gillard 2009). So könnte L-Diprolin von *S. robusta* zur Aminosäure Prolin hydrolysiert und im Stoffwechsel verwendet werden. Demnach ist es nicht ausreichend, zu beweisen, dass L-Diprolin ein Lockstoff ist. Es muss ebenfalls gezeigt werden, dass die Produktion dieser Substanz durch die Algen mit dem Paarungsablauf der Zellen gekoppelt ist.

Zum Test der Lockstoff-Funktion wurde das synthetische Diprolin im Attraktionsbioassay eingesetzt. Die HLB-Matrix wurde mit verschiedenen Stoffmengen beider synthetischer Enantiomere beladen und zu einer durch zellfreien MT^- Kulturüberstand konditionierten MT^+ Kultur gegeben. Als Kontrolle dienten HLB-Partikel, welche mit reinem Wasser behandelt wurden. Neben der Anzahl der anziehenden Partikel wurde auch die von ihnen ins Wasser abgegebene Konzentration des Diprolins ermittelt. Dafür wurde das Kulturmedium 15 min nach Zugabe der HLB-Matrix filtriert und durch HLB-SPE extrahiert. Das Eluat konnte mittels GC/MS vermessen werden, wobei für die Quantifizierung des Diprolins eine Kalibration über das Gesamtverfahren erstellt wurde. Coffein wurde als interner Standard gewählt, da es eine identische Molekülmasse und eine vergleichbare Polarität besitzt (Anhang 2). In allen folgenden Experimenten zur Diprolin Quantifizierung wurde Coffein als interner Standard stets vor der Filtration der Algen zugegeben um etwaige Verluste während des Filtrations- und Extraktionsvorgangs sowie Ungenauigkeiten der GC-Messung auszugleichen.

Es konnte bereits ab 2 pmol Diprolin/mg HLB-Partikel eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Anlockung von MT^+ Zellen beobachtet werden. Eine sichere Aussage über die von den HLB-Partikeln abgegebene Diprolinmenge lässt sich in diesem Konzentrationsbereich nicht treffen, da Diprolin in geringen Konzentrationen (ca. 10 nM) durch das Konditionierungsmedium von MT^- mit eingebracht wurde. Der Effekt der Diprolinproduktion in sehr geringen Mengen durch unkonditionierte MT^- Kulturen konnte in seltenen Fällen beobachtet werden. Ebenso konnte festgestellt werden, dass MT^+ in vereinzelt Fällen auch im unkonditionierten Zustand auf den Lockstoff reagieren kann

(Quelle: Persönliche Mitteilung von Christine Lembke, Friedrich-Schiller-Universität Jena). Die Notwendigkeit der Konditionierung hängt wahrscheinlich mit der Dichte und Größe der Zellen sowie mit der Verfügbarkeit der Nährstoffe zusammen. Dieser Umstand wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Mit zunehmender Diprolinkonzentration stieg auch die Anlockung der Zellen zu den Partikeln. Ab 200 nmol/mg HLB-Partikel, was etwa 715 nM Diprolin im Medium entspricht, sinkt die Aktivität drastisch. Hierbei handelt es sich um einen bekannten Effekt bei der Pheromonerkennung, bei dem zu hohe Konzentrationen des Pheromons die Rezeptoren sättigen und dadurch kein chemischer Gradient mehr wahrgenommen werden kann. Überraschenderweise wiesen beide synthetische Enantiomere keine signifikant verschiedene Aktivität auf (statistische Wahrscheinlichkeit nach Logit-Modell: $p = 0.249$, siehe Methoden, S. 106). Dies ist ungewöhnlich, da Pheromonrezeptoren häufig stereoselektiv sind. Dieser Umstand wird an anderer Stelle in dieser Arbeit untersucht und diskutiert (siehe 4, S. 49). Die im Wasser gefundenen Diprolinkonzentrationen konnten bis 20 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel sicher bestimmt werden. Bei den HLB-Partikeln mit niedrigerer Diprolinkonzentration (dargestellt für 0.2 – 2 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel in Abbildung 18) konnte die von den HLB-Partikeln abgegebene Diprolinmenge im Medium aus den bereits genannten Gründen nicht bestimmt werden. Um dennoch die Diprolinkonzentration im Medium abschätzen zu können, wurde mit den Datenpunkten 20 – 2000 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel eine lineare Regression erstellt (Anhang 3). Anschließend wurde die mögliche lokale aktive Diprolinmenge im unteren Konzentrationsbereich berechnet, welche 8 pM bei 0.002 Diprolin/mg HLB-Partikel betragen würde. Dies stellt eine realistische Pheromonaktivität dar, die mit der Aktivität der Lockstoffe aus der Klasse der Lurlene aus *C. allensworthii* vergleichbar ist (siehe 2.3, S. 10). Der hier ermittelte Wert ist nur eine grobe Schätzung. Die Bestimmung der tatsächlichen Grenzaktivität wird eine Optimierung des Bioassays erfordern, indem die Konditionierung von MT^+ durch diprolinfreies MT^- Medium durchgeführt wird.

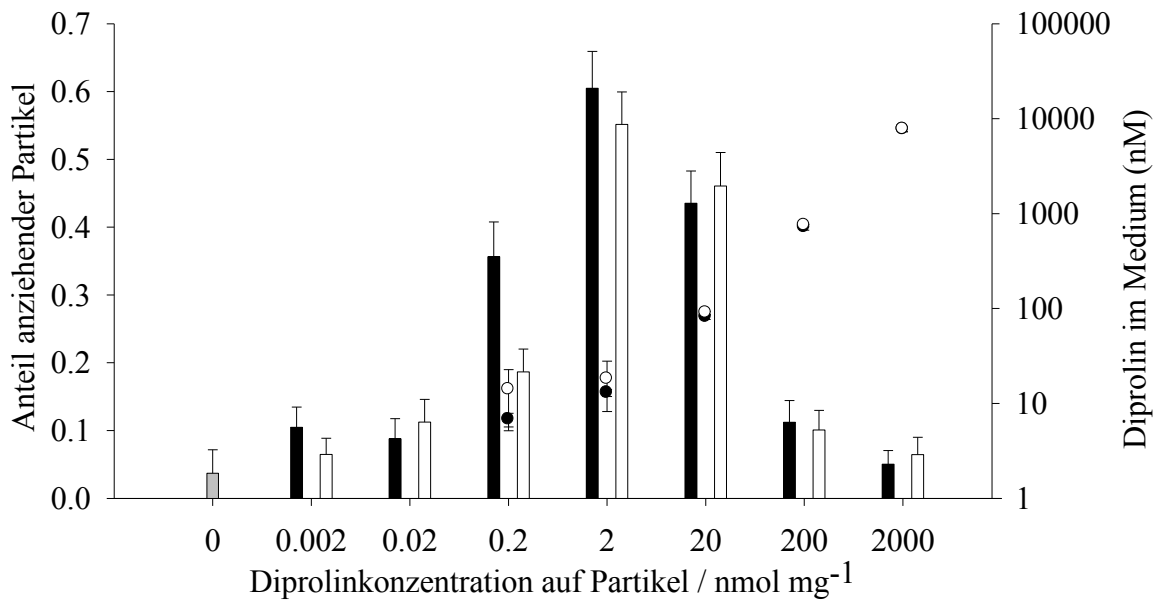


Abbildung 18: Synthetisches Diprolin im Attraktionsbioassay. Die HLB-Matrix wurde mit L-Diprolin (schwarz) und D-Diprolin (weiß) beladen, zu konditionierten MT⁺ Zellen gegeben und die Anzahl der anziehenden Partikel (Balken) gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Diprolin Konzentration im Medium (Kreise) gemessen (Mittelwert ± Standardfehler, n = 3).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Diprolin ein Lockstoff für *S. robusta* ist. Nun wurde untersucht, ob die Produktion von Diprolin an den Paarungsablauf der Zellen gekoppelt ist. Dafür wurden durch Dunkelheit in der G1-Phase synchronisierte Paarungstypen gemischt und die Anzahl der paarenden Zellen in den darauffolgenden Stunden bestimmt. Gleichzeitig erfolgte die Messung der Diprolinkonzentration im Medium, indem dieses durch HLB-SPE extrahiert und das Eluat mittels GC/MS analysiert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit Coffein als internem Standard und der bereits ermittelten Kalibrationskurve. Außerdem wurde ein Teil des Eluats auf ein Aliquot neuer HLB-Partikel gegeben und im Attraktionsbioassay getestet. In der Dunkelheit fanden sexuelle Prozesse selbst nach zwölfstündigem Kontakt beider Paarungspartner nicht statt und konnten erst durch Licht induziert werden. Die Paarung begann 4 h nach Einsetzen der Beleuchtung und setzte sich bis 11 h nach Beleuchtungsbeginn fort, danach ging die Anzahl der paarenden Algen zurück, da sie zu Zygoten fusionierten (Abbildung 19a).

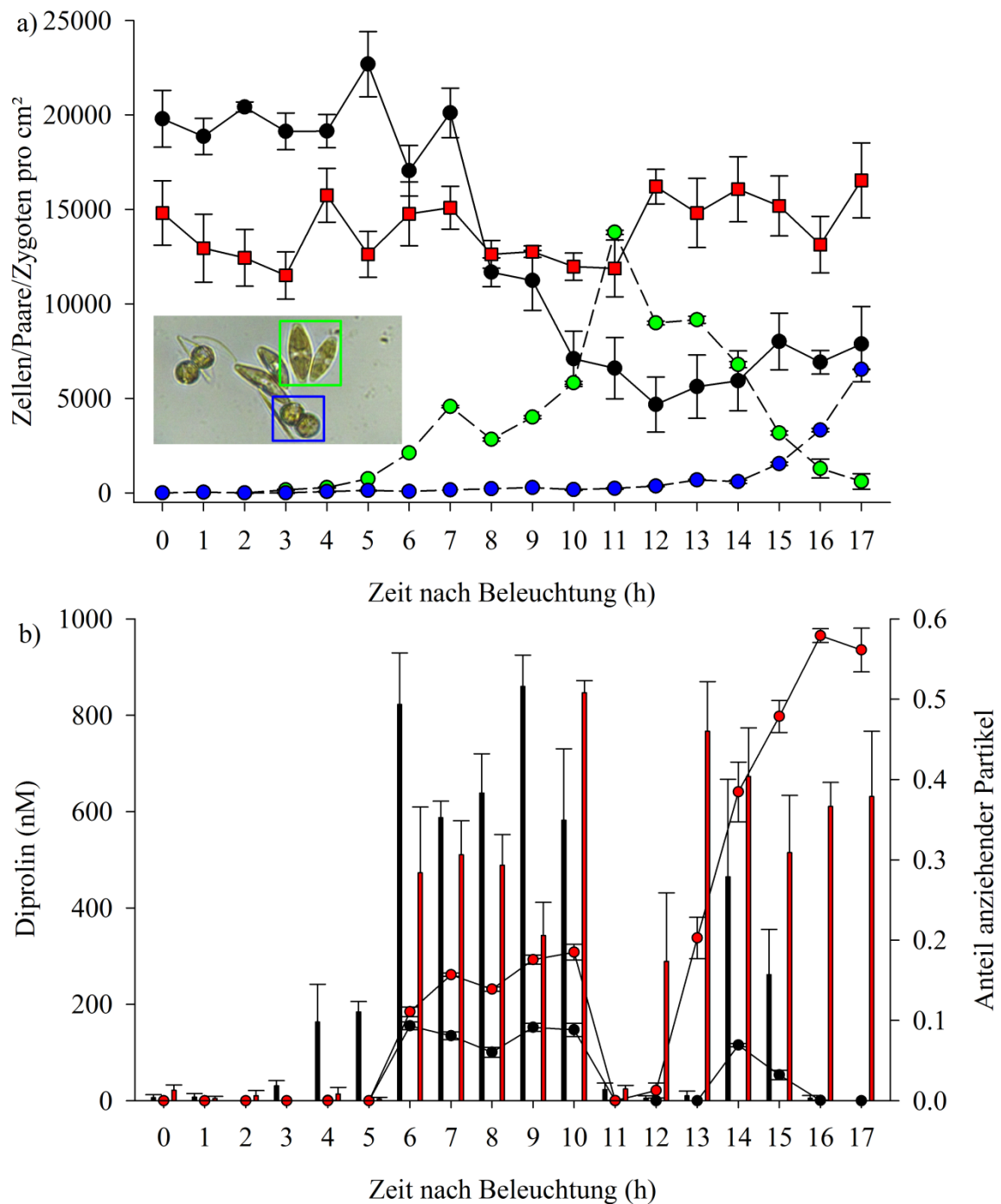


Abbildung 19: Kinetik der Pheromonbildung. a) Anzahl der vegetativen Zellen in konditionierten MT⁻ Kulturen (rot) sowie in Kulturen mit beiden Paarungstypen (schwarz), in denen es nach Beleuchtung zur Paarung der Zellen (grün, siehe mikroskopisches Bild) sowie Bildung von Zygoten (blau, siehe mikroskopisches Bild) kam. b) Diprolinkonzentration im Medium (Kreise) in den konditionierten (rot) und paarenden Kulturen (schwarz) sowie Aktivität des Mediums im Attraktionsbioassay (Balken). (Mittelwert ± Standardfehler, n = 3).

Diprolin konnte zwischen 6 – 10 h nach Beleuchtung nachgewiesen werden und dessen Produktion ist somit klar an den Ablauf der sexuellen Prozesse gekoppelt. Zudem war das Kulturmedium im Attraktionsbioassay immer nur dann aktiv, wenn Diprolin im Medium vorhanden war. Diprolin ist somit eindeutig der von MT^- eingesetzte Lockstoff (Abbildung 19b). Dessen detektierbare Konzentration lag zwischen 1.5 – 165 nM. Allerdings paarten sich die Algen bereits, als die Diprolinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze der Messmethode lag. Daher ist eine Aktivität des Diprolins im pikomolaren Bereich zu erwarten. Trotz Unsicherheiten in Bezug auf die lokalen Konzentrationen, welche die Pheromonquelle (HLB-Partikel oder Zelle) umgeben und der geschätzten Konzentrationen im niedrigen nanomolaren bzw. pikomolarem Bereich, liegen die beobachteten Aktivitäten des synthetischen (8 pM – 90 nM) und des natürlich produzierten Diprolins (<1.5 – 165 nM) in der gleichen Größenordnung. Parallel erfolgte das Experiment mit konditionierten MT^- Kulturen, denen nur das zellfreie MT^+ Filtrat zugefügt wurde. Die Anzahl der vegetativen Zellen blieb nach Belichtung konstant (Abbildung 19a). Nicht konditionierte Zellen teilen sich innerhalb von 8 h nach Beleuchtung (Abbildung 33, S. 76). Somit muss die Konditionierung eine Arretierung des Zellzyklus der MT^- Zellen in der G1-Phase bewirken. Dieser Umstand wird an anderer Stelle in dieser Arbeit untersucht und diskutiert (siehe 5.5, S. 75). Der Verlauf der Pheromonproduktion der konditionierten MT^- Zellen entsprach dem einer paarenden Kultur. In beiden Fällen wird das Pheromon nach sechsständiger Beleuchtung gebildet. Nach zehn Stunden fällt jedoch die Diprolinkonzentration im Medium ab (Abbildung 19b), was auf einen Abbau der Substanz durch die Zellen rückschließen lässt. In der paarenden Kultur kann die Verringerung der Konzentration mit der Aufnahme und Metabolisierung des Pheromons durch die MT^+ Zellen begründet werden. Allerdings muss auch MT^- bei dem Prozess des Diprolinabbaus eine Rolle spielen. Da Diprolin von MT^+ während des Paarungsprozesses dauerhaft aufgenommen wurde, kann die spontane Abnahme der Konzentration nach zehn Stunden nur mit einem zellzyklusbedingten Stopp der Diprolinproduktion in MT^- begründet werden. Der Pheromonabbau war zudem in der konditionierten MT^- Kultur ohne MT^+ ebenso zu beobachten. Der biologische Sinn würde sich daraus erschließen, dass ein stetiger Pheromonabbau dabei hilft, gealterte Signale zu entfernen, die mit neu aufgebauten Pheromongradienten interferieren und damit den Paarungserfolg verringern würden. Die Diprolinkonzentration im Medium stieg sowohl in der paarenden als auch in der konditionierten Kultur nach 13 – 14 h Belichtung wieder an. Dies kann durch die

unnatürliche, dauerhafte Beleuchtung begründet werden, welche in den übrig gebliebenen vegetativen Zellen eine erneute Pheromonproduktion induziert. Da in der konditionierten Kultur noch deutlich mehr MT^- Zellen zu Verfügung stehen, fällt diese stärker aus als in der paarenden Kultur. Der Konzentrationsbereich von Diprolin in der konditionierten Kultur lag zwischen 21 – 965 nM. Erwartungsgemäß war auch hier das Algenfiltrat nur dann im Attraktionsbioassay aktiv, wenn Diprolin vorhanden war.

3.7. Diprolinabbau

Da es sich bei den eingesetzten *S. robusta* Stämmen nicht um axenische Kulturen handelte, kann eine Beteiligung von Bakterien am Abbau des Pheromons nicht ausgeschlossen werden. Diese Untersuchungen erfolgten mit Julia Scharf in der von mir angeleiteten Diplomarbeit zum Thema des Diprolinabbaus (Scharf 2013). Dafür wurden die mit *S. robusta* assoziierten planktonischen Bakterien isoliert, 50 nM synthetisches L-Diprolin zugegeben und dessen Konzentration nach acht Stunden bestimmt. Als Kontrolle diente ein organismenfreier Ansatz mit sterilem Kulturmedium und die nicht-axenische MT^+ Kultur aus den vorangegangenen Experimenten. Im Vergleich zum sterilen Medium wurde in beiden Fällen das Diprolin abgebaut und ein Unterschied zwischen der Algen- und Bakterienkultur konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 20a).

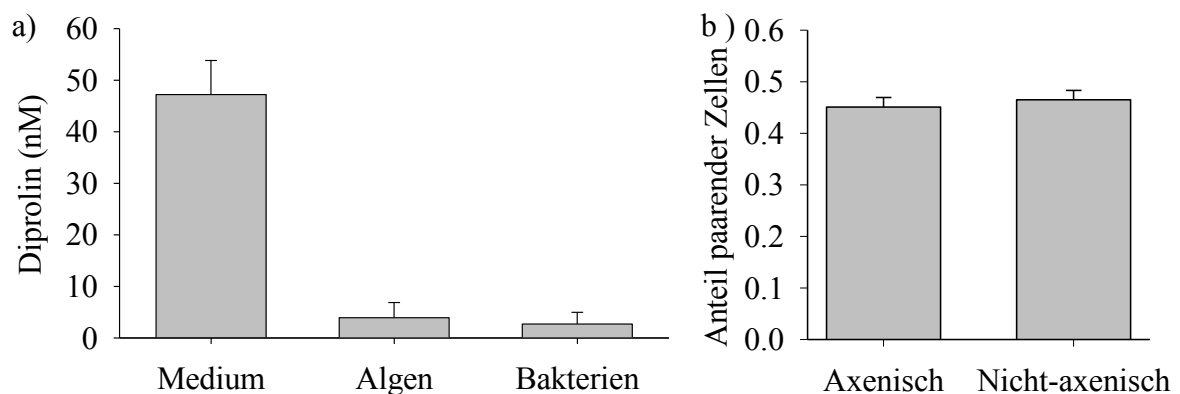


Abbildung 20: Bakterieller Einfluss auf das Paarungssystem. a) Abbau von 50 nM synthetischem L-Diprolin im sterilen Kulturmedium; in Kulturen die sowohl Algen als auch Bakterien enthielten (Algen), sowie in den mit *S. robusta* assoziierten Bakterien (Bakterien), abgeändert nach Scharf (Scharf 2013). b) Anteil an paarenden Zellen in axenischen und nicht axenischen *S. robusta* Kulturen, die beide Paarungstypen MT^+ und MT^- enthielten. (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$).

Das Ergebnis weist auf einen zumindest teilweise bakteriell bedingten Abbau von Diprolin hin. Es existieren bereits umfangreiche Forschungsarbeiten zur Untersuchung des mikrobiellen Abbaus von Diketopiperazinen. Aus einem *Bacillus*-Stamm, der in der Lage ist, spezifisch nur cyclo(Gly-Gly) hydrolytisch zu spalten, konnte das dafür verantwortliche Enzym isoliert werden (Muro *et al.* 1985). Außerdem wurden cyclo(Gly-Leu) abbauende Enzyme aus *Agrobacterium radiobacter* isoliert. Dabei wird das Substrat zunächst durch eine zyklische Dipeptidase zu den azyklischen Dipeptiden Gly-Leu oder Leu-Gly gespalten (Kanzaki *et al.* 2000). Da für die Spaltung von heterogenen Diketopiperazinen zwei mögliche Angriffspositionen zur Verfügung stehen, können auch zwei verschiedene Dipeptide gebildet werden. Im Gegensatz zu dem in *Bacillus* beschriebenen Enzym kann die zyklische Dipeptidase aus *A. radiobacter* auch andere Diketopiperazine spalten. Im Gegenteil dazu ist die aus *Bacillus circulans* isolierte zyklische Dipeptidase nur in der Lage, Phe-Asp aus cyclo(Phe-Asp) zu bilden, was eine deutliche Differenzierung zu dem Enzym von *A. radiobacter* zeigt. Die Dipeptide werden anschließend durch eine Dipeptidase zu den jeweiligen Aminosäuren abgebaut (Kanzaki *et al.* 2000). Zudem wurde der Abbau von Diketopiperazinen in Bakterienstämmen untersucht, die eine zyklische Amidase-Aktivität besitzen. Diese Enzyme spalten zyklische Amide und bauen die zu Diketopiperazinen strukturell ähnlichen Dihydropyrimidine sowie Hydantoin ab (Campbell 1958; Runser und Meyer 1993). Dabei konnten bestimmte Vertreter aus den Gruppen *Leifsonia*, *Bacillus* und *Rhizobium* die Verbindungen cyclo(Ala-Ala), cyclo(Gly-Phe), cyclo(Asp-Phe) und cyclo(Asp-Asp) hydrolytisch spalten (Perzborn 2012). Auch wenn hier nicht untersucht wurde, ob zyklische Amidasen dafür verantwortlich sind, zeigen die aufgezählten Beispiele, wie vielfältig die Möglichkeiten für den mikrobiellen Abbau der Diketopiperazine sind. Damit ist es durchaus möglich, dass der in dieser Arbeit beobachtete Diprolinabbau bakteriell bedingt ist. Das Pheromon könnte für die Bakterien als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen und Grundlage für eine heterotrophe Ernährungsweise sein. Vorstellbar ist auch, dass damit die Bakterien gleichzeitig helfen, gealterte Pheromongradienten abzubauen, was die Partnerfindung der Algenzellen erleichtern würde. Allerdings wird die Paarungseffizienz von *S. robusta* nicht durch Bakterien beeinflusst, was im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Jeroen Gillard herausgefunden wurde. In axenischen Kulturen, welche mit Antibiotika behandelt wurden, war kein Unterschied in der Partnerfindung zu nicht-axenischen Kulturen zu beobachten (Abbildung 20b). Die Diatomeen sind demnach wahrscheinlich nicht auf

Bakterien während des Paarungsvorgangs angewiesen.

In anderen Mikro- und Makroalgen haben Bakterien teilweise direkten Einfluss auf die sexuelle Reproduktion. In *Oedogonium cardiacum* sekretieren Bakterien eine Substanz welche die Entwicklung der Gametangien unterstützt (Machlis 1973). In *Coscinodiscus wailesii* wird die Spermienproduktion ebenfalls von Bakterien beeinflusst (Nagai und Imai 1998). In *Ulva mutabilis* hängt die Entwicklung der Gameten zu ausgewachsenen Blattzellen stark von der Symbiose mit zwei Bakterienarten ab. Wächst *U. mutabilis* nur mit einer dieser Bakterien, ist eine Differenzierung und die Bildung einer natürlichen Zellwand nicht möglich (Spoerner *et al.* 2012). In vielen anderen beschriebenen Pheromonsystemen fehlt eine systematische Untersuchung über den Einfluss der Prokaryoten auf die sexuelle Reproduktion. Eine eindeutige Bestimmung der Rolle der Bakterien beim Diprolinabbau in *S. robusta* erfordert weitere Experimente, die insbesondere die Messung des Verlaufs der Diprolinkonzentration in einer axenischen und nicht-axenischen, paarenden *S. robusta* Kultur umfassen müssen.

3.8. Die biologische Bedeutung von Diketopiperazinen

Im Gegensatz zu anderen Lockstoffen, welche von Braunalgen, Grünalgen und Oomyceten genutzt werden (Abbildung 36, S. 83), wurde das Diatomeenpheromon Diprolin auch in Pflanzen, Tieren und Pilzen gefunden. Die Isolation von Diprolin wurde in der Literatur unter anderem aus der Fermentationslösung des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* (Furtado *et al.* 2005), aus der Wurzel des Nelkengewächses *Psammosilene tunicoides* (Ding *et al.* 2003) und aus den Hämolymphe von Maden der Goldfliege *Lucilia sericata* (Huberman *et al.* 2007) beschrieben. Sexpheromone wirken stets spezifisch auf Angehörige der eigenen Spezies (Karlson und Lüscher 1959) und müssen somit eine Struktur besitzen, die eine eindeutige Rezeptor-Identifizierung ermöglichen. Umso überraschender ist der Einsatz von Diprolin als Lockstoff durch *S. robusta*, da Diprolin ein weit verbreitetes Molekül ist, das in den verschiedensten Lebewesen gefunden wurde. Bisher konnte Diprolin jedoch nicht in aquatischen Organismen nachgewiesen werden, die mit *S. robusta* assoziiert sind. Eventuell ist die Spezifität der Diprolin-Pheromonrezeptor-Interaktion durch den Lebensraum von *S. robusta* gegeben. Neben der Wirkung als Pheromon in *S. robusta* ist die Funktion von Diprolin in anderen Organismen unbekannt. Huberman *et al.* (2007) beschreibt es als eine Substanz mit antibakterieller Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Micrococcus luteus*, zwei heterogene Vertreter aus den

beiden Gruppen der grampositiven und gramnegativen Bakterien. Neben Diprolin konnten auch 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyphenylacetat als antimikrobielle Substanzen aus den Hämolymphe der Maden isoliert werden. Eine Kombination der drei Moleküle ergab eine erhöhte antibakterielle Aktivität. Antibiotika sind stets in geringsten Konzentrationen wirksam. In der Veröffentlichung von Huberman *et al.* fehlten jedoch eindeutige Angaben über die eingesetzte Stoffmenge. Daher kann die antibakterielle Funktion von Diprolin aus dieser Studie nicht abgeleitet werden. Die durch die NIST-Datenbank beschriebene ethylierte Form des Diprolins (Struktur **1**, Abbildung 12, S. 32) wurde in dem Pilz *Pleurotus citrinopileatus* über MS-Techniken nachgewiesen (Bao *et al.* 2004). Da Struktur **1** und Diprolin identische Massenspektren besitzen, bestand die Möglichkeit, dass von Bao *et al.* in dem Pilz nicht Struktur **1**, sondern Diprolin beschrieben wurde. Um dies zu untersuchen, wurde Struktur **1** aus *P. citrinopileatus* isoliert. Dafür wurde der Pilz kultiviert, das Myzel und der Fruchtkörper im flüssigen Stickstoff gemörsert und anschließend die Gewebstrümmer mit Methanol extrahiert. Die GC/MS Analyse des Extrakts ergab, dass die Zielsubstanz und Diprolin identische Retentionszeiten besitzen (Anhang 4). Die Verbindung wurde in der originalen Publikation demnach falsch zugeordnet. Diprolin kommt somit auch intrazellulär in Pilzen vor. Daraus ergab sich die Hypothese, dass das Dipeptid in *P. citrinopileatus* ebenfalls als Signalmolekül zur Steuerung physiologischer und eventuell sogar sexueller Prozesse dienen könnte. Es erfolgte eine Inkubation des Pilzes mit einer diprolinhaltigen Lösung, was jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung des vegetativen und sexuellen Phänotyps des Pilzes besaß (Daten nicht gezeigt). Die biologische Funktion von Diprolin in *P. citrinopileatus* und anderen Organismen muss durch andere Methoden erforscht werden. Beispielsweise könnte die Stilllegung des Gens erfolgen, welches das Enzym kodiert, das für die Bildung von Diprolin verantwortlich ist. Diketopiperazine werden von Organismen vorwiegend über Nicht-ribosomale-Peptidsynthese (NRPS) hergestellt (Gu *et al.* 2013a). Die Biosynthese geschieht dabei über modular organisierte Multienzymkomplexe, die im Gegensatz zu Ribosomen auch D-Aminosäuren verwerten können und nicht von mRNA abhängig sind. Alternativ können zyklische Dipeptide auch über Zyklodipeptid-Synthasen gebildet werden, die aa-tRNA als Substrat nutzen (Lautru *et al.* 2002; Giessen *et al.* 2013; Belin *et al.* 2012). Die Aufklärung des Pheromonsystems von *S. robusta* kann ebenfalls die Erforschung der Diprolinbiosynthese unterstützen, was in Kapitel III diskutiert wird (siehe 5.7, S. 80).

Das Vorkommen von Diketopiperazinen deutet nicht immer auf einen enzymatischen, biologischen Ursprung hin. Oftmals werden Diketopiperazine in den Fermentationslösungen von Hefen, Pilzen und Flechten gefunden (Prasad 1995), wo sie durch die Zyklisierung linearer Dipeptide bei erhöhter Temperatur entstehen. Dies kann beispielsweise während der Hitzesterilisation der Fermentationslösungen passieren (Furtado *et al.* 2005). Außerdem ist es möglich, dass Diketopiperazine Artefakte des Proteinabbaus sind (McClelland *et al.* 2004). Trotzdem werden ihnen zahlreiche biologische Aktivitäten zugeordnet, die durch ihre simplen, aber sehr vielfältigen Struktureigenschaften bedingt sind. Dies erlaubt ihnen, an eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren mit hoher Affinität zu binden (Martins und Carvalho 2007). Übersichtsartikel von Prasad (1995), Martins und Carvalho (2007) beschreiben zahlreiche klinische Effekte der Diketopiperazine. Prominente Anwendungsgebiete sind der Einsatz als Antibiotika, Antimykotika, Virostatika und als Tumoreremmer. Berichte über Funktionen, die Diketopiperazine in den Lebewesen besitzen, in denen sie gefunden wurden, sind weitaus seltener zu finden. Das zyklische Dipeptid aus Histidin und Prolin wurde bei Studien über das Peptidhormon Thyreolilberin als endogen im zentralen Nervensystem, Gastrointestinaltrakt und in Körperflüssigkeiten von Säugetieren beschrieben. Eventuell besteht ein Zusammenhang zwischen der Bildung und Umwandlung beider Peptide (Prasad *et al.* 1977; Prasad 1995). Bei der bakteriellen Kommunikation werden Diketopiperazine als neuartige Quorum sensing Moleküle diskutiert. Quorum sensing bezeichnet eine Kommunikation zwischen Zellen, welche über kleine diffusible Signalmoleküle gesteuert wird (Bassler und Losick 2006; Waters und Bassler 2005). Über Quorum sensing können die Zellen die Dichte der Population wahrnehmen. Dies kann das Gruppenverhalten von Bakterien steuern, welches oftmals mit Pathogenität korreliert. Ein prominenter Vertreter der Quorum sensing Moleküle in gramnegativen Bakterien ist N-Acyl-Homoserin-Lacton, ein sogenanntes Auto-Inducer I-Molekül (Fuqua und Greenberg 2002). Interessanterweise wurden eine Reihe, teilweise Prolin-haltige Diketopiperazine aus verschiedensten gramnegativen Bakterien isoliert und berichtet, dass sie in den Bakterien Antworten hervorrufen, die zuvor spezifisch N-Acyl-Homoserin-Lactonen zugeschrieben wurden (Holden *et al.* 1999; Degrassi *et al.* 2002; Park *et al.* 2006). Außerdem wird bei der Interaktion von Fäulnisbakterien vorgeschlagen, dass zyklische Dipeptide in dem Quorum-Sensing-System von *Shewanella* spp. ähnliche Prozesse wie die Auto-Inducer-II Signale bewirken (Gu *et al.* 2013b). Die Auto-Inducer-II Moleküle sind zyklische Furanosyl-borat-

diester, die eine weitere Klasse von Quorum-Sensing Molekülen darstellen. Diketopiperazine könnten in Bakterien als extrazelluläre Signalstoffe zur Kommunikation dienen, ähnlich wie in *S. robusta*. Die oftmals beobachtete antibakterielle Aktivität der Diketopiperazine könnte in diesem Fall erklärt werden, da künstlich erhöhte Mengen die Kommunikation und Biofilmbildung von Bakterien stören würden. Durch ihr universelles Vorkommen bzw. ihre biologische Aktivität in verschiedensten Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren könnten Diketopiperazine bei der Kommunikation zwischen Bakterien und ihren Wirten beteiligt sein (Interkingdom-Signaling) (Hughes und Sperandio 2008). Die beschriebenen Effekte gelten jedoch nicht als widerspruchsfrei. So müssen Diketopiperazine in bis zu 10^6 mal höheren Konzentrationen vorliegen, um Effekte wie N-Acyl-Homoserin-Lactone auszulösen. Zudem konnte Campbell mit dem Test synthetisierter Diketopiperazine die vorherigen Ergebnisse nicht bestätigen (Campbell *et al.* 2009). Allerdings wurden hier gewisse Effekte von nicht-nativen Diketopiperazinen auf, von Quorum sensing kontrollierte, Vorgänge festgestellt. Es wurde vorgeschlagen, dass Diketopiperazine zwar diese Abläufe verändern können, aber nicht direkt als Quorum sensing Moleküle wie die N-Acyl-Homoserin-Lactone wirken. Generell muss immer beachtet werden, dass potenzielle biologische Nebenwirkungen durch unnatürliche hohe Stoffmengenkonzentrationen verursacht werden können. Eben solche Probleme lassen sich in den Antibiotika-Assays finden. Die aus *Aspergillus fumigatus* (Furtado *et al.* 2005) isolierten Diketopiperazine, darunter Diprolin, konnten das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und *Micrococcus luteus* erst bei Konzentrationen ab 2.9 mM inhibieren. Dies ist im Vergleich zu aktiven Penicillin-Konzentrationen von 0.12 - 0.25 nM eine ökologisch nicht relevante Konzentration.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bisher keine eindeutige biologische Bedeutung von Diketopiperazinen gefunden wurde. Damit ist Diprolin der erste Vertreter dieser ubiquitären Substanzklasse, dessen Funktion als Pheromon bewiesen wurde. Dies könnte die Theorien, das Diketopiperazine als universelle Kommunikationssignale verwendet werden, neu beleben.

4. Kapitel II: Trennung der Diprolin Enantiomere

4.1. Grundlagen und Aufgabenstellung

Beim biologischen Test von L-Diprolin und D-Diprolin (siehe 3.6; S. 38) zeigten beide Enantiomere vergleichbare Aktivitäten. Dies ist ungewöhnlich, da in der Pheromon-Rezeptor-Beziehung meist ein stereoselektives Verhältnis besteht. Eine mögliche Erklärung für die Enantiomerenaktivität ist, dass die Rezeption von Diprolin eine Racemisierung des Pheromons vor oder während der Interaktion mit dem Rezeptor beinhaltet. In diesem Fall könnten beide Enantiomere von dem Rezeptor erkannt werden. Demnach müsste D-Diprolin während der Pheromon-Rezeptor-Interaktion gebildet werden. Um dies zu untersuchen, muss der Enantiomerenüberschuss des Pheromons L-Diprolin während des Paarungsprozesses (siehe Abbildung 19b, S. 41) von *S. robusta* bestimmt werden. Bisher wurde zur Bestimmung der Stereochemie CD-Spektroskopie genutzt. Diese Technik benötigt jedoch mindestens 100 µg an gereinigter Substanz. Die einzelnen Proben der extrazellulären Extrakte der paarenden Zellen enthalten jedoch nur wenige Mikrogramm Diprolin in einer komplexen biologischen Matrix. Zudem erlaubt CD-Spektroskopie keine quantitative Bestimmung des Enantiomerenüberschusses. Demnach musste eine Methode entwickelt werden, welche die chromatographische Auflösung beider Enantiomere innerhalb der biologischen Matrix der Probe ermöglicht.

Die Möglichkeiten zur chiralen Trennung von Aminosäuren sind gut dokumentiert und können über den Einsatz chiraler Eluenten, chiraler Derivatisierungstechniken und chiraler stationärer Phasen mittels LC erzielt werden (Roumeliotis *et al.* 1983; Aswad 1984; Nimura *et al.* 1982). Ebenso können Aminosäurederivate mittels optisch aktiver stationärer Phasen in der GC (Gilav *et al.* 1966; Oi *et al.* 1980; Abe und Musha 1980) getrennt werden. GC/MS ermöglicht sogar die Analyse von komplexen Mischungen von derivatisierten Dipeptiden auf chiralen stationären Phasen (Pätzold *et al.* 2006). Demnach könnten durch Hydrolyse der Diketopiperazine die korrespondierenden Dipeptide und Aminosäuren erzeugt und durch die genannten Methoden getrennt werden. Eine Übersicht über verschiedene Hydrolysemethoden sind von Perzborn beschrieben worden (Perzborn 2012), wobei die wichtigsten Möglichkeiten die chemische-, enzymatische- und mikrobielle Hydrolyse sind. Jedoch spalten Peptidasen und Bakterien meist nur spezifisch bestimmte Diketopiperazine, was zudem noch kontrovers diskutiert wird (Perzborn, 2012).

Ebenso könnte es durchaus auch zu einer Racemisierung während des Abbaus kommen. Daher bietet sich die chemische Hydrolyse für den routinemäßigen Einsatz an, da sie zudem keinen Zusatz von externen biochemischen Faktoren erfordert. Hierbei sind die saure und die alkalische Hydrolyse möglich (Perzborn, 2012). Die Verwendung von Säuren erfordert jedoch gleichzeitiges Erhitzen, was wiederum zur Racemisierung von Prolin führt (Nonappa *et al.* 2011). Bei der alkalischen Hydrolyse kann das Zuführen von Wärme vermieden werden, allerdings zeigen sich bestimmte Diketopiperazine, die aus zwei gleichen Aminosäuren aufgebaut sind, als alkalistabil (Fischer und Schrauth 1907). Diketopiperazine aus Pyroglutaminsäure können unter basischen Bedingungen gut gespalten werden (Parrish und Mathias 2002), ebenso wie Boc (tert-Butyloxycarbonyl) derivatisierte Diketopiperazine (Farran *et al.* 2009). Die Anwendung der chemischen Hydrolyse vor der chiralen Analyse wird jedoch unweigerlich zu gewissen Verlusten des Analyten führen. Ein weiteres Problem stellt die anschließende Derivatisierung der Aminosäuren und Dipeptide dar, die ebenfalls bei niedrigen Temperaturen geschehen muss, um eine erneute Zyklisierung zu vermeiden (Pätzold *et al.* 2006). Das Ziel dieser Arbeit war es, letztendlich eine chirale Trennung der Enantiomere direkt aus der biologischen Matrix zu erreichen. Bisher ist es unklar, welche potenziellen Reaktionen während der Spaltung und Derivatisierung geschehen, wenn diese Reaktionen nicht mit Reinsubstanzen durchgeführt werden und zudem der Analyt nur einen Bruchteil der Gesamtmenge aller Moleküle in der Probe darstellt. Von daher ist eine direkte chirale Analytik der Diketopiperazine, falls möglich, zu bevorzugen.

4.2. Cyclodextrine

Ein vielversprechender Ansatz für die chirale Trennung der Diprolin Enantiomere ist der Einsatz von Cyclodextrinen als stationäre Phase in LC und GC. Dabei handelt es sich um zyklische Oligosaccharide, die einen zentralen Hohlraum besitzen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Normal- und Umkehrphasen wird hier die Trennung durch die Ausbildung von Einschlussverbindungen gefördert, welche von der geometrischen Form des Analyten abhängig sind (Szejtli 1982). Daraus ergeben sich vielfältige Möglichkeiten bei chiralen Trennproblematiken (Armstrong *et al.* 1985). Nach der Anzahl ihrer Glucosebausteine unterteilt man die Cyclodextrine in α , β , γ und δ Cyclodextrine (Anzahl Glucosemoleküle jeweils 6, 7, 8 oder 9), was eine unterschiedliche Ringgröße bedingt. Außerdem können

zusätzlich noch die freien Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle permethyliert werden, um eine andere Selektivität zu erreichen. Dies ermöglicht eine breite Einsatzmöglichkeit für die Analytik von verschiedensten Substanzen. Die Trennung von Diketopiperazin-Diastereomeren ist auf Cyclodextrin-Säulen unter Verwendung eines Elutionsgradientens problemlos möglich (Florance *et al.* 1987), wofür bei nicht chiralen Umkehrphase HPLC-Säulen ein isokratisches Elutionsprogramm verwendet werden musste (siehe Methoden, S. 104). Zusätzlich konnten Diketopiperazin Enantiomere, die eine aromatische Aminosäure enthielten, auf Cyclodextrin-Säulen aufgelöst werden (Florance und Konteatis 1991). Literaturdaten für die Trennung des Diprolin Racemats waren jedoch nicht verfügbar.

Die chirale Trennung der beiden Diprolin Enantiomere L-Diprolin und D-Diprolin wurde mit verschiedenen Nucleodex HPLC Säulen getestet, welche α -, β oder γ Cyclodextrin-Phasen enthielten. Dabei war β -Cyclodextrin permethyliert, die anderen Varianten enthielten freie Hydroxylgruppen. Durch das Mischen der Enantiomere aus dem enantioselektiven Syntheseweg nach Nakamura (siehe 3.5, S. 33) wurde das Racemat hergestellt und durch ein isokratisches Elutionsprogramm mit Wasser vermessen. Zur Detektion wurde ein ESI-qTOF-System verwendet. Jedoch konnte bei keiner der verwendeten Säulen eine Trennung des Racemats beobachtet werden. Anschließend erfolgte der Test auf einem GC/MS-System mit einer Cyclodex-B Säule, die aus 10.5% β -Cyclodextrin in 14% Cyanopropyl-phenyl / 86% Methylpolysiloxan besteht. Es wurden verschiedene isotherme Programme (230°C, 220°C, 210°C, 200°C und 180°C) getestet. Allerdings konnte auch mit diesen Methoden keine Trennung erreicht werden (Abbildung 21). Aufgrund der niedrigen Flüchtigkeit von Diprolin konnte die Ofentemperatur nicht weiter gesenkt werden. Derivatisierungsfreie GC ist daher keine geeignete Methode für diese analytische Zielstellung.

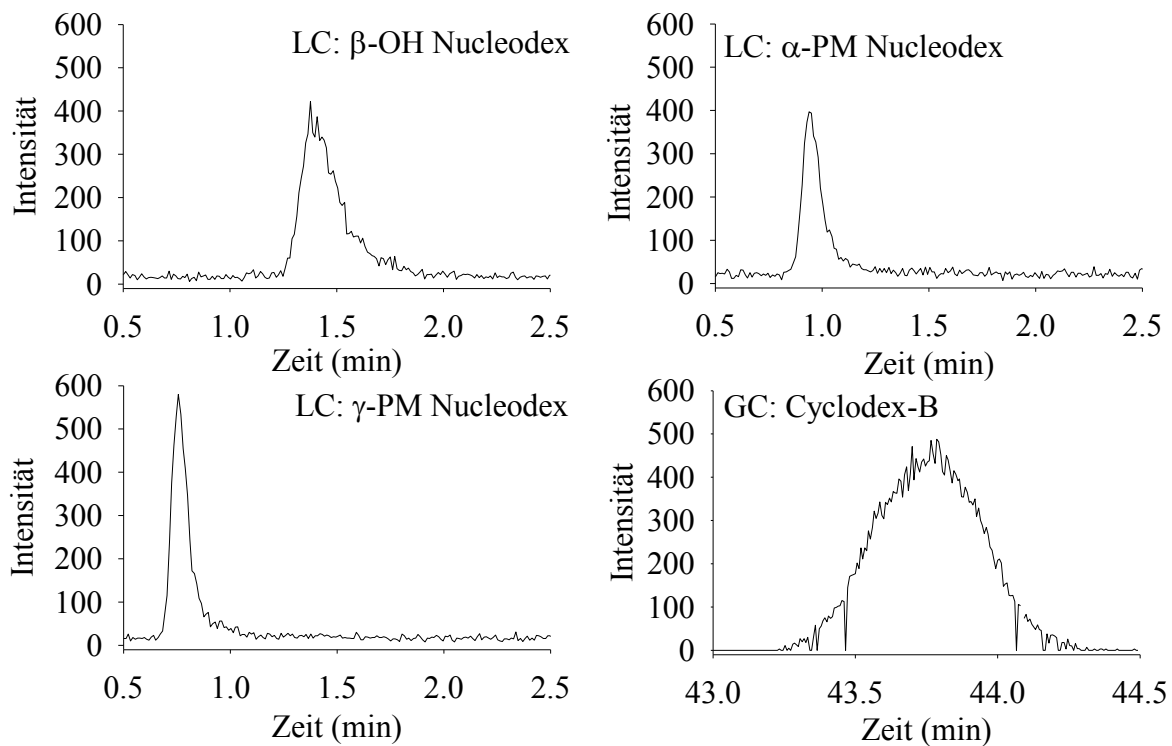


Abbildung 21: Cyclodextrin-Analytik. Zum Test der Trennung des Diprolin Racemats wurden verschiedene Cyclodextrin-Phasen mit HPLC/MS (Nucleodex) und GC/MS (Cyclodex-B) verwendet. Dargestellt ist die Ionenspur 195.1 für LC (kationisiertes Molekül) und 70.07 für GC (Fragment von Diprolin).

4.3. Alternative Trennmethoden

Die bisherigen Trennversuche mit Cyclodextrin-Phasen erwiesen sich für die chirale Trennung der Enantiomere als ungeeignet. Als alternative chirale stationäre Phase bieten sich verschieden modifizierte Glucosepolymere an, die auf einer Silikatschicht immobilisiert sind. Die Glucosepolymere können unter anderem als Acetatester, Benzoatester oder Phenylcarbamaterivat von Amylose oder Cellulose vorliegen. Die chromatographische Trennung kann unter Normal-Phase-Bedingungen (NPLC: mobile Phase z.B. Hexan/Ethanol) erfolgen. Ebenso ist ein Einsatz unter Umkehrphase-Bedingungen möglich (RPLC: mobile Phase z.B. Wasser/Methanol). Hierbei wird der gleiche chirale Selektor verwendet, die Silikatmatrix wird jedoch den Umkehrphasebedingungen entsprechend derivatisiert. Für beide Methoden lassen sich erfolgreiche Strategien zur chiralen Trennung von neutralen, basischen und sauren pharmazeutischen Substanzen entwickeln (Matthijs *et al.* 2004). Zusätzlich können die

Polysaccharide auch mit Polar-Phase (POSC: mobile Phase z.B. Methanol) und überkritischer Phase (SFC: mobile Phase z.B. Methanol / CO₂) betrieben werden. Matthijs (Matthijs *et al.* 2006) testete verschiedene saure, neutrale und basische Substanzen mit POSC, NPLC und SFC, wobei SFC in den meisten Fällen zu den besten Ergebnissen führte. SFC wurde 1962 als Methode in der Chromatographie eingeführt (Klesper *et al.* 1962). Dabei befindet sich der Aggregatzustand der mobilen Phase in einem überkritischen Zustand, der durch das Einstellen einer kritischen Temperatur und eines kritischen Drucks erreicht wird. Die kritische Temperatur verhindert den Übergang der mobilen Phase in den flüssigen Aggregatzustand bei Druckerhöhung, der überkritische Druck verhindert den Übergang zum Gas bei Temperaturerhöhung. Unter diesen Bedingungen befindet sich die mobile Phase in einem Zustand zwischen Flüssigkeit und Gas und hat Eigenschaften beider Aggregatzustände. Somit kann SFC als Hybrid zwischen Gas- und Flüssigchromatographie bezeichnet werden, welche einige Vorteile beider Methoden vereint (Scott 1994). Durch die Anwendung niedrigerer Betriebstemperaturen verglichen zur GC wird das Risiko der Racemisierung von Analyten gesenkt (Jung und Schurig 1993). Damit ist SFC besonders zur enantioselektiven Analyse von thermolabilen Substanzen geeignet (Mourier *et al.* 1985; Terfloth 2001). Im Vergleich zur chiralen HPLC bietet SFC verkürzte Analysezeiten und einen reduzierten Verbrauch an Lösungsmittel, was besonders für präparative Zwecke von Vorteil ist (Williams und Sander 1997). Als mobile Phase wird meist CO₂ verwendet, da es inert und preiswert ist. Um die Polarität zu erhöhen kann ein Modifier, z.B. Methanol, Acetonitril und 2-Propanol zugesetzt werden. Durch Änderungen von Temperatur, Druck oder Modifier kann die Löslichkeit verschiedener Substanzen schnell modifiziert werden. Da die direkte Injektion von wässrigen Probengemischen möglich ist (Mukherjee 2007), können auch sehr polare Substanzen gemessen werden (Berger 1997). Mit SFC konnten Enantiomere von Aminosäure-Derivaten (Hara *et al.* 1986), halogen- und methoxysubstituierte Phenylglycidole (McConnell *et al.* 2007), 1-Phenyl-1-propanol (Ottiger *et al.* 2007) sowie weitere, teilweise pharmazeutisch bedeutende Substanzklassen wie Analgetika, β -Blocker, Sulfoxide, N-geschützte Aminosäuren und native Aminosäuren (Liu *et al.* 2002) getrennt werden. Die präparative Trennung von Arzneimitteln mittels SFC besitzt besondere Bedeutung für die pharmazeutische Industrie (Ren-Qi *et al.* 2012; Klerck *et al.* 2012), da unerwünschte Enantiomere zu ungewollten Nebenwirkungen führen können (Maier *et al.* 2001b). Aufgrund der erfolgreichen chiralen Trennung einer Vielzahl an Substanzklassen sollte im Folgenden nun ein Glucosepolymer als stationäre Phase und

ein überkritisches Fluid als mobile Phase eingesetzt werden, um das Diprolin Racemat zu trennen.

4.4. Chirale Trennung von Diprolin

Für die Trennung des Diprolin Racemats mittels SFC wurde zunächst in Zusammenarbeit mit Carsten Wess (Waters GmbH) ein Methoden-Screening mit verschiedenen stationären und mobilen Phasen durchgeführt. Methanol, Acetonitril und 2-Propanol wurden als organische Modifier der mobilen CO₂ Phase zugesetzt. Es wurde ein Standard-Screening Programm gefahren, bei dem der Gradient der mobilen Phase von 5% auf 40% Modifier in vier Minuten anstieg und für eine Minute bei 40% gehalten wurde. Dabei war die Elutionskraft von Acetonitril/CO₂ auf allen getesteten stationären Phasen deutlich niedriger im Vergleich zu den polareren Modifiern. Das Racemat eluierte dabei nicht innerhalb des Gradient-Bereiches, sondern während des Waschens der Säule oder sogar erst im nächsten Durchlauf, was zu breiten Signalen oder zu instabilen Retentionszeiten führte. Ebenso erwies sich die stationäre Phase aus Cellulose *tris* (dichlorophenylcarbamate) (Säulentyp IC) als ungeeignet. Auch hier waren die Interaktionen zwischen Analyt und dem chiralen Selektor zu hoch, so dass keine der verwendeten mobilen Phasen in der Lage war, die Elution der Substanzen innerhalb des Gradient-Bereiches durchzuführen. Die stationäre Phase Cellulose *tris* (3,5-dimethylphenylcarbamate) (Säulentyp IB) war ebenfalls ungeeignet. Trotz der Elution des Racemats innerhalb des Gradient-Bereiches (31.25% Methanol/CO₂ oder 40% 2-Propanol/CO₂) (Abbildung 22), war keine chirale Trennung möglich. Erstmals konnte eine Trennung mit der stationären Phase Amylose *tris* (3-chlorophenylcarbamate) (Säulentyp ID) beobachtet werden. Mit dem Eluent 2-Propanol/CO₂ ergab sich eine geringe chromatographische Auftrennung des Racemats ($R_s = 0.87$) (Abbildung 22). Mit Methanol/CO₂ konnte keine Trennleistung erzielt werden. Im Gegensatz dazu ergab die stationäre Phase Amylose *tris* (3,5-dimethylphenylcarbamate) (Säulentyp IA) eine sehr gute Trennung der Enantiomere mit den Eluenten Methanol/CO₂ ($R_s = 1.2$) und 2-Propanol/CO₂ ($R_s = 1.4$) (Abbildung 22).

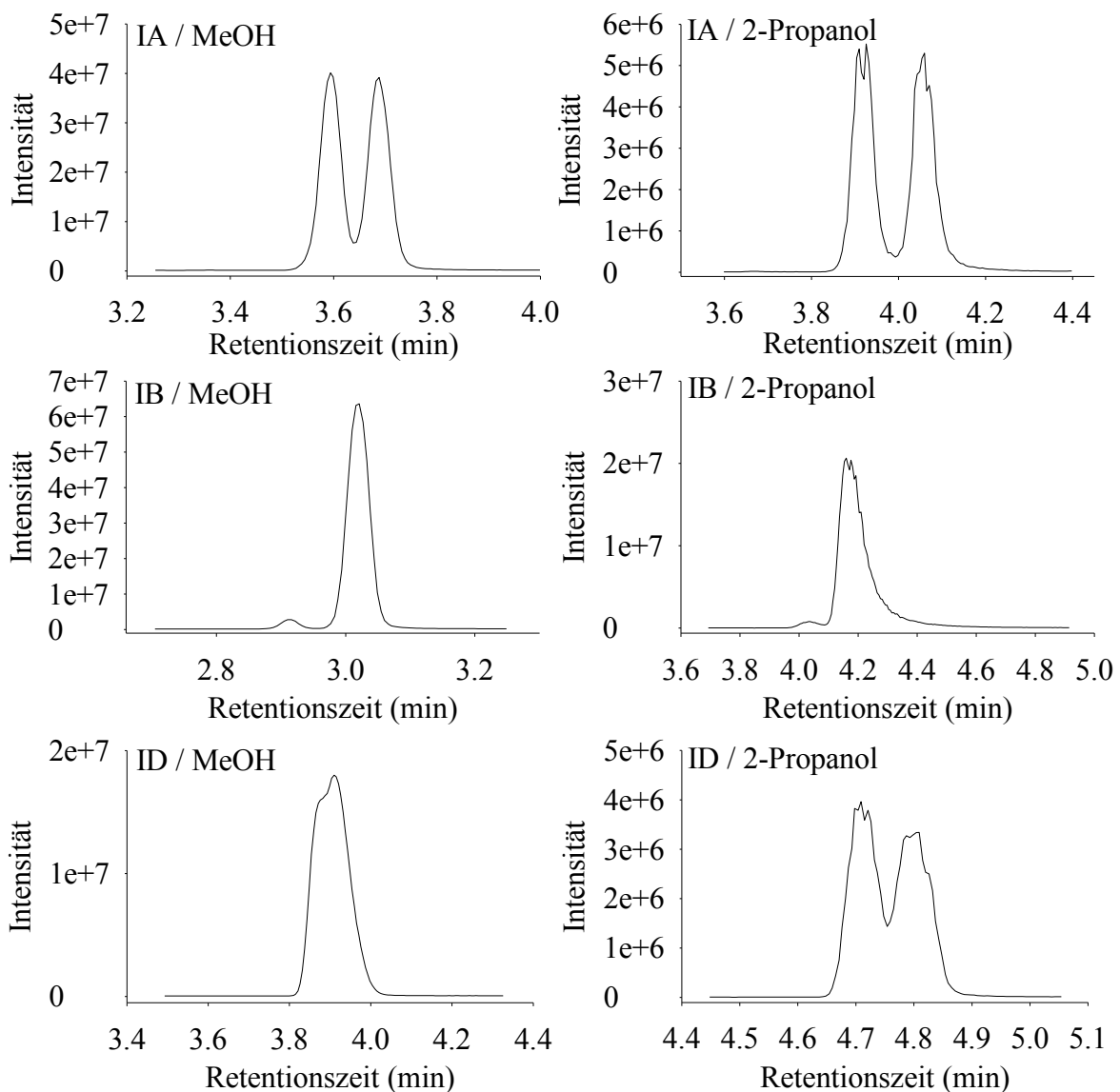


Abbildung 22: Chirale SFC/MS. Trennung des Diprolin Racemats auf verschiedenen stationären Phasen (IA, IB, IC, siehe Text) mit Methanol und 2-Propanol als Modifier. Die Detektion erfolgte vom kationisiertem Diprolin Molekül ($m/z = 195$) im SIM-Modus.

Da der Säulentyp IA mit 2-Propanol/ CO_2 die besten Ergebnisse erzielte, wurde diese Kombination für die weitere Methodenoptimierung verwendet. Die Detektion erfolgte zur Erhöhung der Selektivität und damit der Nachweisgrenze in den biologischen Proben nicht im SIM, sondern im MRM-Modus. Dafür wurde der Anstieg des Gradienten von 20 – 50% 2-Propanol/ CO_2 in vier Minuten geändert, womit eine Basislinientrennung der beiden Enantiomere erreicht werden konnte ($R_s = 2.1$, Abbildung 23a). Um eine eindeutige Zuordnung zu ermöglichen, wurde die Enantiomerenmischung in einem Verhältnis von 3:1

D-Diprolin:L-Diprolin injiziert. Einzeln gemessen wiesen die Enantiomere die gleichen Retentionszeiten wie die jeweiligen zuzuordnenden Signale in der Enantiomerenmischung auf (Abbildung 23b-c). Dabei zeigte sich, dass die Substanzen nicht enantiomerenrein vorlagen. Der Anteil von L-Diprolin in D-Diprolin betrug 0.9% und im gegenteiligen Fall 0.1%. Anschließend wurde ein extrazelluläres Extrakt einer konditionierten MT⁻ Kultur getestet. Dabei besaß das von den Algen produzierte Pheromon die gleiche Retentionszeit wie das L-Enantiomer (Abbildung 23d). Auch hier konnte interessanterweise ein geringer Anteil (0.9%) von D-Diprolin nachgewiesen werden, was im Abschnitt 4.6 (S. 61) untersucht wird. Somit funktioniert die Trennung und damit die zuverlässige Bestimmung des Enantiomerenüberschusses auch in nicht gereinigten Proben, welche mit der Matrix des Mediums und anderen Algenmetaboliten belastet sind.

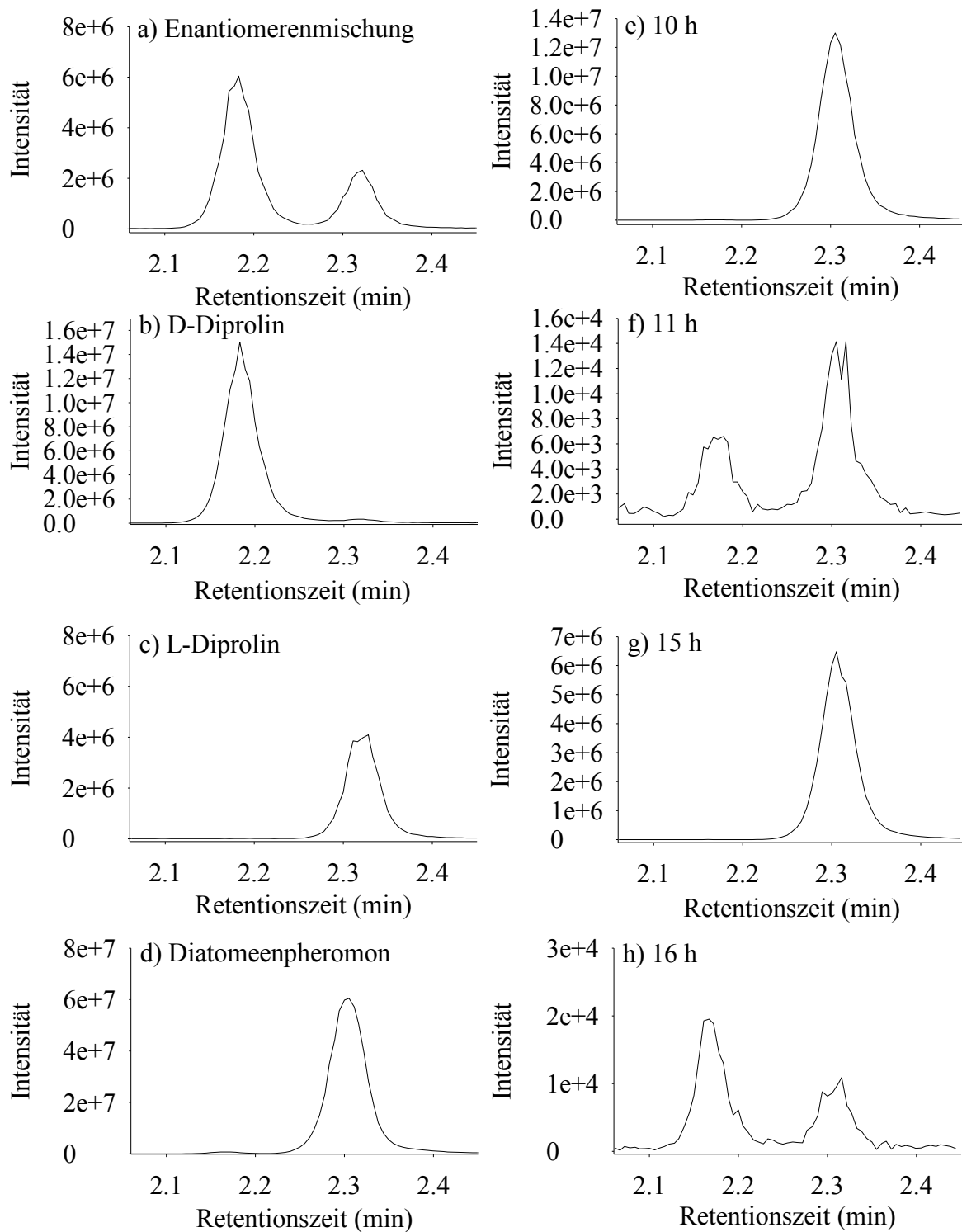


Abbildung 23: Anwendung von SFC nach Methodenoptimierung. a-d) Einzel- und Koinjektion beider Diprolin Enantiomere und des Diatomeenpheromons. e-h) Untersuchung der Stereochemie des nativen Pheromons in extrazellulären Diatomeenextrakten. Die Detektion erfolgte im MRM Modus mit den Ionenpaaren $m/z = 195/97$.

4.5. Test auf Racemisierung zu L/D-Diprolin

Mit der optimierten Methode sollte nun untersucht werden, ob es während der Pheromon-Rezeptor-Interaktion während der Paarung der Zellen zur Racemisierung von Diprolin kommt. Dafür wurden die Proben aus der Aufnahme der Pheromonkinetik (Abbildung 19) mit der optimierten SFC-Methode erneut vermessen. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf den Zeitpunkten 6 – 17 h nach Beleuchtung in der paarenden Kultur, da in diesem Zeitraum der Pheromonaufbau durch MT^- , die Pheromon-Rezeptor-Erkennung durch MT^+ und der Pheromonabbau durch MT^+ oder MT^- stattfindet. Nach der Analytik erfolgte die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von L-Diprolin. Da für die SFC-Analytik keine Kalibration erstellt wurde, kann die Menge von Diprolin nur relativ zum internen Standard Coffein angegeben werden. Zu allen Zeitpunkten war D-Diprolin in sehr geringen Mengen vorhanden, wobei der Enantiomerenüberschuss von L-Diprolin zwischen 6 – 10 h und 14 – 15 h nach Beleuchtung >99% betrug (Abbildung 24a). Sobald jedoch Diprolin zwischen 10 – 11 h und 15 – 16 h nach Beleuchtung abgebaut wurde, sinkt der Enantiomerenüberschuss stark ab (Abbildung 23e-h). Nach 16 h konnte sogar ein Überschuss von D-Diprolin gemessen werden (Abbildung 24a). Perzborn konnte einen enantioselektiven Abbau von Diketopiperazinen in *Paenibacillus sp.* und *Microbacterium sp.* nachweisen. Die Bakterien waren in der Lage, cyclo(L-Ala-L-Ala) und cyclo(L-Ala-D-Ala) vollständig zu hydrolisieren, cyclo(D-Ala-D-Ala) wurde jedoch nicht genutzt (Perzborn 2012). Daher ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten Verlauf des Enantiomerenüberschusses, dass der Abbau von D-Diprolin wesentlich langsamer erfolgt als von L-Diprolin, das durch Algen oder Bakterien schnell abgebaut werden kann. Die Konzentration von D-Diprolin bleibt über die gesamte Zeit der Diprolinrezeption und des Diprolinabbaus nahezu konstant (Abbildung 24b). Daher findet wahrscheinlich keine Racemisierung von L-Diprolin während der Pheromon-Rezeptor-Interaktion statt. Der Rezeptor muss daher für eine erfolgreiche Rezeption des D-Diprolins eine gewisse Unspezifität besitzen.

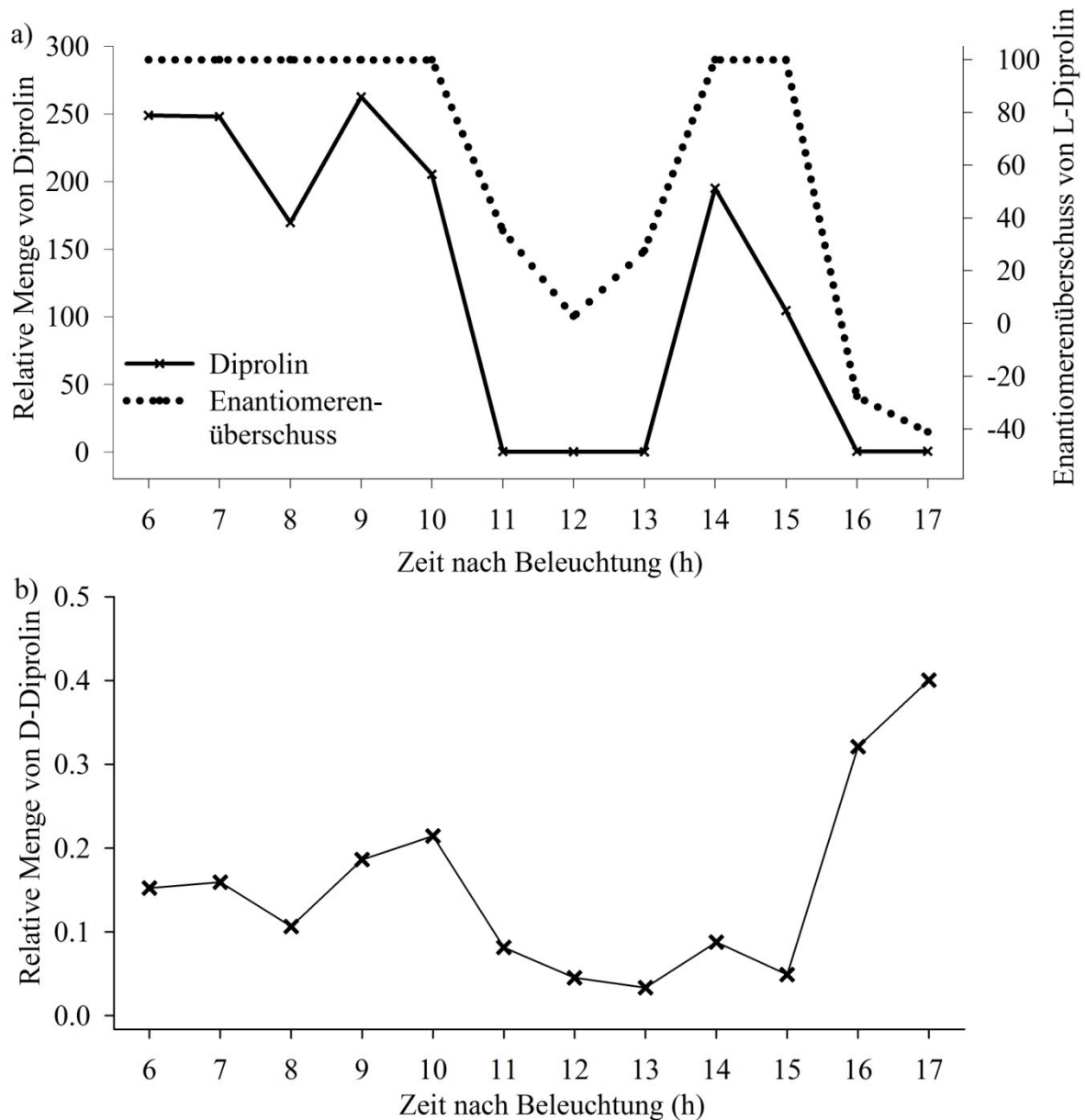


Abbildung 24: Enantiomerenverhältnisse von Diprolin während des Pheromonauf- und abbaus. a) Gesamtmenge des Diprolins und Enantiomerenüberschuss von L-Diprolin. b) Gesamtmenge von D-Diprolin. Die relative Menge von Diprolin ergibt sich aus dem Flächenverhältnis von Diprolin zum internen Standard Coffein.

Die gleichwertige Rezeption von Pheromonenantiomeren ist unüblich. Allerdings kommen in der Natur in einigen Fällen auch bioaktive Pheromonstereoisomere vor. In der Braunalge *Laminaria digitata* bewirkt das Pheromon (*1R,2'S,3'R*)-Lamoxiren die Freisetzung der Spermien aus Antheridien. Außerdem sind noch die Isomere (*1S,2'R,3'S*)- und (*1S,2'S,3'R*)-Lamoxiren aktiv, aber nur in teilweise deutlich höheren Konzentrationen. In *Laminaria saccharina* besitzt das letztgenannte Diastereomer jedoch eine zum

natürlichen Pheromon vergleichbare Aktivität (Maier *et al.* 2001a). Da die beschriebene Pheromonchemie in Algen stark limitiert ist, müssen die betrachteten Systeme auf besser erforschte Gruppen ausgeweitet werden, um Beispiele für gleichwertige Enantiomerenaktivität zu finden. Geeignet hierfür erscheinen die Insekten, deren Pheromonsysteme bereits umfangreich erforscht sind (Karlson und Butenandt 1959; Tillman *et al.* 1999). Bei vielen Insekten kann beobachtet werden, dass die nicht natürlichen, synthetischen Enantiomere unwirksam sind (Hillbur *et al.* 2001). Allerdings gibt es in Insekten auch komplett andere, deutlich komplexere Beziehungen zwischen der Stereochemie und der Aktivität (Mori 2011). So sind die beiden einzelnen synthetischen Pheromonenantiomere (*R*)/(*S*)-Sulcatol der Borkenkäferspezies *Gnathotrichus sulcatus* inaktiv. Eine 50:50 Mischung zeigt deutlich höhere Aktivität, die sogar die des natürlichen Pheromons mit einem Isomerenverhältnis von $R/S = 65:35$ übersteigt (Borden *et al.* 1976). Dies zeigt, dass teils beide Enantiomere für eine entsprechende Aktivität benötigt werden. Ein anderer Enantiomereneffekt kann die Inhibierung der Aktivität durch das nicht natürliche Enantiomer sein, wie in dem Fall von Dispalur, dem Pheromon der Motte *Lymantria dispar* (Miller *et al.* 1977; Vite *et al.* 1976). Im Gegensatz dazu gibt es auch Stereoisomere, die eine zum natürlichen Pheromon erhöhte Aktivität aufweisen. Das natürliche Sexpheromon der Schabe *Blatella germanica* besitzt sogar die geringste Aktivität unter den vier möglichen Stereoisomeren (Eliyahu *et al.* 2004). In der Fruchtfliege *Bactrocera oleae* wirkt (*R*)-Olean nur auf Männchen und (*S*)-Olean nur auf Weibchen und das natürliche Pheromon ist eine 50:50 Mischung (Haniotakis *et al.* 1986). Auch wenn die Pheromonchemie von *S. robusta* im wässrigen Milieu stattfindet und sich hinsichtlich der Polarität unterscheidet, liegen die Molekülgrößen der Insektenpheromone in den gleichen Größenordnungen und die Strukturen weisen ebenfalls meist nur ein bis zwei Stereozentren auf. Eine für den Zweck hinreichende Vergleichbarkeit der Pheromonrezeptoren zwischen Diatomeen und Insekten kann aber nur angenommen werden. Die aufgezählten Beispiele zeigen jedoch, dass die Aktivität verschiedener Enantiomere keine Seltenheit ist und in vielen Variationen vorkommt. Durch die Synthese und den Test verschiedener Diprolinderivate könnten Strukturaktivitätsuntersuchungen die für die Aktivität verantwortlichen Strukturelemente von Diprolin aufzeigen.

4.6. Diketopiperazine aus D-Aminosäuren

Wie oben beschrieben, konnte neben L-Diprolin im synthetischen L-Diprolin und im Diatomeenlockstoff von *S. robusta* ein geringer Anteil von D-Diprolin detektiert werden. Dieser kann in der synthetischen Probe erklärt werden, da für die Synthese L-Prolin genutzt wurde, welches auch einen kleinen Anteil an D-Prolin enthielt (siehe 3.5, S. 33). Jedoch ist der Ursprung von D-Diprolin in den Pheromonproben bisher ungeklärt. Da eine Racemisierung von L-Diprolin zu D-Diprolin möglich ist (Schmidt und Nikiforov 1975), muss die Möglichkeit einer system- und methodenbedingten Isomerisierung während der Probenextraktion, Lagerung oder Messung in Betracht gezogen werden. Allerdings ist dies unwahrscheinlich, da die D-Diprolin Konzentration unabhängig von der Konzentration des L-Diprolin war. In einigen Proben wurde sogar ein Überschuss von D-Diprolin detektiert, welches wahrscheinlich einen biologischen Ursprung hat. Jedoch ist noch unklar, ob es z.B. ein Nebenprodukt der Pheromonsynthese oder des Abbaus ist. Eine weitere Möglichkeit ist ein bakterieller Ursprung von D-Diprolin. Diketopiperazine, aufgebaut aus Prolin und D-Aminosäuren, konnten aus marinen Bakterien isoliert werden. Diese besitzen eine antibiotische Wirkung gegen *Vibrio anguillarum* mit einer minimalen Hemmkonzentration zwischen 0.03 – 0.07 µg/ml. Diese ist zehnmal niedriger als die minimale Hemmkonzentration herkömmlicher Antibiotika wie Oxytetracycline (0.5 µg/ml), welche in Aquakulturen eingesetzt werden (Fdhila *et al.* 2003). Die starke antibiotische Wirkung von D-Diketopiperazinen könnte mit der mangelnden Abbaufähigkeit einhergehen. Ein bakterieller Ursprung des Diprolins könnte gleichzeitig das Auffinden von Diprolin in geringen Mengen in nicht konditionierten MT⁻ Kulturen erklären (Abbildung 18, S. 40). Mit Hilfe axenischer Kulturen sollte nun diese Hypothese bestätigt werden. Das Entfernen der Bakterien erwies sich jedoch als schwierig und konnte durch das von Gillard angewandte Protokoll (siehe 3.7, S. 43, Abbildung 20b) nicht zufriedenstellend reproduziert werden. Jede Antibiotikabehandlung zog das Wachstum eines Pilzes mit sich, der rasch die gesamte Kultur dominierte und sie damit unbrauchbar machte (Anhang 5). Wahrscheinlich unterdrückte das Vorhandensein der Bakterien das Auskeimen der Pilzsporen, die im Wasser vorhanden oder mit den Algenzellen assoziiert sind.

Auch wenn der Ursprung und die biologische Aktivität von D-Diprolin ungeklärt bleiben, konnte mit den vorgestellten SFC-Messungen eine schnelle und sensitive Methode zur Analyse dieser Substanz entwickelt werden. Nun kann überprüft werden, ob auch die

chirale Trennung anderer Diketopiperazine mittels SFC möglich ist. Die synergistische, antimikrobielle Wirkung von D- und L-prolinhaltigen Diketopiperazinen und deren potenzieller Einsatz gegen multiresistente Erreger (Kumar *et al.* 2012) zeigen die Bedeutung von zuverlässigen Messmethoden zur Bestimmung der Stereochemie.

5. Kapitel III: Synchronisierung des Paarungsablaufes

5.1. Grundlagen und Aufgabenstellung

Zur weiteren Aufklärung des Pheromonsystems der Diatomee *Seminavis robusta* wurde die Synchronisierung des Paarungsablaufes untersucht. Es ist bekannt, dass sobald die Zellgröße der Algen unterhalb die SST fällt, konditionierende Moleküle sekretiert werden, die die sexuellen Vorgänge im Paarungspartner induzieren (siehe 3.3; S. 26). Diese Moleküle werden als Sex-induzierende Pheromone (SIP) bezeichnet, wobei SIP^+ durch MT^+ produziert wird und die Diprolinproduktion in MT^- initiiert. Im Gegenzug sekretiert MT^- SIP^- und induziert einen mutmaßlichen Diprolinrezeptor in MT^+ (Abbildung 37, S. 88). Für die sexuelle Reproduktion ist es allerdings wichtig, dass die Partner ebenfalls den gleichen Zellzyklusstatus besitzen. Ansonsten ist es möglich, dass ein Paarungstyp nach erfolgreicher Zellpaarung mit der Bildung von Gameten beginnt, während der Partner die G1-Zellzyklusphase bereits überschritten hat. In dem Fall ist keine Gametogenese mehr möglich, da diese wahrscheinlich in der G1-Phase festgelegt wird (Gillard 2009). Somit können keine Zygoten gebildet und die bereits produzierten Gameten würden verloren gehen, was die reproduktive Fitness von *S. robusta* herabsetzen würde. Eine erste Synchronisierung des Paarungsablaufs wird durch Dunkelheit erreicht, welche den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert (Gillard *et al.* 2008). Die sexuellen Vorgänge finden jedoch nicht in der Dunkelheit statt, sondern erfordern Licht. In einer vegetativen Kultur bewirkt Belichtung die Initiierung der Synthesephase und damit ein voranschreiten des Zellzyklus (Gillard 2009). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in einer paarenden Kultur der Zellzyklus auch bei Belichtung durch einen im Medium vorhandenen Metaboliten arretiert wird (Gillard 2009) (sowie 3.6, S. 38). Die genaue Regulation der Zellzyklusarretierung wurde von Valerie Devos untersucht (unveröffentlichte Dissertation, Universität Ghent). Dafür wurden beide Paarungstypen mit Zellgrößen oberhalb und unterhalb der SST mit dem zellfreien Überstand einer paarenden Kultur inkubiert. Eine Zellzyklusarretierung erfolgte nur in den Zellen unterhalb der SST. Der Anteil der teilenden Zellen unterhalb der SST nahm jedoch nicht ab, wenn sie mit dem Überstand von Zellen des gleichen Paarungstyps unterhalb der SST oder des anderen Paarungspartners oberhalb der SST behandelt wurden. Neben dem Medium der paarenden Kultur war nur der zellfreie Überstand von MT^+ unterhalb der SST in der Lage, den Zellzyklus von MT^-

zu stoppen. Die gleiche Wirkung auf MT^+ besaß ebenfalls nur das Filtrat von MT^- unterhalb der SST. Demnach muss es zwei verschiedene Zellzyklusarretierungspheromone ZAP^+ und ZAP^- geben, die auf den jeweiligen Paarungspartner wirken (Abbildung 25) (Quelle: Valerie Devos, unveröffentlichte Dissertation, Universität Ghent). Sie werden permanent von Zellen gebildet, deren Zellgröße die SST unterschreitet. Eine Ähnlichkeit zum System der Sex-induzierenden Pheromone ist deutlich erkennbar. Im folgenden Kapitel sollte nun herausgefunden werden, ob es sich bei ZAP^+ und SIP^+ bzw. ZAP^- und SIP^- um identische Moleküle handelt, oder ob die Induktion des Anlockvorganges und der Zellzyklusarretierung durch verschiedene Pheromonsysteme gesteuert werden. Des Weiteren sollte durch Strukturaufklärung untersucht werden, ob es sich bei den genannten Pheromonen ebenfalls um Diketopiperazine oder Diprolin-Derivate handelt und somit eine strukturelle Ähnlichkeit zum Lockstoff gegeben ist.

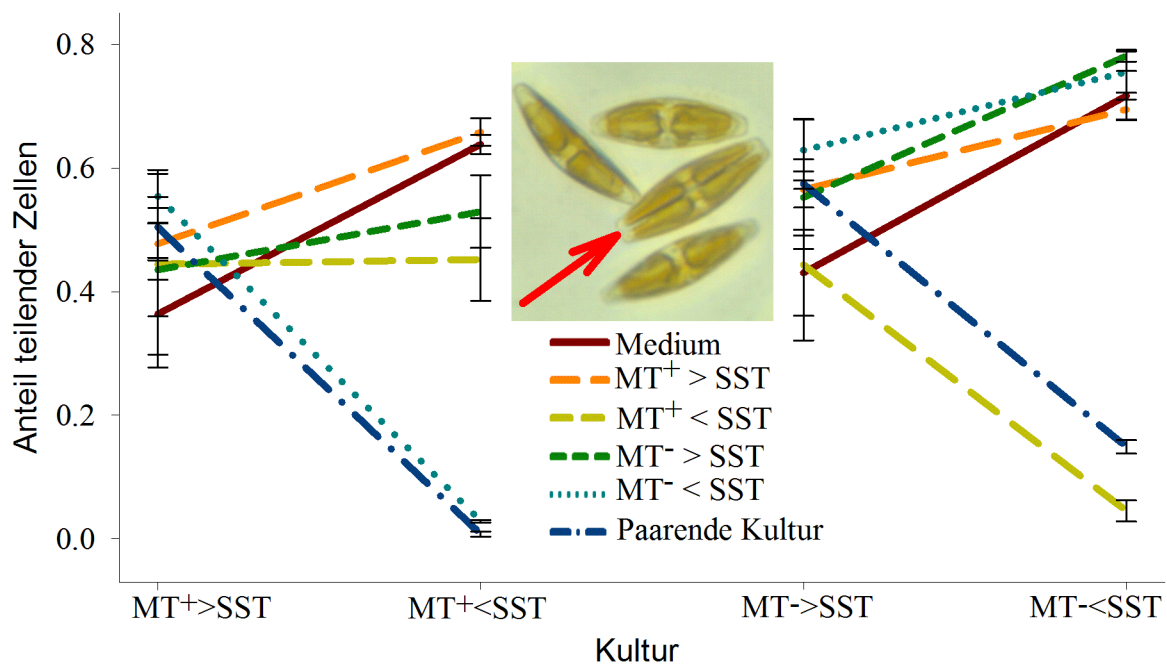


Abbildung 25: Zellzyklusarretierung in *S. robusta*. Anteil der mitotisch aktiven MT^+ und MT^- Zellen oberhalb und unterhalb der SST (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$), abhängig von der Inkubation mit zellfreiem Überstand von verschiedenen Kulturen, was durch die Linien angezeigt wird. Steriles Medium diente als Kontrolle. Der Pfeil zeigt eine mitotisch aktive Zelle (Quelle: Valerie Devos, unveröffentlichte Dissertation, Universität Ghent)

5.2. Identifizierung des SIP⁺-Kandidaten

Die Beantwortung der Frage nach der Identität von ZAP⁺/SIP⁺ bzw. ZAP⁻/SIP⁻ erforderte die Aufreinigung von zumindest einer dieser Substanzen. Zum Nachweis der Aktivitäten würde für alle vier Pheromone ein Bioassay zur Verfügung stehen: ZAP⁺ induziert die Zellzyklusarretierung in MT⁻ bzw. ZAP⁻ in MT⁺, SIP⁺ stimuliert die Diprolinbildung in MT⁻ und SIP⁻ initiiert die Wahrnehmungsfähigkeit von MT⁺ für Diprolin. Die Methodik zum Nachweis der Diprolininduktion durch Extraktion und Quantifizierung wurde bereits etabliert (siehe 3.6, S. 38). Durch die Bestimmung der Diprolinkonzentration kann die Beurteilung über die Präsenz von SIP⁺ mit höchstmöglicher Genauigkeit erfolgen. Für den Nachweis von SIP⁺ stand somit der genaueste und zuverlässigste Bioassay zu Verfügung, weswegen SIP⁺ als erstes der vier Pheromone identifiziert werden sollte.

Zunächst wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet, um eine optimale Methode zur Anreicherung von SIP⁺ aus dem MT⁺-Medium zu finden. Eine relative Quantifizierung von SIP⁺ erfolgte über das Ausmaß der Diprolininduktion in MT⁻. Diese Untersuchungen erfolgten von Eva Pfannerstill in der von mir angeleiteten Bachelorarbeit zum Thema der Identifizierung von SIP⁺ (Pfannerstill 2012). Dafür wurden drei verschiedene SPE-Methoden getestet. Dabei sind die Oasis[®] HLB und Chromabond[®] Easy Kartuschen für die Extraktion polarer Metabolite spezifiziert, wohingegen Chromabond[®] C18 Kartuschen für unpolare Verbindungen genutzt werden. Dabei erzielten C18 und HLB Kartuschen gleich gute Ergebnisse, wohingegen SIP⁺ mit Easy Kartuschen mit dem Standardprotokoll nicht extrahiert werden konnte (Abbildung 26). Letzteres kann dadurch erklärt werden, dass das Material einen Ionenaustauscher enthält. Die Elution der Kartuschen erfolgte nach dem Standardprotokoll mit Methanol, welches jedoch nur schwach geladene Verbindungen eluiert. Somit handelt es sich wahrscheinlich bei SIP⁺ um eine amphiphile Verbindung mit einem polaren Teil, der ionische und eventuell weitere, polare Funktionalitäten enthält. Das Vorhandensein eines apolaren

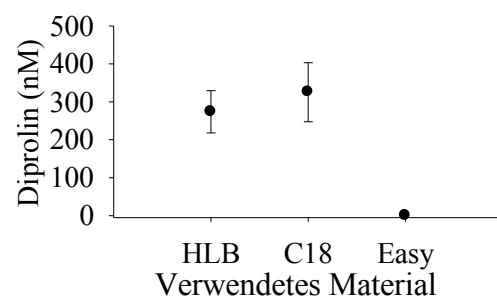


Abbildung 26: Methodenoptimierung.

Extraktion von SIP⁺ mit verschiedenen Kartuschen und Test der Aktivität durch Nachweis der Induktion der Diprolinbildung (Mittelwert ± Standardfehler, n = 3).

Strukturelements kann durch die Retardierung von SIP^+ auf C18 Kartuschen begründet werden. Aufgrund der guten Handhabbarkeit des HLB-Materials wurde dieses für alle weiteren Extraktionsschritte genutzt.

Nun wurde der Diprolin-Induzierungsassay genutzt, um die Retentionszeit des extrahierten SIP^+ im Chromatogramm einer RP-UPLC/MS Messung zu bestimmen. In der Bachelorarbeit von Pfannerstill (Pfannerstill 2012) wurde die Retentionszeit zwischen 1.4 – 1.7 min (entspricht 15% Acetonitril) bei einem Gradienten von 0 – 100% Acetonitril in zehn Minuten festgesetzt. Die Diprolinproduktion in MT^- konnte nur durch Fraktionen induziert werden, die in diesem Bereich gesammelt wurden (Abbildung 27a). Zusätzlich wurde das extrazelluläre Extrakt einer MT^- Kultur untersucht. Da sich der Metabolismus von zwei Paarungstypen innerhalb einer Spezies nur in wenigen, paarungsspezifischen Kriterien unterscheidet, ist davon auszugehen, dass die Metabolitenprofile von MT^+ und MT^- im kritischen Retentionszeitbereich nahezu gleich sind und der größte Unterschied zwischen den Profilen das Signal von SIP^+ sein könnte. Nun wurden die jeweils aufsummierten ESI-Massenspektren im negativen Ionisierungsmodus des MT^+ und MT^- Extraktes zwischen 1.4 – 1.7 min miteinander verglichen. Allerdings konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Einzig ein Signal mit einem $m/z = 842$ war nur im MT^+ Extrakt vorhanden (Abbildung 27b-c). Dieses Ergebnis konnte mehrmals repliziert werden. Demnach galt der Metabolit mit einem mutmaßlichen anionisierten Molekül $[\text{M-H}]^-$ bei $m/z = 842$ und einer Molekülmasse von 843 Da als Kandidat für SIP^+ . Die Verbindung zeigte keine Ionisierung im positiven ESI-Modus. Die Signalintensität war sehr gering und die Konzentration des Metaboliten in dem Extrakt für eine Strukturanalyse zu niedrig. Daher musste zunächst eine Möglichkeit gefunden werden, die SIP^+ -Produktion in MT^+ zu steigern.

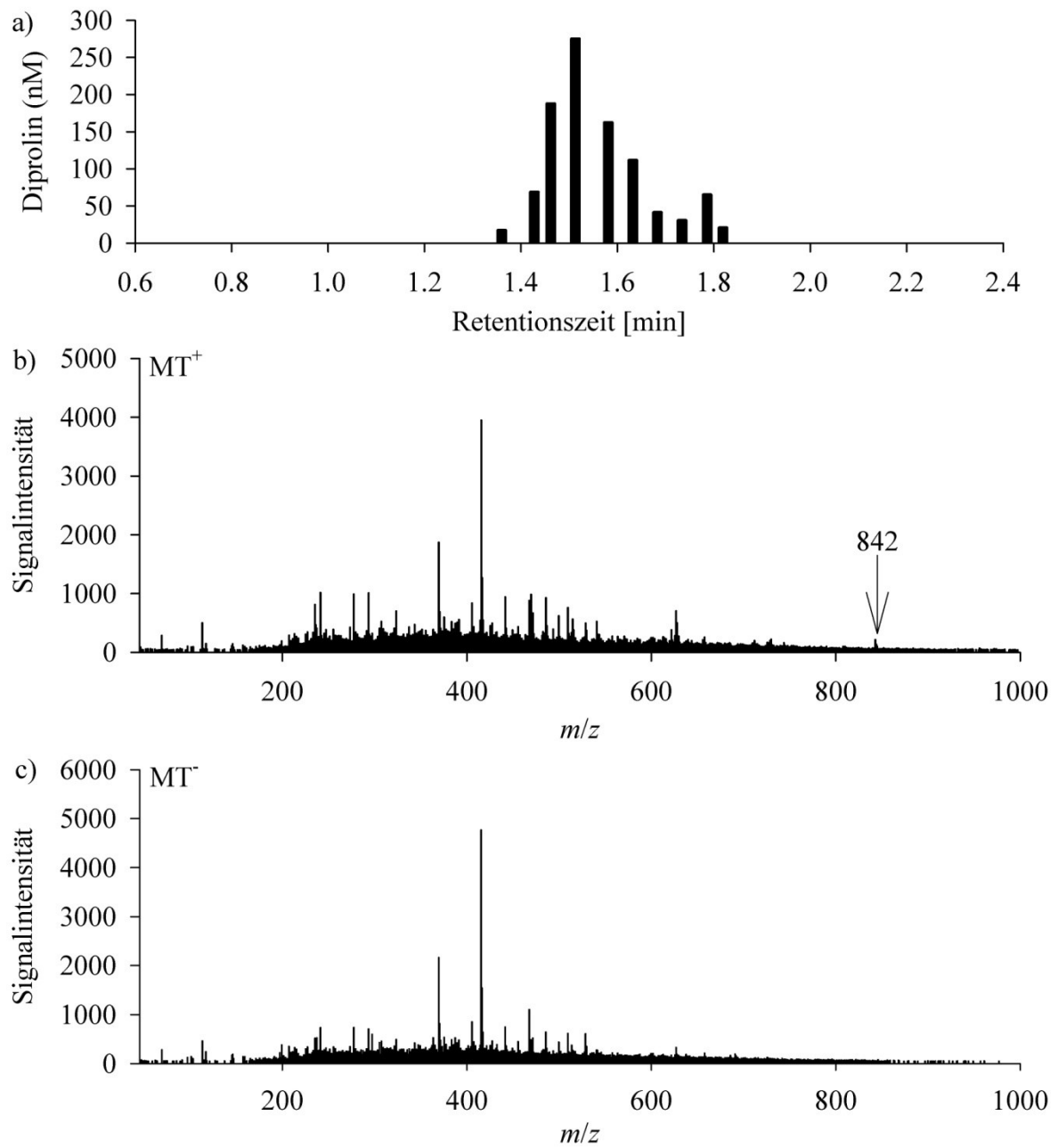


Abbildung 27: Identifizierung von SIP⁺. a) Induktion der Diprolinproduktion in MT⁻ durch verschiedene Fraktionen des MT⁺ Extrakts. Abgeändert nach (Pfanterstill 2012). b-c) Aufsummierte ESI (-) Massenspektren zwischen 1.4 – 1.7 min des MT⁺ Extrakts und der MT⁻ Kontrolle. Der Pfeil zeigt den SIP⁺-Kandidaten mit dem mutmaßlichen anionisierten Molekül [M-H]⁻ bei $m/z = 842$, welcher nur in MT⁺ vorhanden ist. Andere Unterschiede waren nicht reproduzierbar.

5.3. Anreicherung von SIP⁺

In den Diprolininduktion-Bioassays betrug die Zelldichte der MT⁻ Kultur etwa 25k – 50k Zellen/cm² Kulturfläche, die nach einer Kultivierungsdauer von zwei bis drei Tagen resultiert (siehe Abbildung 9, S. 25). Diese Zelldichte erwies sich stets als ideal, um die Diprolinproduktion in MT⁻ zu induzieren. Bei erhöhten Dichten, welche im Übergangsbereich der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase lagen (ca. 100k Zellen/cm²), konnte nahezu keine Diprolinproduktion mehr festgestellt werden. Daher wurde analog in allen vorherigen Experimenten für die Extraktion von SIP⁺ eine Dichte um 25k Zellen/cm² verwendet, wobei sich MT⁺ in der exponentiellen Wachstumsphase befand (siehe Abbildung 9, S. 25). Allerdings ergab eine größere Algenmenge eine bessere Ausbeute an SIP⁺. Die Aktivität des Extrakts stieg mit erhöhter Zelldichte an. In der Bachelorarbeit von Pfannerstill (Pfannerstill 2012) wurde herausgefunden, dass eine 1:500 Verdünnung des extrazellulären Extrakts einer MT⁺ Kultur mit 83k Zellen/cm² eine höhere Diprolinproduktion in MT⁻ induziert als eine 1/50 Verdünnung des Extrakts einer MT⁺ Kultur mit 35k Zellen/cm² (Abbildung 28a). Ebenso stieg die Konzentration des SIP⁺ Kandidaten mit einem mutmaßlichen Molekulargewicht von 843 Da in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen zwischen drei bis fünf Tagen Kultivierungsdauer an (Abbildung 28b). Die relative Menge des SIP⁺ Kandidaten wird dabei in Relation zu einem Signal mit einem $m/z = 441$ angegeben. Dabei handelt es sich um eine Verbindung, die auch im sterilen, algenfreien Kulturmedium vorkommt und deren Konzentration von den Algen wahrscheinlich nicht beeinflusst wird, weil dessen Signalstärke im Verlauf der Wachstumskurve konstant blieb. Da sie zudem eine ähnliche Intensität und Retentionszeit wie der SIP⁺-Kandidat aufweist, wird sie als Ersatz für einen internen Standard verwendet. In der stationären Wachstumsphase der Algen konnte eine Abnahme der Konzentration des SIP⁺-Kandidaten beobachtet werden, was auf einen Stopp der Produktion oder einen allmählichen Abbau der Substanz rückschließen lässt (Abbildung 28b).

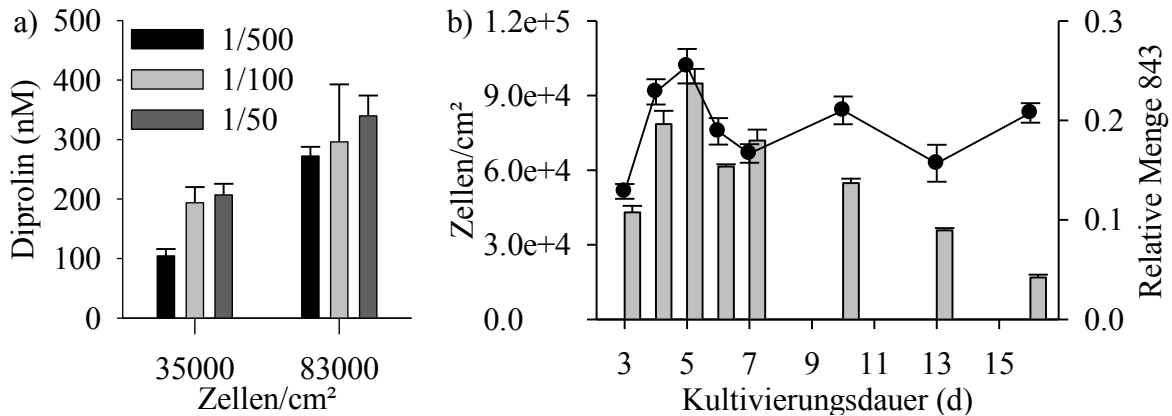


Abbildung 28: Anreicherung von SIP⁺. a) Diprolin-induzierende Aktivität verschiedener Verdünnungen des extrazellulären Extrakts, das von MT⁺ mit verschiedenen Zelldichten gewonnen wurde. Verändert nach (Pfanerstill 2012). b) Abhängigkeit der Zellzahl von *S. robusta* (Linie) und der Produktion des Metaboliten mit einer mutmaßlichen Masse von 843 Da (Balken). Die Menge ist relativ zu einem inhärenten Signal mit einer Masse von 441 Da angegeben (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$).

Es ergab sich eine optimierte Kultivierungsdauer von fünf Tagen bis zu einer Zelldichte von 100k Zellen/cm², was etwa den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase abdeckt (Abbildung 9, S. 25). Zudem wurde das Extraktionsprotokoll des MT⁺ Kulturmediums angepasst, da bei der HLB-SPE auch der Wasser-Durchlauf stets aktiv war. Ein Teil des SIP⁺-Kandidaten wird demnach nicht retardiert. Nach Anpassung des Verhältnisses von zu extrahierendem Medium zu HLB-Material von 3:1 auf 1:1 (Volumen Medium : Gewicht HLB-Material) wies der Durchlauf keine Aktivität mehr auf (Daten nicht gezeigt). Mit den angepassten Protokollen wurde nun der Vergleich zwischen MT⁺ und MT⁻ wiederholt. Zusätzlich wurden noch MT⁺ Zellen mit einer Zellgröße oberhalb der SST getestet, welche SIP⁺ nicht bilden. Das Fehlen des Signals mit $m/z = 842$ in diesen Extrakten würde dessen Kandidatenrolle als SIP⁺ verstärken. Tatsächlich war das Signal mit hoher Intensität nur in Extrakten von MT⁺ Zellen unterhalb der SST nachweisbar (Abbildung 29). Ein übergreifender metabolomischer Vergleich aller Extrakttypen zeigte sogar, dass der SIP⁺-Kandidat die größte Hochregulation aller Metabolite in MT⁺ unterhalb der SST im Vergleich zu MT⁻ unterhalb der SST und die zweithöchste verglichen mit MT⁺ oberhalb der SST aufwies (Abbildung 30a). Eine Hauptkomponentenanalyse der im negativen ESI-Modus aufgenommenen Exometabolome zeigt eine deutliche Gruppierung der Replikate gemäß ihres jeweiligen Stammes

(Abbildung 30b). Die Analyse der im positiven ESI-Modus gemessenen Exometabolome ergab eine weniger deutliche Trennung. Dies impliziert, dass sich vor allem der Stoffwechsel von sauren Metaboliten in den verschiedenen Geschlechtern unterscheidet.

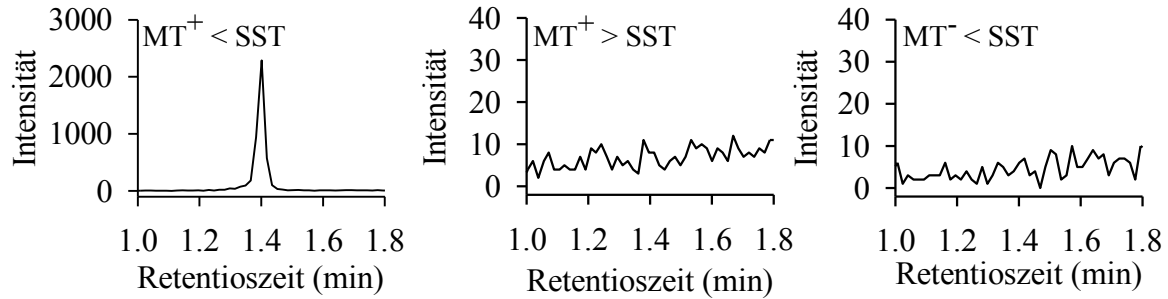


Abbildung 29: SIP⁺-Kandidat in verschiedenen Paarungstypen. LC/MS Analyse der HLB-SPE Extrakte. Dargestellt ist die Ionenspur $m/z = 842$ (anionisiertes Molekül des SIP⁺-Kandidaten).

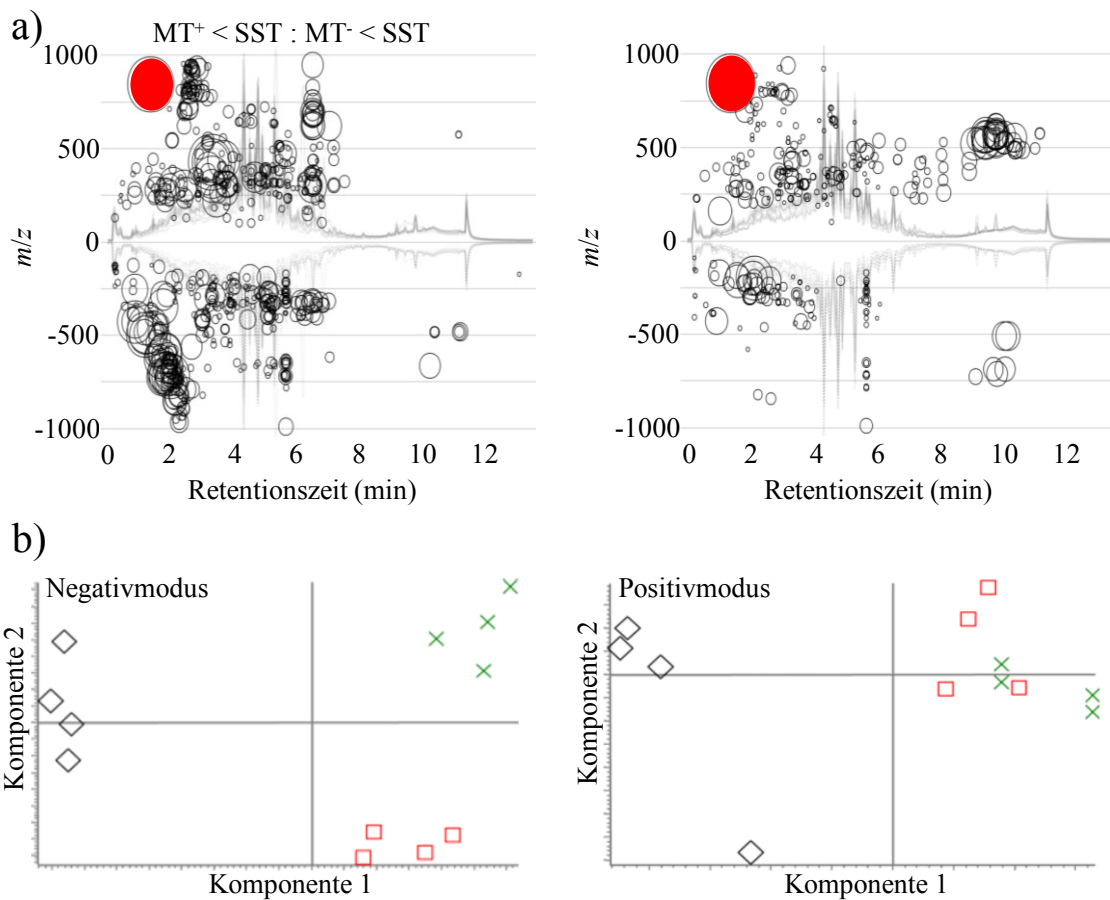


Abbildung 30: Metabolomische Analyse. a) Untersuchung von hoch- (positive Y-Achse) und herab- (negative Y-Achse) regulierten extrazellulären Metaboliten (dargestellt durch Kreise) in $MT^+ < SST$ verglichen mit $MT^+ > SST$ und $MT^- < SST$ in den Chromatogrammen, die mit UPLC/MS im negativen ESI-Modus aufgenommen wurden. Je größer der Radius des Kreises, desto größer sind die Intensitätsunterschiede der Metaboliten in den zwei Probenotypen. Die Y-Achse zeigt das m/z des Metaboliten, die X-Achse die dazugehörige Retentionszeit in den Chromatogrammen an. Der rot gefüllte Kreis zeigt das Signal mit $m/z = 842$. b) Hauptkomponentenanalyse der LC/MS-Messungen der im positiven und negativen Modus gemessenen Extrakte von $MT^+ > SST$ (schwarz), $MT^+ < SST$ (grün) und $MT^- < SST$ (rot).

5.4. Aufreinigung von SIP⁺

Die metabolomischen Analysen zeigten, dass sich der Stoffwechsel der zwei Paarungstypen und der verschiedenen physiologischen Zustände der *S. robusta* Zellen, anders als ursprünglich angenommen, nicht nur in wenigen, paarungstypspezifischen

Metaboliten unterscheidet. So ließen sich beispielsweise beim Vergleich von $MT^+ < SST$ mit $MT^- < SST$ 46 detektierte Metabolite finden, die in mindestens zehnfach höherer Konzentration in einem der beiden Paarungstypen vorkamen. Der SIP^+ -Kandidat mit dem mutmaßlichen Molekülgewicht von 843 Da stellte bei einer fünftägigen Wachstumszeit von MT^+ nicht mehr den einzigen Unterschied zu MT^- zur Retentionszeit von SIP^+ da. Um auszuschließen, dass ein mit dem SIP^+ -Kandidaten koeluiendes Molekül das eigentliche Pheromon SIP^+ ist, erfolgte eine Reinigung des SIP^+ -Kandidaten durch multi-dimensionale Chromatographie- und Extraktionstechniken.

Die vorherigen Ergebnisse mit den Easy-Extraktionskartuschen (siehe 5.2, S. 65) implizieren, dass SIP^+ mit einem Ionenaustauscher extrahierbar ist. Da der SIP^+ -Kandidat nur im negativen ESI-Modus detektierbar ist, ist die Gesamtladung des Moleküls bei neutralem pH-Wert wahrscheinlich negativ. Daher wurde ein starker Anionenaustauscher gewählt, um die Selektivität während des Extraktionsprozesses zu erhöhen. Mit dieser Methode konnten alle basischen und neutralen Substanzen abgetrennt werden. Die diprolininduzierende Aktivität war nur in der sauren Fraktion feststellbar (Abbildung 31). Bei der Fraktionierung mittels RP-UPLC/MS eluierte der SIP^+ -Kandidat erneut in der Fraktion, die als einzige Aktivität zeigte (Abbildung 31). Zur Erhöhung der Selektivität der chromatographischen Trennmethode wurde die Interaktion des SIP^+ -Kandidaten mit der stationären Phase erhöht, indem eine polare, zwitterionische Trennsäule zur hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) gekoppelt an ESI-MS verwendet wurde. Im Gegensatz zu NPLC kann hier auch eine wässrige mobile Phase verwendet werden. Dies erwies sich als notwendig, da die Löslichkeit des SIP^+ -Kandidaten bereits in Methanol stark verringert ist und er nicht in einem organischen Lösungsmittel auf die Säule aufgetragen werden kann. Der SIP^+ -Kandidat wurde nach 3.9 min Laufzeit (42% Wasser) fraktioniert und erneut mittels RP-UPLC/MS vermessen. Durch diese zweidimensionale Chromatographie ist ein höchstmögliches Maß an Reinheit erreichbar, da die Substanzen nach verschiedensten Eigenschaften wie Polarität und Ladung getrennt werden (Abbildung 31). Für RP-UPLC/MS wurde ein flacher Gradient genutzt, um die Interaktion des Metaboliten mit der stationären Umkehrphase zu erhöhen. Der SIP^+ Kandidat eluierte nach 4.8 min Laufzeit (6% Acetonitril) und wurde durch automatisierte Fraktionierung zwischen 4.7 min und 4.9 min abgetrennt (Abbildung 32a). Zusätzlich wurden alle Massenspektren, die zwischen 4.7 – 4.9 min gemessen wurden, kombiniert, um eine Übersicht über die in diesem Bereich eluierenden Substanzen zu erhalten. Dabei erwies sich das im negativen

ESI-Modus aufgenommene Massenspektrum als sehr rein. Der Molekülpeak des SIP^+ -Kandidaten bzw. dessen Addukte waren nahezu die einzig sichtbaren Signale. Im positiven ESI-Modus war die Anzahl der detektierbaren Signale höher. Es konnte sich jedoch bei keinem dieser Signale um SIP^+ handeln, da diese auch in einem Extrakt aus MT^- vorhanden waren (Abbildung 32b).

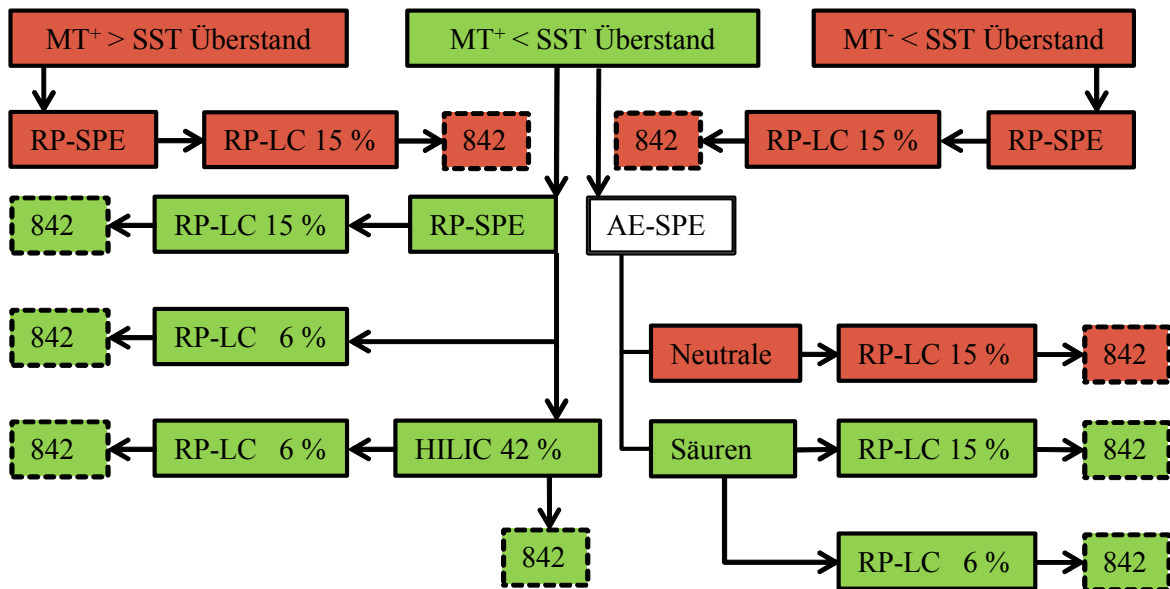


Abbildung 31: Protokoll zur Identifizierung von SIP^+ . Die Aufreinigung erfolgte durch eine Kombination von Festphasenextraktion (SPE) und Flüssigchromatographie (LC). Durchgezogene Rahmenlinien zeigen den Test des Algen-Überstandes, SPE-Extrakt oder LC-Fraktion in Diprolin-Induktionsassays an. Gestrichelte Rahmenlinien zeigen, ob das Signal mit $m/z = 842$ in der jeweiligen LC-Fraktion detektiert werden konnte. Eine grüne Füllung impliziert einen positiven Bioassay bzw. das Auffinden von dem Metaboliten in der entsprechenden Chromatographie. Eine rote Füllung zeigt ein negatives Ergebnis in den beiden Bereichen. RP = Umkehrphase, HILIC = hydrophile Interaktionschromatographie, AE = Anionenaustauscher

Zusätzlich wurden die den SIP^+ -Kandidaten flankierenden Bereiche (4.5 min – 4.7 min bzw. 4.9 min – 5.1 min) gesammelt (Abbildung 32a). Die drei Fraktionen wurden in verschiedenen Verdünnungen zu MT^- gegeben und die Diprolinproduktion gemessen. Dabei überstieg die biologische Aktivität der mittleren Fraktion sogar bei 100x erhöhter Verdünnung die Aktivität der flankierenden Bereiche (Abbildung 32c). Die diprolininduzierende Wirkung des Extrakts konnte nur auf den SIP^+ -Kandidaten

zurückzuführen sein. Die Kombination verschiedener Extraktions- und Chromatographietechniken zeigten, dass der Metabolit mit dem mutmaßlichen anionisiertem Molekül $[M-H]^-$ mit $m/z = 842$ das gesuchte Sex-induzierende Pheromon SIP^+ darstellt (Abbildung 31).

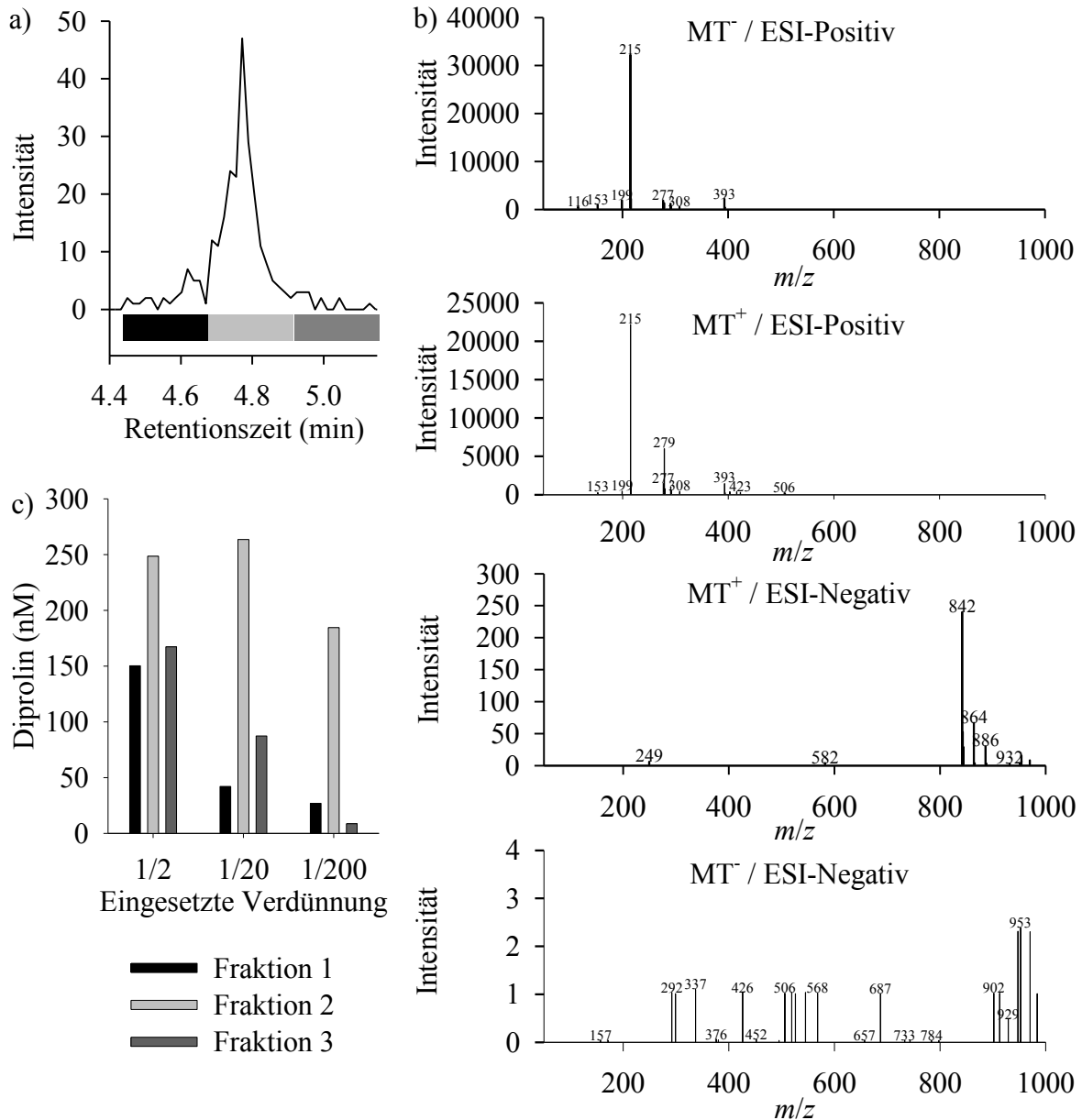


Abbildung 32: Aufreinigung von SIP^+ . a) Fraktionierung des SIP^+ Kandidaten und c) Test verschiedener Verdünnungen der Fraktionen im Diprolin-Induktionsassay von MT^- . b) Kombiniertes Massenspektrum zwischen 4.7 – 4.9 min der MT^- und MT^+ Extrakte in verschiedenen Ionisierungsmodi. Im Chromatogramm ist die Ionenspur $m/z = 842$ (anionisiertes Molekül des SIP^+ -Kandidaten) dargestellt.

5.5. SIP⁺ als Zellzyklusarretierungspheromon

Durch die Identifizierung von SIP⁺ konnte nun erforscht werden, ob SIP⁺ und der Zellzyklusarretierungsfaktor ZAP⁺ (siehe 5.1, S. 63) identisch sind. Dafür wurde in der Diplomarbeit von Julia Scharf (Scharf 2013) SIP⁺ aus dem MT⁺ Extrakt mittels RP-UPLC/MS durch Fraktionierung isoliert und zur Konditionierung von MT⁻ genutzt. Nach Belichtung erfolgte über einen Zeitraum von acht Stunden die Bestimmung der extrazellulären Diprolinkonzentration. Zusätzlich wurde die Anzahl der sich teilenden Zellen bestimmt. Zur Kontrolle wurde MT⁻ mit einer Fraktion konditioniert, die auf die gleiche Art wie SIP⁺ hergestellt, jedoch aus dem MT⁻ Extrakt gewonnen wurde. Die mit SIP⁺ behandelten Zellen begannen nach Belichtung erwartungsgemäß Diprolin zu bilden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Zellen sich nicht teilten und somit der Zellzyklus arretiert war. Im Gegensatz dazu produzierten die mit der Kontrolle behandelten Diatomeen kein Diprolin und führten Zellteilung durch (Abbildung 33). Da der einzige Unterschied zwischen der MT⁺-Fraktion und MT⁻-Fraktion im Vorhandensein von SIP⁺ bestand, musste der zellzyklusarretierende Effekt von SIP⁺ hervorgerufen werden. Dieses Pheromon ist demnach identisch mit ZAP⁺ und besitzt multiple Aufgaben bei der Steuerung der Sexualvorgänge in MT⁻. Im Gegensatz zu Diprolin wird SIP⁺ auch im Dunkeln gebildet (Daten nicht gezeigt). Gleiches ist für das noch unbekannte Pheromon SIP⁻ zu erwarten. Die Dunkelheit sorgt dafür, dass der Zustand des Zellzyklus beider Paarungspartner in der G1-Phase arretiert wird. Licht initiiert nun einen synchronisierten Start der sexuellen Vorgänge. Die Sex-induzierenden Pheromone besitzen die Aufgabe, die Arretierung des Zellzyklus während der Beleuchtung aufrechtzuerhalten. Daher ist es sinnvoll, dass diese Pheromone bereits im Dunkeln sekretiert werden. Würde die Produktion erst nach Beleuchtung beginnen, könnte nicht garantiert werden, dass die Signale den Paarungspartner vor der Initiierung der Synthese-Phase im Zellzyklus erreichen. In dem Fall könnte ein erfolgreicher Paarungsablauf nicht stattfinden.

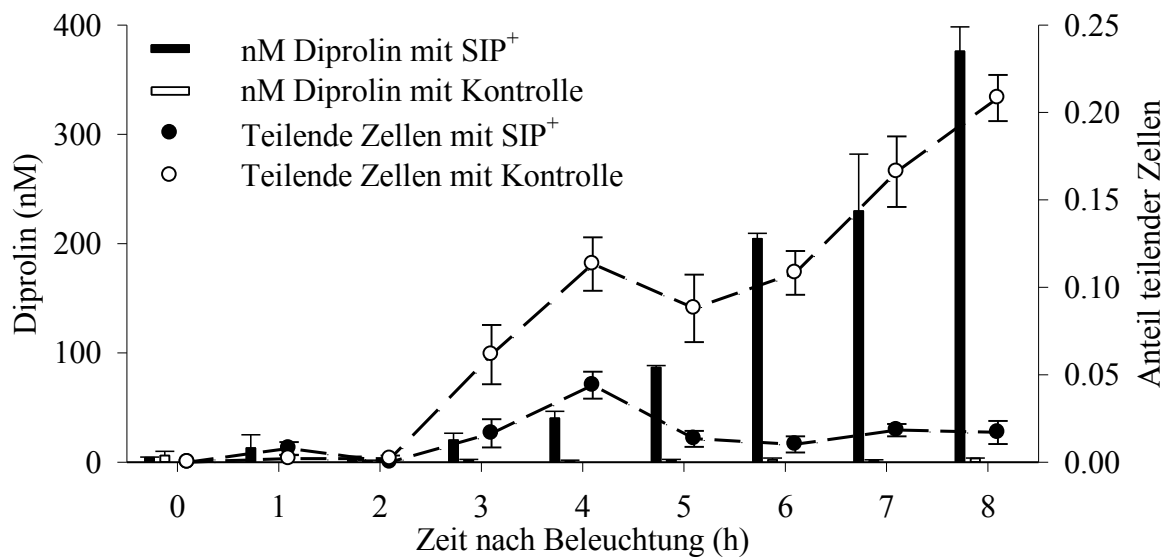


Abbildung 33: Wirkung von SIP⁺ als ZAP⁺. Bestimmung der Diprolin-Konzentration und Anteil der mitotisch-aktiven Zellen in einer MT⁻ Kultur, die mit SIP⁺ und einer Kontrolle behandelt wurden (Mittelwert ± Standardfehler, n = 3). Abgeändert nach (Scharf 2013).

5.6. Strukturanalyse

Um erste Strukturinformationen über SIP⁺ zu erhalten, wurde ein MS²-Spektrum der Substanz aufgenommen. Dafür wurde MT⁺ nach optimiertem Protokoll kultiviert (siehe 5.3, S. 68), extrahiert und der Metabolit mittels RP-HPLC fraktioniert. Dadurch konnte ein Großteil der Probenmatrix abgetrennt werden. Dies ermöglichte die Injektion einer zehnfach höheren Konzentration von SIP⁺ verglichen zu den Messungen der natürlichen Algenextrakte. SIP⁺ wurde nun mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) in einem qTOF-MS untersucht. Dies ergab ein komplexes MS²-Spektrum, wobei ein Fragment mit $m/z = 762$ detektiert werden konnte (Abbildung 34a). Ein Masseverlust von 80 impliziert häufig die Existenz einer SO₃ oder HPO₃-Gruppe. Zudem konnten zehn Verluste von H₂O (Masse 18, Anhang 6, S. 142) beobachtet werden, welcher typischerweise für das Vorhandensein von OH-Gruppen steht. Im MS¹-Spektrum von SIP⁺ ließen sich mehrere Natrium- und Kaliumaddukte des Molekülpeaks finden. Dies deutet auf die Existenz von mindestens fünf aziden funktionellen Gruppen hin (Abbildung 34b). Auch hierbei handelte es sich wahrscheinlich um die schwach aziden OH-Gruppen. Mehrfach geladene Molekülonen, die bei der Existenz von stark aziden Carboxylgruppen bzw. weiterer

Sulfat- oder Phosphatgruppen auftreten könnten, wurden nicht detektiert (Abbildung 34a). Eine MS²-Analyse im positiven ESI-Modus war nicht möglich, da das Molekülion bereits im MS¹-Spektrum im positiven Modus nicht detektiert werden konnte. Es konnten jedoch im MS¹-Spektrum einige zu SIP⁺ zuordenbare Fragmente (wie etwa $[M+H-80]^+ = 764$) und ein Addukt gemessen werden. Dies spricht für eine hohe Stoßaktivierung in der Ionenquelle und einen leichten Abgang der mutmaßlichen SO₃- oder HPO₃-Gruppe im positiven Modus. Da jedoch die Intensität der gemessenen Signale im positiven Modus sehr niedrig war, sind wahrscheinlich nur wenige alkalische Funktionalitäten wie verschiedene stickstoffhaltige Gruppen in SIP⁺ vorhanden, die eine gute Ionisierung des Moleküls im positiven Modus ermöglichen würden.

Die Bestimmung der Summenformel des Moleküls erforderte die Aufnahme der hochaufgelösten Masse des Molekülions. Jedoch wird bei ansteigender Masse die Vorhersage der korrekten Summenformel aus der exakten Masse zunehmend unsicherer. Zusätzlich kann die automatisierte Erstellung eines Fragmentierungsbaumes unter Zuhilfenahme des MS²-Spektrums die Bestimmung der richtigen Summenformel erleichtern (Bocker und Rasche 2008). Durch die Analyse der Fragmentverluste kann die Identität des Molekülions aus den Bruchstücken ermittelt werden. Außerdem können auch die Informationen des Isotopenmusters aus dem MS¹-Spektrum genutzt werden. Dies ermöglicht die Einschränkung der Prävalenz der Elemente des Molekülions, wie

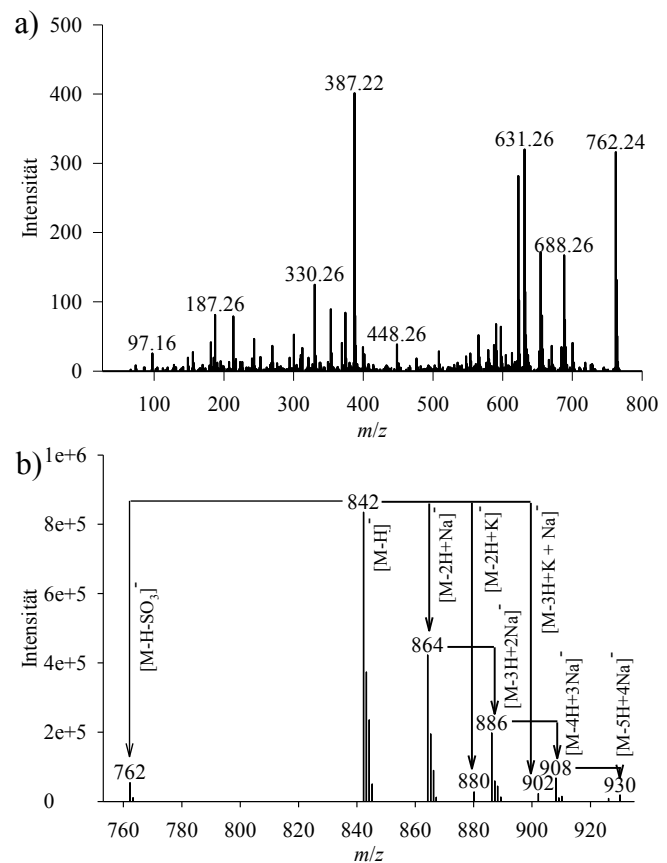


Abbildung 34: Strukturanalyse von SIP⁺. a) MS²-Spektrum von $[M-H]^- = 842$. b) Addukte des Molekülions in MS¹-Messung bei einer Kollisionsenergie von 10 eV.

beispielsweise der Anzahl der Kohlenstoffatome. Auch hierfür stehen automatisierte Methoden zur Verfügung (Dührkop *et al.* 2013). Die genannten Methoden erfordern die Bestimmung der exakten Masse aller Fragmente, des Molekülions und aller Isotope. Dafür wurde SIP⁺ in Kooperation mit Andrea Perner (HKI-Jena) mittels hochauflösender Orbitrap-MS vermessen. Für das Molekülion ergab sich im MS¹-Spektrum eine Masse von 842.2026. Im Gegensatz zur qTOF Messung konnten im MS²-Spektrum nur die vier folgenden Signale gemessen werden: 842.2015, 762.2448, 688.2447 und 631.2227. Die Intensität der letzten beiden Fragmente war sehr gering. Es konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob diese Signale Fragmente des Molekülions waren oder dem Rauschen zuzuordnen sind. Die Erstellung eines Fragmentierbaumes war aus den Messwerten nicht möglich. Es konnte jedoch aus Differenz zwischen dem Molekülion und dem ersten Fragment der MS²-Messung bereits eine Information gewonnen werden. Der exakte Masseverlust von 79.9567 Da weist zur exakten Masse von SO₃ nur eine Abweichung von 1.4 ppm auf (Abweichung zu HPO₃ = 120 ppm). Die Orbitrap-MS Messung bestätigt somit die vorige Annahme des Vorhandenseins einer SO₃-Gruppe. SIP⁺ ist somit höchstwahrscheinlich sulfatiert. Um weitere Strukturinformationen zur Erstellung eines Fragmentierbaumes zu erhalten, wurde SIP⁺ in Kooperation mit Marco Kai (MPI-Jena) an einem anderen Orbitrap-MS Gerät gemessen. Die MS¹-Messung ergab eine Masse von 842.2004 Da, bei der MS²-Messung konnten jedoch auch hier nur die vier Signale 842.2014; 762.2446; 688.2414 und 631.2216 detektiert werden. Auch hier konnte der Abgang der SO₃-Gruppe mit hoher Genauigkeit (0.182 ppm) verifiziert werden (Abweichung zu HPO₃ = 119 ppm). Die Erstellung eines Fragmentierbaums war mit den Messdaten nicht möglich. Daher wurde das Isotopenmuster des Molekülions genutzt, um die Vielfalt der möglichen Summenformeln einzuschränken. Dafür wurden die Werte genutzt, welche in Kooperation mit Andrea Perner aufgenommen wurden. Für das Molekülion 842.2015 wurden ausgehend vom gemessenen Isotopenmuster (M: 100%, M+1: 30%, M+2: 15%, M+3: 3%) folgende Parameter für die Prävalenz der Elemente in der Struktur festgelegt: Kohlenstoff 23-30; Wasserstoff 24-500; Stickstoff 1-10; Sauerstoff 5-40; Schwefel 1-2. Für das Fragment 762.2448 wurden die gleichen Parameter, abzüglich der SO₃-Gruppe, gewählt. Die wahrscheinlichsten Summenformeln für die gemessenen Massen des Molekülions und des Fragments sind in Tabelle 1 gezeigt. Dabei korrespondierten die nach den Masseabweichungen geordneten Vorschläge für die Summenformel des Mutterions und des Fragments. Den Unterschied des Vorschlags der

Summenformel zwischen Mutterion und Fragment machte bei jeder Platzierung die SO₃-Gruppe aus.

Tabelle 1: Ermittelte mögliche Summenformeln. Exakte Massen der vorgeschlagenen Summenformeln und deren Abweichung in ppm und mDa von den Messgrößen.

	842.2015				762.2448			
	Summenformel	Masse	ppm	Δ mDa	Summenformel	Masse	ppm	Δ mDa
1	C ₂₃ H ₄₂ N ₁₀ O ₂₀ S ₂	842.20183	0.386	0.325	C ₂₃ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₇ S	762.24501	0.276	0.211
2	C ₂₄ H ₄₈ N ₃ O ₂₅ S ₂	842.20183	0.392	0.33	C ₂₄ H ₄₈ N ₃ O ₂₂ S	762.24502	0.283	0.216
3	C ₃₀ H ₄₂ N ₄ O ₂₂ S	842.20114	0.428	-0.36	C ₃₀ H ₄₂ N ₄ O ₁₉	762.24433	0.623	-0.475
4	C ₂₅ H ₄₄ N ₇ O ₂₁ S ₂	842.20317	1.98	1.668	C ₂₅ H ₄₄ N ₇ O ₁₈ S	762.24635	2.038	1.553
5	C ₂₈ H ₄₀ N ₇ O ₂₁ S	842.19980	2.022	-1.703	C ₂₈ H ₄₀ N ₇ O ₁₈	762.24298	2.384	-1.817

Durch die Messung der exakten Masse wurden Summenformeln vorgeschlagen, die alle einen auffällig hohen Anteil an Sauerstoff besitzen. Dies unterstützt die Theorie, dass SIP⁺ eine polyhydroxylierte Substanz ist. Da die Vorschläge für die Summenformeln nicht durch einen Fragmentierbaum verifiziert werden konnten, wurde NMR-Spektroskopie als unterstützende Methode für die Bestimmung der Summenformel und zur Strukturaufklärung genutzt. Zur Anreicherung einer ausreichenden Menge der Substanz für die Messung (ca. 500 ng bei Aufnahme eines ¹H-Spektrums, Quelle: Persönliche Mitteilung von Bernd Schneider, MPI-Jena), wurde ein Protokoll zur großangelegten Aufreinigung von SIP⁺ entwickelt (siehe Methoden: 7.21, S. 114). Insgesamt konnten so 30 L MT⁺ Kultur in zwei Monaten fraktioniert werden. Die gesammelte Fraktion erwies sich als sehr aktiv und induzierte die Diprolinproduktion in MT⁻ im hohen Maße. Bei der Konditionierung von MT⁻ mit $1/10^6$ der aufgearbeiteten Menge von SIP⁺ konnte eine Diprolinkonzentration von 673 nM nachgewiesen werden. Bei Zugabe von $1/10^5$ der SIP⁺ Fraktion lag die induzierte Diprolinmenge sogar im mikromolaren Bereich (Anhang 7). Im Vergleich dazu konnte in einer paarenden Kultur, in der die MT⁺ Zellen die Diprolinproduktion in MT⁻ induzieren, nur eine maximale Diprolinkonzentration von 165 nM gemessen werden (siehe Abbildung 19, S. 41). Ebenso konnte SIP⁺ selbst bei der Injektion von $1/2000$ der Fraktion mittels ESI-MS problemlos detektiert werden (Anhang 7). Die NMR Messung wurde in Kooperation mit Bernd Schneider durchgeführt. Im ¹H-

Spektrum konnten chemische Verschiebung zwischen 6-8 ppm detektiert werden. Daher ist es möglich, dass in SIP^+ aromatischen Gruppen vorkommen (Abbildung 35). Allerdings reichte Qualität des Spektrums nicht aus, um weitere Strukturinformationen über SIP^+ zu finden. Für die Bestimmung der Summenformel und die weitere Strukturaufklärung mittels NMR wird somit eine weitere Anreicherung von SIP^+ nötig sein.

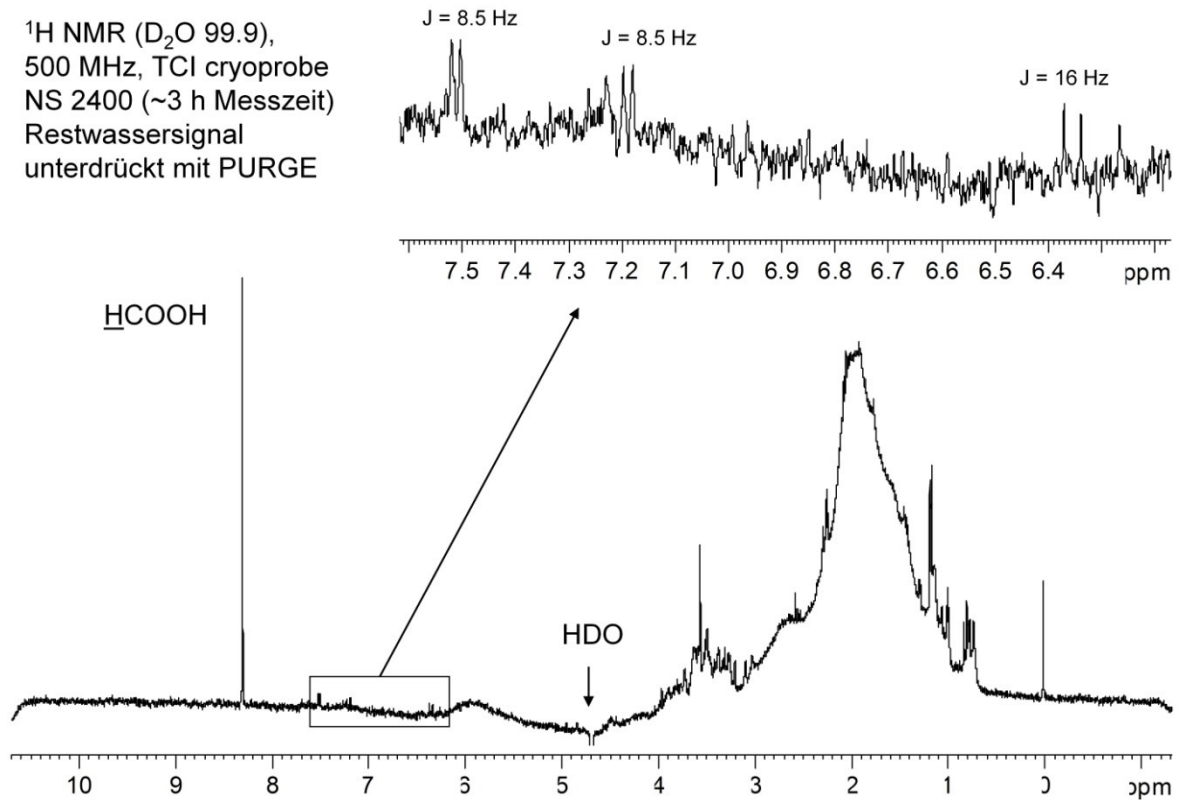


Abbildung 35: NMR-Messung der SIP^+ Fraktion. Die Aufnahme des ^1H Spektrums erfolgte in Deuteriumoxid für drei Stunden an einem 500 MHz Spektrometer mit einem TCI cryoprobe NS 2400 Probenkopf.

5.7. Strukturdiskussion

Der MT^+ Paarungstyp produziert das Sex-induzierende Pheromon SIP^+ , das die Sekretion von Diprolin in MT^- induziert, sowie den Zellzyklus der Zellen in der G1-Phase arretiert. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um eine amphiphile, polyhydroxylierte, stickstoffhaltige und sulfatierte Substanz mit einer Masse von $843.209 (\pm 0.001) \text{ Da}$. Sulfatierte Pheromone wurden bereits in verschiedenen aquatischen Lebewesen

nachgewiesen. So nutzen das Meerneunauge *Petromyzon marinus* (Hoye *et al.* 2007; Li 2002; Sorensen *et al.* 2005) und die Barbe *Barilius bendelisis* (Bhatt und Sajwan 2001) sulfatierte Steroide, um den Paarungspartner anzulocken. Die gleiche Substanzklasse wird von Seescheiden eingesetzt, um Spermien zu den Eiern zu locken (Yoshida *et al.* 2002). Ebenso werden sulfatierte Moleküle von einer Vielzahl von Organismen eingesetzt, um extrazelluläre Vorgänge zu steuern (Mougous 2006; Mougous *et al.* 2002). Das Knöllchenbakterium *Sinorhizobium meliloti* nutzt ein sulfatiertes Tetrasaccharid mit Lipid-Modifikationen, welches die Bildung von Wurzelknöllchen induziert (Roche *et al.* 1991). Sulfatierte Metabolite spielen demnach eine große Rolle als diffusible Überträger extrazellulärer Informationen und werden sowohl für intra- als auch interspezifische Kommunikation genutzt. SIP⁺ bewirkt ebenfalls verschiedene physiologische Antworten im Paarungspartner. Wenn die Strukturaufklärung das Vorhandensein einer Sulfatgruppe bestätigt, stellt SIP⁺ das bisher erste sulfatierte Pheromon dar, welches aus Mikroalgen isoliert werden konnte. Die Strukturaufklärung kann sich jedoch als große Herausforderung erweisen, da dieses Pheromon im Vergleich zu Diprolin in deutlich geringeren Mengen produziert wird. Während zwei Liter MT⁻ Kultur ausreichend war, um 100 µg Diprolin zu extrahieren, konnte aus 30 L MT⁺ Kultur keinerlei abwiegbare Mengen an SIP⁺ gewonnen werden. Dies erschwert die Anreicherung von SIP⁺ für die Aufnahme von eindeutigen NMR-Spektren. Eventuell muss hier eine Algenkultivierung im großen Maßstab in Aquakulturen erfolgen, um eine ausreichend große Menge des Pheromons für die Strukturaufklärung anzureichern. Das aufgereinigte SIP⁺ kann genutzt werden, um die Biosynthese des Diprolins aufzuklären. Dafür muss die Expression der hochregulierten Genprodukte (mRNA bzw. die daraus resultierende Proteine) in MT⁻ nach SIP⁺ Zugabe entweder durch quantitative Real-Time PCR oder durch Proteomik dokumentiert werden. Dies setzt allerdings voraus, dass SIP⁺ eine Hochregulation des diprolinproduzierenden Enzyms steuert und nicht andere, intrazelluläre Prozesse, welche die Diprolinfreisetzung induzieren, reguliert.

6. Vergleich des Pheromonsystems von *S. robusta* mit den Systemen der Grünalgen und Heterokontophyta

6.1. Diversität der Pheromone

Eine Schlüsselkomponente der Algenkommunikation stellt ihre Interaktion mit Individuen der eigenen Spezies durch Pheromone oder mit Individuen anderer Spezies durch Allelochemikalien dar. Die interspezifische Interaktion ist bereits gut erforscht. So gibt es Substanzen, die das Wachstum anderer Spezies beeinflussen, wenn sie in mutualistischen oder kompetitiven Verhältnissen zueinander stehen (Cembella 2003; Paul *et al.* 2009; Pohnert *et al.* 2007). Ebenso können sie zur Verteidigung gegen Herbivore dienen oder bei der Kommunikation mit Mikroorganismen eine Rolle spielen (Amin *et al.* 2012; Ianora *et al.* 2011; Roy *et al.* 2013). Wesentlich weniger Kenntnisse gibt es über die Pheromonchemie in der intraspezifischen Kommunikation. Die letzten umfassenden Übersichtsartikel über Algenpheromone wurden vor über 20 Jahren veröffentlicht (Jaenicke 1982; Maier 1993; Maier und Müller 1986). Die einzigen Taxa, in denen Pheromonstrukturen bekannt waren, sind mikroskopische Grün- und makroskopische Braunalgen sowie Oomyceten, die zusammen mit den Braunalgen und Diatomeen in die phylogenetische Gruppe der Heterokontophyta einzuordnen sind (Riisberg *et al.* 2009). Mit dem Diatomeenpheromon Diprolin aus *Seminavis robusta* wurde in dieser Arbeit ein weiteres Mikroalgenpheromon in den Heterokontophyta gefunden. Die in den Grünalgen und Heterokontophyta beschriebenen Pheromone werden durch verschiedene biochemische Wege gebildet. Dazu gehören die ribosomale Proteinproduktion, der Fettsäure Katabolismus, die Terpenoid-Synthese und wahrscheinlich die Nicht-Ribosomale Peptidsynthese. Die resultierende Strukturdiversität der Pheromone ist beeindruckend, da bereits das Molekulargewicht einen Bereich von kleinen Kohlenwasserstoffen und Aminosäuren zu großen Proteinkomplexen abdeckt. Ebenso weisen die Pheromone in den verschiedenen Gruppen extreme Polaritätsunterschiede auf. Es gibt neben wasserlöslichen, polaren Aminosäuren und sulfatierten Substanzen eher apolare, azyklische Diterpene und Steroide, sowie nahezu wasserunlösliche Kohlenwasserstoffe. Zusätzlich wurden auch mittelpolare plastochinon-Derivate und zyklische Dipeptide als Pheromone identifiziert (Abbildung 36). Die Polarität der Pheromone und Biochemie der Synthese unterscheidet sich sowohl innerhalb des Taxons der Heterokontophyta sowie in der polyphyletischen

Gruppe der Algen, welche als Gemeinsamkeit das wässrige Milieu als Lebensraum und die primär photosynthetische Lebensweise aufweisen.

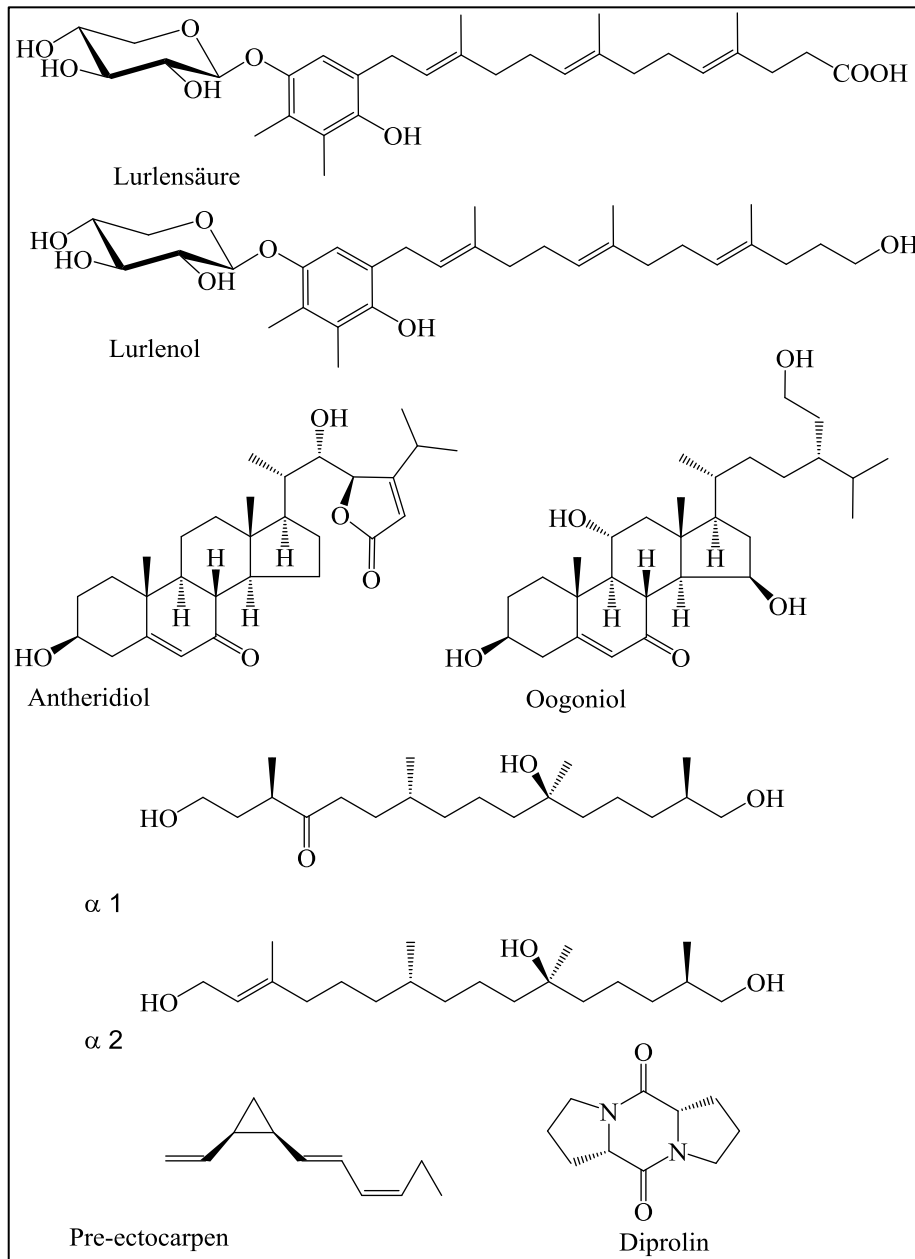


Abbildung 36: Pheromonstrukturen aus Grünalgen und Heterokontophyten. Die plastochinon-ähnlichen Lurlene a-b dienen als Lockstoff in verschiedenen *Chlamydomonas allensworthi* Isolaten. Die Steroide c-d induzieren die Gametangienbildung in *Achlya bisexualis*. *Phytophthora* nutzt die azyklischen Diterpene e-f zur Bildung von Oosporen. Der Kohlenwasserstoff g ist ein Beispiel für ein Braunalgenlockstoff von *Ectocarpus siliculosus*. Das Diketopiperazin h wird von *Seminavis robusta* als Lockstoff genutzt.

Die größte Anzahl an beschriebenen Pheromonstrukturen ist in Braunalgen verfügbar. Alle Pheromone der Braunalgen werden durch einen gemeinsamen Biosyntheseweg hergestellt. Dieser basiert auf der durch Lipoxygenasen vermittelten Umwandlung von Fettsäuren zu verschiedensten Kohlenwasserstoffen. Trotzdem ist die Vielzahl der verfügbaren aktiven Pheromone eingeschränkt, so dass mehrere Spezies und teilweise verschiedene Gattungen die gleichen Pheromone nutzen (Pohnert und Boland 2002). Scheinbar gab es während der Evolution der Braunalgen wenig Selektion für spezies-spezifische Pheromonsignale. Die Trennung der verschiedenen Arten muss daher durch andere Mechanismen wie Gametenerkennung, Habitatsunterschiede oder spezies-spezifische Synchronisierung der sexuellen Prozesse aufrechterhalten werden. Interessanterweise wird für die Oomyceten Gattung *Phytophthora* ebenfalls die Nutzung von universellen Sexpheromonen vermutet. Das Diatomeenpheromon Diprolin aus *S. robusta* ist ein unmodifiziertes Dipeptid aus einer proteinogenen Aminosäure. Es existieren zwei verschiedene *Seminavis* Isolate, in denen die Paarungstypen jeweils eines Isolats eine Paarungsgruppe bilden. Wenn kompatible Paarungstypen von zwei verschiedenen Paarungsgruppen gemischt werden, sinkt die Rate der Zygotenbildung um mindestens eine Größenordnung verglichen mit der Mischung kompatibler Paarungstypen der gleichen Paarungsgruppe. Dies und erste phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass es sich bei den Isolaten um verschiedene Stämme oder sogar unterschiedliche Arten handeln könnte (Quelle: Nicht publizierte Daten, persönliche Mitteilung von Pieter Vanormelingen, Universität Ghent). Beide Isolate produzierten jedoch Diprolin, wenn sie mit SIP⁺ oder dem Zellkulturüberstand von MT⁺ (unabhängig von der Paarungsgruppe) induziert wurden (Anhang 8, S. 143). Zusätzlich reagierten beide Paarungsgruppen auf Diprolin im Attraktionsbioassay (Quelle: Nicht publizierte Daten, persönliche Mitteilung von Christine Lembke). Für eine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse sind weitere Experimente sowie verlässliche phylogenetische Daten notwendig. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es sich bei Diprolin ebenfalls um ein universelles Pheromon in der Gattung *Seminavis* handeln könnte. Die reduzierte Paarungseffizienz zwischen den Paarungsgruppen kann durch andere Faktoren, wie verschiedene Oberflächenrezeptoren während des Paarungsprozesses, zustande kommen. Zusammengefasst erscheint es, dass die Pheromondiversität verschiedener Spezies einer Gattung innerhalb der Gruppe der Heterokontophyta teilweise gering ist und gelegentlich sogar identische Pheromone genutzt werden. In Grünalgen ist die Strukturdiversität innerhalb der Spezies bedeutend höher. Meist handelt es sich aber bei den Pheromonen um

strukturell verwandte Derivate. In verschiedenen Spezies der Gattung *Closterium* werden homologe Varianten des 18 kDa Glykoproteins als Sexpheromon genutzt, was die Evolution von spezies-spezifischen Pheromonen aus einem ursprünglichen *Closterium* Protein vermuten lässt (Fukumoto *et al.* 2005). Die Stufe der reproduktiven Isolation im *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Komplex kann teilweise durch Unterschiede in der Struktur und der physiologischen Aktivitäten der Sexpheromone erklärt werden (Tsuchikane *et al.* 2008). In *Volvox* existieren mindestens fünf Spezies, die Glykoproteine als Sex-induzierende Pheromone nutzen (Coleman 2012). Da teilweise geringe Kreuzaktivitäten der Glykoproteine in verschiedenen Spezies vorhanden sind, ist es auch hier möglich, dass die Glykoproteine strukturell verwandt sind. In *Chlamydomonas allensworthii* nutzen sogar verschiedene Isolate der gleichen Spezies unterschiedliche Lurlene als Lockstoffe.

6.2. Synchronisierung der Paarung

Um die Chancen einer erfolgreichen Paarung der freigesetzten Gameten, Gametangien oder Paarungspartner zu erhöhen, werden die sexuellen Prozesse oftmals synchronisiert. Ähnlich zur Pheromonchemie gibt es verschiedene Strategien mit unterschiedlichen Komplexitätsstufen, um diese Synchronisierung zu gewährleisten. Oftmals steuern Umwelteinflüsse wie erhöhte Temperaturen, der Salzgehalt oder Nährstoffmangel die Sexualisierung (Agrawal 2012). Umweltstress ist meist mit der Produktion von umweltresistenten Zygoten verknüpft. In diesen Fällen dient Sex nicht nur zum Erhalt der genetischen Vielfalt, sondern auch zum Überleben ungünstiger Bedingungen. Diese Strategie ist bei Grünalgen und Oomyceten verbreitet, aber in Ausnahmefällen auch in Kieselalgen zu beobachten (Edlund und Stoermer 1997; Agrawal 2012). In den meisten Braunalgen und Diatomeen werden nach der Paarung keine umweltresistenten Zygoten gebildet. Dennoch ist die sexuelle Reproduktion ein obligater Schritt zur Vollendung des Lebenszyklus in diesen Organismen. Auch hier erfolgt die Synchronisierung oftmals über externe Signale aus der Umwelt. So wird beispielsweise die Gametenfreisetzung in fucoiden Braunalgen wie *Fucus ceranoides* von semilunaren Zyklen und den Gezeiten gesteuert (Brawley 1992). Die Befruchtungschance wird erhöht, wenn turbulente Wasserströme während des Paarungsprozesses vermieden werden (Pearson 2006). Um die Verschwendung von ungepaarten Gameten zu verringern, können sich die Zellen der Braunalgen teilweise auch parthenogenetisch zu einem Sporophyten entwickeln (Coelho *et*

al. 2012). In vielen centrischen Diatomeen kann, sobald die Zellgröße die SST unterschritten hat, die Gametogenese unter günstigen Umweltbedingungen spontan induziert werden (Chepurnov *et al.* 2008).

Als Schlüsselsignalgeber der Synchronisierung dient oftmals Licht, wobei eine hohe Intensität die Photosyntheserate und damit den Aufbau von Reservestoffen fördert, welche zur sexuellen Reproduktion benötigt werden (Agrawal 2012). So findet beispielsweise die Gametenbildung in der Gelbgrünen Alge *Vaucheria sessilis* (ebenfalls den Heterokontophyten zuzurechnen) unter kontinuierlicher Beleuchtung häufiger statt, als unter wechselnden Dunkelheit-Licht-Zyklen (Starr 1960). Oftmals spielt aber auch die Photoperiode eine wichtige Rolle zur Synchronisierung des Zellzyklus. So bewirkt Dunkelheit eine Arretierung in der G1-Phase in den raphiden Pennales *Seminavis robusta* (Gillard *et al.* 2008) und *Cylindrotheca closterium* (Vanormelingen *et al.* 2013). Nach anschließender Beleuchtung werden die sexuellen Vorgänge induziert. In den Fällen, wo Licht nicht als Energielieferant, sondern als Signalgeber dient, kann sogar dauerhafte Beleuchtung zu einer drastisch verringerten Paarungshäufigkeit führen, wie beispielsweise in der raphiden Pennales *Haslea ostrearia* (Mouget *et al.* 2009). Die lichtabhängige sexuelle Reproduktion spielt generell bei photosynthetisch aktiven Organismen eine große Rolle und ist auch in den Grünalgen *Chloromonas* (Hoham *et al.* 2000), *Closterium ehrenbergii* (Fukumoto *et al.* 1998) und *Volvox carpensis* (Starr 1980), sowie in der Braunalge *Saccharina latissima* (Hsiao und Druehl 1973) zu beobachten. Neben Licht werden auch Sex-induzierende Pheromone zur Synchronisierung des Paarungsablaufs eingesetzt. Damit wird sichergestellt, dass Gameten erst dann produziert werden, wenn beide Paarungspartner anwesend sind. Die araphide Pennales *Pseudostaurosira trainorii* nutzt zur Synchronisierung ausschließlich einen lichtunabhängigen Pheromon-Feedback Mechanismus. Dabei steuert ein Paarungstyp die Sexualisierung des Partners über ein Pheromon, woraufhin dieser ein zweites Pheromon sekretiert, welches wiederum die Sexualvorgänge des ersten Partners induziert. Solche Mechanismen sind weit verbreitet und auch in Grünalgen wie *Closterium* und in Oomyceten zu finden. In *Achlya bisexualis* weisen die Sex-induzierenden Pheromone hohe strukturelle Ähnlichkeiten auf. In *Phytophthora* ist wahrscheinlich ein Pheromon sogar der direkte Vorläufer des zweiten Pheromons. In vielen Braunalgen werden die männlichen Gameten erst nach der Wahrnehmung von sogenannten "release factors" freigesetzt. Beispielsweise handelt es sich dabei in *Laminaria digitata* um einen epoxidierten

Kohlenwasserstoff, welcher mit dem von den weiblichen Gameten eingesetzten Lockstoff strukturell verwandt ist (Müller *et al.* 1979; Maier und Müller 1982). Die Beispiele zeigen, dass in den Heterokontophyta oftmals strukturell verwandte Sex-induzierende Pheromone und/oder Lockstoffe genutzt werden. Im Gegensatz dazu sind das in dieser Arbeit identifizierte Sex-induzierende Pheromon SIP⁺ und der Lockstoff Diprolin in der Diatomee *Seminavis robusta* strukturell völlig verschieden. Zudem unterliegen die Sex-induzierenden Pheromone keinem Feedback-Mechanismus sondern werden unabhängig voneinander produziert. Das Paarungssystem dieser Diatomee beinhaltet dunkelheitsbedingte Zellzyklusarretierung, den lichtabhängigen Beginn der sexuellen Vorgänge, die Pheromon induzierte Zellzyklusarretierung bei Belichtung, sowie die Pheromon vermittelte Chemoattraktion. Durch die Kombination von Umweltreizen und Pheromonen wird in dieser Alge ein Höchstmaß an Synchronisierung erreicht. Die erhöhten Kosten, welche für die Produktion von drei Pheromonen aufgewendet werden müssen, werden wohl dadurch kompensiert, dass eine hohe Paarungseffizienz erzielt und damit der Verlust von Gameten vermieden wird (Abbildung 37).

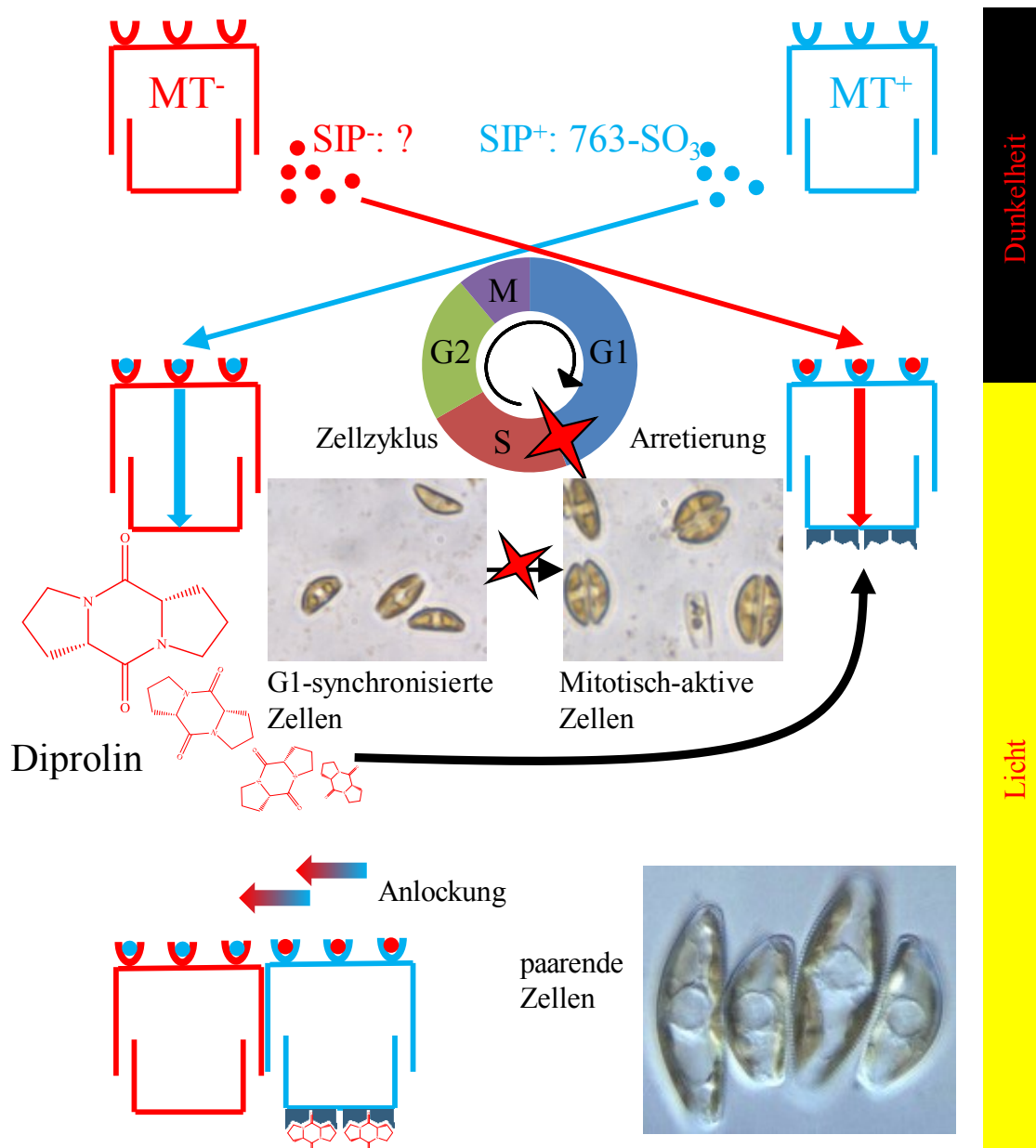


Abbildung 37: Das Pheromonsystem von *Seminavis robusta*. Dunkelheit arretiert den Zellzyklus in der G1-Phase, zudem produzieren beide Paarungstypen Sex-induzierende Pheromone (SIP). Nach Beleuchtung halten diese die Zellzyklusarretierung aufrecht und SIP⁺ induziert die Produktion des Lockstoffs Diprolin in MT⁻ sowie SIP⁻ eines mutmaßlichen Diprolin-Rezeptors in MT⁺. MT⁺ migriert entlang eines Diprolin-Gradienten zu MT⁻ und die Zellen paaren sich.

6.3. Schlussfolgerung

Mikroalgen haben einen bedeutenden Einfluss auf weltweite Prozesse wie den Kohlenstoffzyklus und die Sauerstoffproduktion, da sie für etwa 50% der globalen Kohlenstofffixierung verantwortlich sind (Falkowski 1998; Field 1998; Sabine 2004). Durch ihre hohen Reproduktionsraten spielen sie auch in biotechnologischen Prozessen wie der Biodieselproduktion eine große Rolle (Li *et al.* 2008). Die Erforschung intra- und interspezifischer Algensignalwege bietet nicht nur fundamentale Einblicke in die Lebenszyklen und Physiologie, sondern könnte auch neue Möglichkeiten zur Manipulation des Wachstums in Aquakulturen bieten. Da die genetische Rekombination ein Hauptfaktor für fortschreitende Evolution in Lebewesen ist und eine Anpassung der Spezies an sich ändernde Umweltbedingungen ermöglicht, ist die Erforschung der regulativen Prozesse während der sexuellen Reproduktion essentiell zum Verständnis dieser Vorgänge. Durch den Einsatz von verbesserten Massenspektrometrie- und Chromatographietechniken werden metabolische Analysen sensitiver, was ein umfassendes Screening nach Algenpheromonen in allen Algengruppen ermöglichen wird. Das Vorhandensein eines zuverlässigen Bioassays zum Nachweis der Pheromone zur Unterstützung der metabolischen Techniken wird jedoch immer eine Voraussetzung zur erfolgreichen Strukturaufklärung bleiben. Durch die Vielzahl der beschriebenen Allelochemikalien gelten Algen bereits jetzt als vielversprechende Quelle für neue Naturstoffe (Sasso *et al.* 2012; Roy *et al.* 2013; Sieg *et al.* 2011; Poulson *et al.* 2009). Durch eine voranschreitende Pheromonforschung können neue bioaktive Substanzen mit potenzieller pharmazeutischer Anwendung entdeckt werden. So kann beispielsweise ein Analogon der Steroidpheromone Antheridiol und Oogoniol die Neurogenese stimulieren und stellt damit ein mögliches Arzneimittel für Neuronen-Ersatztherapien dar (Lecanu *et al.* 2012). Diketopiperazine wie Diprolin besitzen ebenfalls hohes pharmakologisches Anwendungspotential mit ihren antibakteriellen, antifungalen sowie tumorhemmenden Funktionen (Martins und Carvalho 2007; Borthwick 2012), die auch einen Einsatz in der Krebsforschung möglich machen (Graz *et al.* 2000).

7. Materialien und Methoden

7.1. Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion wurden verschiedene SPE-Kartuschen unter Vakuum mit dem jeweiligen angegebenen Medium beladen. Die Beladungsgeschwindigkeit betrug stets 1 ml/min. Dafür wurden folgende Materialien mit verschiedenen Füllmengen genutzt:

- HLB: N-Vinylpyrrolidon-Divinylbenzol-Copolymer (Oasis[®], Waters, Eschborn, Deutschland): Verwendete Größen: 3 ml/60 mg, 6 ml/200 mg, 35 ml/6000 mg.
- MAX: mit quartären Aminogruppen modifiziertes HLB-Material (Oasis[®], Waters, Eschborn, Deutschland): Verwendete Größe: 3 ml/60 mg
- C18: mit C18-Ketten modifiziertes Silikagel nach dem Umkehrphaseprinzip (Sep-Pak[®] Plus C18, Waters, Eschborn, Deutschland): Verwendete Größe: 3 ml/500 mg
- Easy: bifunktionell modifiziertes Polystyren-Divinylbenzenharz (Chromabond Easy[®], Macherey-Nagel, Düren, Deutschland): Verwendete Größe: 3 ml/60 mg

Die Konditionierung der Kartuschen vor dem Beladen mit Medium erfolgte entsprechend den Gebrauchsanweisungen des Herstellers.

7.2. UPLC/MS

Für UPLC/MS wurde ein “ultra-performance liquid chromatography“ System mit einem “time of flight“ Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (Acquity UPLC[®] / Q-ToF micro Waters, Manchester, UK) genutzt. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet.

RP-UPLC/MS (Methoden 1,9,11 und 13) erfolgte mit einer Acquity UPLC BEH C₁₈ Säule (2.1 x 50 mm, 1.7 µm, Waters, Eschborn, Deutschland). Folgende Lösungsmittel wurden genutzt: A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure und 2% Acetonitril, B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure.

Chirale HPLC/MS (Methode 5) erfolgte am UPLC/MS-System mit einem Nucleodex[®] Screening Kit mit α-, β- und γ-Nucleodex Kartuschen (4 mm ID x 30 mm x 5 µm PS, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Folgendes Lösungsmittel wurde genutzt: Wasser.

HILIC-HPLC/MS (Methode 10) erfolgte am UPLC/MS System mit einer SeQuant® ZIC®-HILIC HPLC Säule (150 x 2.1 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Folgende Lösungsmittel wurden genutzt: A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure und 2% Acetonitril, B: Wasser mit 5 mM Ammoniumacetat und 90% Acetonitril.

Alle Lösungsmittel entsprachen ULC/MS Qualität (Biosolve).

Methode 1: Metabolomische Identifizierung von Diprolin und Koinjektion des Diprolins und der Syntheseprodukte

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv	
0	0	Massenbereich	40 – 1000 <i>m/z</i>
6.5	100	Scanzeit	0.48 Scans/Sek
7.5	100	Scanverzögerung	0.15 Sek
8	0	Kollisionsenergie	5 eV
9	0	Konusspannung	25 V
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Konugasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 5: Chirale Analyse von Diprolin mit Cyclodextrinen

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% A	Ionisierung ESI-Positiv	
0	100	Massenbereich	40 – 1000 <i>m/z</i>
5	100	Scanzeit	0.56 Scans/Sek
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Scanverzögerung	0.04 Sek
		Kollisionsenergie	5 eV
		Konusspannung	25 V
		Konugasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 9: Fraktionierung und metabolomische Analyse von SIP⁺

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv/Negativ	
0	0	Massenbereich	50 – 1000 <i>m/z</i>
10	100	Scanzeit	0.9 Scans/Sek
11	100	Scanverzögerung	0.1 Sek
11.1	0	Kollisionsenergie	0 eV
13.5	0	Konusspannung	25 V
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 10: Aufreinigung von SIP⁺ mittels HILIC-HPLC/MS

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Negativ	
0	100	Massenbereich	50 – 1000 <i>m/z</i>
1	100	Scanzeit	0.9 Scans/Sek
5.5	20	Scanverzögerung	0.1 Sek
6.1	100	Kollisionsenergie	0 eV
10	100	Konusspannung	25 V
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 11: Aufreinigung von SIP⁺ mittels RP-UPLC/MS

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv/Negativ	
0	0	Massenbereich	50 – 1000 <i>m/z</i>
8	10	Scanzeit	0.9 Scans/Sek
8.5	100	Scanverzögerung	0.1 Sek
9.5	100	Kollisionsenergie	0 eV
9.6	0	Konusspannung	25 V
12	0	Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 13: MS² Analyse von SIP⁺

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv/Negativ	
0	0	Produkt-Ionen-Analyse von 842	50 – 1000 <i>m/z</i>
3	30	Scanzeit	0.9 Scans/Sek
3.5	100	Scanverzögerung	0.1 Sek
4	100	Kollisionsenergie	30 eV
4.1	0	Konusspannung	25 V
6	0	Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
Flussgeschwindigkeit	0.6 ml/min	Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

7.3. GC/MS

Für GC/TOF-MS (Methoden 2 und 6) wurde ein “GCT Premier™ gas chromatograph” mit orthogonaler Beschleunigung im TOF-Massenspektrometer verwendet (Waters, Manchester, UK). Für GC/q-MS (Methode 4) wurde ein ISQ Trace GC-Ultra GC-MS System (Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland) genutzt. Als Trennsäule diente für beide Geräte eine 0.25 mm x 30 m DB-5MS + DG Kapillarsäule (Agilent, Böblingen, Deutschland) (Methode 2,4). Die Chirale Trennung (Methode 6) erfolgte am GC/TOF-MS System mit einer Cyclodextrin-Säule, bei der die stationäre Phase aus nicht-gebundenen

10.5% β -Cyclodextrin in 14% Cyanopropyl-Phenyl / 86% Methylpolysiloxan zusammengesetzt ist.

Helium 5.0 (Linde AG, Pullach, Deutschland) wurde als Trägergas genutzt.

Method 2: Identifizierung von Diprolin in *S. robusta* und *P. citrinopileatus*, sowie Koinjektion des Algenpheromons und der Synthese

GC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	°C	EI-MS / CI-MS	
0	50	Massenbereich	33 und 800 m/z
3	50	Scanzeit	0.5 Scans/Sek
19.67	300	Scanverzögerung	0.1 Sek
22.67	300	EI	70 eV
Splitless Injektion	250	Reaktandgas bei CI	Methan
Flussgeschwindigkeit	1 ml/min		

Method 4: Trennung von Diprolin und dessen Diastereomer, Quantifizierung von Diprolin in extrazellulären SPE-Extrakten

GC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	°C	EI-MS	
0	155	Massenbereich	50 und 200 m/z
3	155	Scanzeit	0.5 Scans/Sek
5.2	210	Scanverzögerung	0.04 Sek
11.6	255	EI	70 eV
14	315		
17	315		
Split 10 Injektion	300		
Flussgeschwindigkeit	1.2 ml/min		

Methode 6: Chirale Analyse von Diprolin mit Cyclodextrinen

GC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	°C	EI-MS	
0	180/200/210/220/230	Massenbereich	50 und 800 <i>m/z</i>
60	180/200/210/220/230	Scanzeit	0.19 Scans/Sek
Split 10 Injektion	250	Scanverzögerung	0.01 Sek
Flussgeschwindigkeit	1 ml/min	EI	70 eV

7.4. HPLC

Für präparative HPLC (Methode 3) wurde ein LC-8A-System (Shimadzu) und eine präparative LiChroCart Purospher Star RP-18 (250 mm x 10 mm, 5 µm) HPLC-Säule (Merck) mit folgenden Lösungsmitteln genutzt: A: Wasser mit 2% Methanol, B: Methanol. Als Detektor diente ein SPD-10AV UV/Vis-Detektor (Shimadzu).

Für RP-HPLC/MS (Methode 12) wurde ein Agilent 1100 Chromatograph (Agilent, Böblingen, Deutschland) mit einem API 3000 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) Triple-Quadrupol Massenspektrometer genutzt. Als Kollisionsgas diente Stickstoff. Zur Trennung wurde eine Zorbax Eclipse XDB C8 (150 mm x 2.1 mm, 5 µm, Agilent, Böblingen, Deutschland) analytische HPLC-Säule genutzt. Als Lösungsmittel dienten: A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure und 2% Acetonitril, B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure.

Alle Lösungsmittel entsprachen HPLC Qualität (VWR, Darmstadt, Deutschland).

Methode 3: Präparative Fraktionierung des natürlichen und synthetischen Diprolins

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	UV-vis	
0	2	Lampentyp	Deuterium
10	100	Wellenlänge	220 nm
14	100	Response	1 Sek
14.1	2		
15.1	2		
Flussgeschwindigkeit	6 ml/min		

Methode 12: Präparative Fraktionierung von SIP⁺ für NMR

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Negativ	
0	0	MRM	842 - 762 <i>m/z</i>
25	12.5	Scanzeit	0.5 Scans/Sek
27	100	Scanverzögerung	0.05 Sek
31	100	Kollisionsenergie	30 eV
33	0	Desolvationsgasfluss	480 L N ₂ /h
38	0		
Flussgeschwindigkeit	1 ml/min		

7.5. SFC/MS

Für SFC/MS wurde ein “ultra-performance convergence chromatography system” mit einem Triplequadrupol-MS mit Elektrospray-Ionisierung (Acquity UPC²™/ Xevo TQD, Waters, Eschborn, Deutschland) genutzt. Für das Standard-Screening Programm wurden die Säulentypen Chiralpak[®] IA, IB, IC und ID (4.6 mm ID x 100 mm x 3 µm PS, Chiral Technologies Europe, Illkirch-Cedex, Frankreich) verwendet. Die Säulen enthielten folgende Phasen: IA: Amylose *tris* (3,5-dimethylphenylcarbamate); IB: Cellulose *tris* (3,5-dimethylphenylcarbamate); IC: Cellulose *tris* (dichlorophenylcarbamate), ID: Amylose *tris* (3-chlorophenylcarbamate). Die Säulentemperatur betrug 40°C. Nach Methodenoptimierung wurde der Säulentyp ID verwendet. Als mobile Phase diente

überkritisches Kohlenstoffdioxid mit einem System-Gegendruck von 1500 psi. Als Modifier im Eluenten "B" dienten jeweils Methanol, Acetonitril oder 2-Propanol (Methode 7). Nach Methodenoptimierung (Methode 8) wurde 2-Propanol als Modifier genutzt. Für die Proben der Pheromonkinetik wurde in Methode 8 dem Modifier zusätzlich 0.1% Ameisensäure zugesetzt. Dies gewährleistete eine bessere Ionisierung von Diprolin, damit auch geringe Stoffmengenkonzentrationen detektiert werden konnten.

Methode 7: Methodenoptimierung für die chirale Trennung des synthetischen Diprolins

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv	
0	5	SIM	195 <i>m/z</i>
4	40	Dwell-Time	80 msec
5	40	Scanverzögerung	3 msec
5.1	5	Kollisionsenergie	3 eV
6	5	Konusspannung	20 V
Flussgeschwindigkeit	2 ml/min	Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

Methode 8: Chirale Analyse des natürlichen Diprolins in den extrazellulären SPE-Extrakten

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Positiv	
0	20	MRM	Diprolin: 195/97 <i>m/z</i>
4	50		Coffein: 195/40 <i>m/z</i>
4.1	20	Dwell-Time	80 msec
5	20	Scanverzögerung	3 msec
Flussgeschwindigkeit	2 ml/min	Kollisionsenergie	24 eV
		Konusspannung	40 V
		Konusgasfluss	20 L N ₂ /h
		Desolvationsgasfluss	700 L N ₂ /h

7.6. Orbitrap

Für HPLC/Orbitrap-MS (Methode 14) wurde in Kooperation mit Andrea Perner ein Accela-HPLC System mit einem ESI-MS Exactive Orbitrap-Massenspektrometer mit einer Betasil C18 HPLC Säule (150 x 2.1mm, 5 µm) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) genutzt. Als Lösungsmittel diente A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure. Für Direktinjektion in Kooperation mit Marco Kai (Methode 15) wurde ein OrbitrapXL Massenspektrometer (LTQ-OrbitrapXL, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Als Kollisionsgas diente in beiden Fällen Helium.

Methode 14: Messung der exakten Masse von SIP⁺

LC-Bedingungen		Detektor-Bedingungen	
Zeit (min)	% B	Ionisierung ESI-Negativ	
0	2	Massenbereich	140-2000 <i>m/z</i>
2	2	Spray-Spannung	3.5 kV
12	50	Sheath-Gas	45 arb N ₂
13	50	Kollisions-Energien	0, 20, 30, 40 eV
18	98		
21	98		
22	2		
30	2		
Flussgeschwindigkeit	0.2 ml/min		

Methode 15: Messung der exakten Masse von SIP⁺

Injektionsbedingungen		Detektor-Bedingungen	
Direktinjektion	5 µl/min	Ionisierung ESI-Negativ	
		Massenbereich	200-1000 <i>m/z</i>
		Spray-Spannung	4.5 kV
		Sheath-Gas	10 arb N ₂
		Kollisions-Energien	0, 15, 30 eV
		Transfer-Kapillare	275°C
		Kapillarspannung	48 V
		Auflösungsstärke	<i>m/Δm</i> 30,000

7.7. Allgemeine Laborgeräte

Pipettierschritte und Zentrifugation bis 2 ml erfolgte mit Eppendorf Pipetten und einer 5415D Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Zentrifugation bis 100 ml erfolgte mit einer Sorvall Evolution RC Zentrifuge (Thermo Scientific). Das Verdampfen von Lösungsmittel erfolgte mit einem Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor R-200, Büchi, Essen, Deutschland). Die Vakuumpumpe des Rotationsverdampfers wurde auch zur Evakuierung des Exsikkators genutzt. Zur Gefriertrocknung wurde ein Alpha 1-2 D LD Plus Lyophilisator (Christ, Osterode am Harz, Deutschland) verwendet.

7.8. Kultivierungsbedingungen von *S. robusta*

Zur Kultivierung der Algen für die spätere Extraktion des Zellüberstandes wurden Zellkulturflaschen genutzt. Kulturvolumen und Wachstumsfläche sind in den einzelnen Experimenten spezifiziert. Für den Attraktionsbioassay wurden MT⁺ in 1.5 ml Medium in 24-Well-Zellkulturplatten (1.9 cm² Wachstumsfläche) kultiviert (Flaschen und Platten von Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Zum Abtrennen des Zellüberstandes wurde das Medium mittels Vakuum über GF/C Qualität Mikrobenfilter (GE Healthcare, München, Deutschland) filtriert. Die Mikroskopie erfolgte mittels eines invertierten Leica DM IL LED Lichtmikroskops (Heerbrugg, Schweiz). Mit der angeschlossenen Kamera wurden Bilder von den Zellen auf dem Boden der

Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte nicht nach vollständiger Suspension der Algen. Stattdessen wurden zufällige Ausschnitte fotografiert. Die Ermittlung der Zellzahl, der Anzahl der mitotisch aktiven Zellen und der Zellgröße der Algen in den mikroskopischen Bildern erfolgte mittels der open-source Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) und des cell-counter Plugins. Für die Bestimmung der Zellzahl sowie die Anzahl der sich teilenden Zellen wurden drei Bilder bei 100x Vergrößerung aufgenommen und ausgezählt. Zur Ermittlung der Zellgröße wurden zehn Zellen bei 200x Vergrößerung vermessen.

Die *Seminavis robusta* Linien 85A+ (MT⁺) und 84A- (MT⁻) stammen aus der BCCM/DCG Diatomeen-Kultursammlung der Universität Ghent (www.bccm.belspo.be). Alle Kulturen lagen sowohl mit Zellgrößen oberhalb und unterhalb der SST (51.6 µm) vor. Für Experimente mit Zellen oberhalb der SST wurden die Stämme 85A+ (55 µm) und 84A- (52 µm) verwendet. Für Experimente mit Zellen unterhalb der SST wurde 85A+ (40 µm) und 84A- (36 µm) verwendet. Da die Stammkulturen über drei Jahre monatlich umgesetzt wurden, sank die durchschnittliche Zellgröße im Verlaufe der Arbeit auf 23 µm (84A-) und 20 µm (85A+). Die Zellgröße wurde nicht für jedes Experiment dokumentiert. Daher wird für die verschiedenen Experimente nur angegeben, ob die Größe des Paarungstyps oberhalb bzw. unterhalb der SST war. Für den Abschnitt 6.1 (S. 82) wurden zusätzlich zu dem Stamm 85A+ die Stämme P36 (MT⁺, 35 µm), P13 (MT⁺, 32 µm), P34 (MT⁻, 26 µm) und P30 (MT⁻, 29 µm) aus der Diatomeen-Kultursammlung genutzt.

Zur Kultivierung von *S. robusta* wurde autoklaviertes, künstlich gepuffertes Meerwasser verwendet (Maier und Calenberg 1994). Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert des HEPES-gepufferten Mediums mit 10 M Natronlauge auf 7.8 eingestellt. Für die Herstellung von Zellsuspensionen wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und anschließendem Schütteln vom Kulturboden abgelöst.

Stammkulturen wurden bei 4°C unter Lichtausschluss gehalten. Die Kulturen für Versuche wurden angesetzt, indem ein Aliquot der Zellsuspension der Stammkultur in frisches Kulturmedium übertragen wurde. Die Menge des Aliquots betrug $\frac{1}{20}$ des Volumens des Kulturmediums. Die Zellen wurden bei 18°C in einem 12:12 h Licht:Dunkelheit Rhythmus mit kalt-weißem Licht aus einer Fluoreszenzlampe bei etwa 80 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ für die in den verschiedenen Experimenten spezifizierte Zeitdauer kultiviert. Falls angegeben,

erfolgte die Synchronisierung des Zellzykluses der Algen in der G1-Phase (Gillard *et al.* 2008) durch 24 h Inkubation in Dunkelheit nach dem Lichtzyklus.

7.9. Das Paarungssystem von *S. robusta*

Optimierung des Attraktionsbioassays

Für die Optimierung des Attraktionsbioassays wurde MT^+ in Well-Plates und MT^+ sowie MT^- in Kulturflaschen (200 ml, 175 cm²) bis zu einer Dichte von 25k Zellen/cm² /Well-Plates) bzw. 15k Zellen/cm² (Kulturflaschen) kultiviert. Nach der G1-Phase Synchronisierung wurde MT^- suspendiert und zu MT^+ in die Kulturflasche gegeben. Der Überstand der paarenden Kultur wurde 8 h nach Belichtung abfiltriert und 600 µl Medium zu synchronisierten MT^+ in den Well-Plates gegeben, um die Zellen zu konditionieren. Zum Aufbringen des Lockstoffs auf die HLB-Partikel wurde der Rest des Mediums mittels HLB-SPE (60 mg) extrahiert. Anschließend wurden die HLB-Partikel mittels 1 ml Wasser aus der Kartusche entfernt und 50 µg des Materials nach 8 h Belichtung der konditionierten MT^+ Kultur in die Well-Plate gegeben. 15 min nach Zugabe wurden je neun Bilder mit 100x Vergrößerung aufgenommen, jedes Bild stellte zwischen 6 – 15 HLB-Partikel dar. Ein Partikel wurde als „anziehend“ definiert, wenn mindestens sechs Zellen ihn berührten. Diese optimierte Methode wurde auf alle folgenden Attraktionsbioassays übertragen.

Aktivität von konditionierten Kulturen

Zum Test des Verlaufs der Pheromonproduktion von konditionierten und nicht konditionierten Paarungstypen wurden MT^+ und MT^- (je 200 ml, 175 cm²) Kulturen (unterhalb der SST) bis 15k Zellen/cm² kultiviert und synchronisiert. Danach wurde der Überstand von den MT^- Kulturen entweder mit 200 ml gefiltertem MT^+ -Überstand (für konditionierte MT^- Kulturen) oder mit 200 ml sterilem, frischem Kulturmedium (nicht konditionierte MT^+ Kulturen) ersetzt. Nach 8 h Beleuchtung wurden die Kulturen filtriert und mittels HLB-SPE (60 mg) extrahiert. Nach Beladung der HLB-Kartuschen erfolgte das Waschen mit 5 ml MilliQ Wasser und die anschließende Elution mit 1.5 ml Methanol. Dieses wurde mittels eines Stickstoffstroms verdampft und der Rückstand in 100 µl MilliQ Wasser gelöst. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden 90 µl für die RP-UPLC/MS-Messung (siehe unten) genutzt und 10 µl zu 1 mg neuer HLB-Partikel

(gelöst in 100 µl H₂O) gegeben, die aus den Extraktionskartuschen entfernt wurden. Nach dem Mischen wurde das Wasser bei reduziertem Druck in einem Exsikkator eingengt. Durch das Entfernen des Lösungsmittels konnte der Lockstoff an das SPE-Material binden. Anschließend erfolgte das Lösen in 1 ml Wasser und die 54 µg des HLB-Materials wurden im Attraktionsbioassay zu MT⁺ unterhalb der SST (25k Zellen/cm², in Well-Plates) gegeben. Diese wurden zuvor mit 600 µl filtriertem MT⁻ Medium (konditionierte MT⁻-Kulturen) bzw. 600 µl sterilem, frischen Medium (nicht konditionierte MT⁺-Kulturen) für 8 h inkubiert.

Zum Test der Abhängigkeit der Produktion des Lockstoffs von der Zellgröße wurde MT⁻ oberhalb und unterhalb der SST auf gleiche Weise mit zellfreiem Medium von MT⁺ unterhalb der SST konditioniert, extrahiert und im Attraktionsbioassay mit MT⁺ Zellen unterhalb der SST getestet.

Metabolomische Untersuchung

Für die UPLC/MS-Messung wurde 5 µl des Extrakts injiziert, welches im Attraktionsbioassay eingesetzt wurde, um die Pheromonproduktion von konditionierten und nicht konditionierten Paarungstypen zu testen (siehe oben). Methode 1 wurde als Messmethode verwendet. Die Erstellung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte mit dem Programm MarkerLynx V4.1 (Waters, Milford, USA) mit folgenden Parametern: Startretentionszeit: 0 min, Endretentionszeit: 9 min, Niedrige Masse: 50, Hohe Masse: 1000, Absolute Massentoleranz: 0.3, Peakbreite bei 5% Höhe (in Sek): 3, Peak-zu-Peak Basislinienrauschen: 300, Massen pro Retentionszeit: 500, Minimale Intensität des BPI: 1, Massenfenster: 0.5, Retentionszeitfenster: 0.2, Eliminierungsstufe des Rauschens: 50. Zusätzlich erfolgte die Entfernung von Isotopenpeaks. Die Untersuchung der Hochregulierten Metabolite erfolgte mit XCMS Online (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, USA) (Tautenhahn *et al.* 2012). Dafür wurde eine für UPLC/MS optimierte, vorgefertigte Methode (UPLC / Bruker Q-TOF pos) mit folgenden Parametern verwendet: Detektionsmethode: centWave, ppm: 10, minimale Peakweite: 5, maximale Peakweite: 20, Retentionszeitanpassung: obiwrap (profStep: 1), mzwid: 0.015, minfrac: 0.5, bw: 5, absoluter *m/z* Fehler: 0.015, ppm Fehler: 5.

Der Lockstoff-Kandidat eluierte nach 1.06 min. RP-UPLC/MS Fraktionen wurden zu 1 mg neuer HLB-Partikel (gelöst in 100 µl H₂O) und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck in

einem Exsikkator eingengt. Anschließend erfolgte der Einsatz der HLB-Partikel im Attraktionsbioassay wie oben beschrieben.

7.10. Strukturaufklärung des Lockstoffs

Die Aufnahme des MS²-Spektrums erfolgte durch CID am qTOF-Detektor durch Fragmentierung des kationisierten Moleküls $[M+H]^+ = 195 m/z$ mit einer ansteigenden Kollisionsenergie von 30, 60 und 100 eV und anschließender Kombination der gemessenen Massenspektren.

Für hochauflösende GC/EI-MS und GC/CI-MS wurde das Extrakt aus konditionierten MT⁻ Kulturen in 100 µl Acetonitril gelöst und mittels eines GC/TOF-MS untersucht. Dafür wurde 1 µl mit Methode 2 untersucht. Der Lockstoff-Kandidat eluierte nach 12.13 min.

7.11. Synthese von Diprolin

Synthese

Synthesemethode nach Nonappa

Für die Diprolin Synthese nach Nonappa (Nonappa *et al.* 2011) wurden 200 mg Prolin (L- bzw. D-Form, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) in 700 µl Ethylenglykol gelöst und für 30 min auf 200°C erhitzt. Nach Zugabe von 800 µl Wasser wurde die Reaktionsmischung mit 500 µl Chloroform extrahiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase mit 1 ml einer gesättigten Kochsalzlösung versetzt und nochmals mit 500 µl Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Synthesemethode nach Nakamura

Für die Diprolin Synthese nach Nakamura (Nakamura *et al.* 2006) wurden 6 g Prolin (L- bzw. D-Form, VWR, Darmstadt, Deutschland) in 60 ml wasserfreiem Methanol gelöst. Nach dem Kühlen der Lösung auf 0°C wurden 4 ml Thionylchlorid zugegeben und die Reaktionslösung 2 h im Eisbad und anschließend weitere 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum am Rotationsverdampfer wurde der

gelbliche Rückstand in 50 ml Dichlormethan gelöst und durch Zugabe von 18 g festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und der Feststoff im Anschluss abfiltriert. Das Filtrat wurde nach 3.5 d Lagerung bei Raumtemperatur mit 50 ml Dichlormethan versetzt und die Mischung mit 50 ml einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Aufarbeitung von Diprolin

Zur weiteren Reinigung des synthetisierten Diprolins wurden die entsprechenden Rohprodukte in einem ersten Schritt aus Ethylacetat umkristallisiert. Eventuelle weitere Verunreinigungen wurden anschließend mittels Säulenchromatografie über Kieselgel entfernt. Als Laufmittel wurde Chloroform/Methanol 9:1 (v/v) verwendet, wobei der Retentionsindex des Diprolins $R_f = 0.65$ betrug. Die entsprechenden Diprolin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 4 ml Wasser aufgenommen. Ein letzter Reinigungsschritt erfolgte mittels präparativer HPLC. Hierzu wurden 2 mg Diprolin mit Methode 3 aufgetrennt und nach 11.7 min fraktioniert. Zur Abtrennung der Diastereomere wurde ein isokratisches Programm mit 14% Methanol genutzt, wobei das Diastereomer eine Retentionszeit von 18.5 min besaß und L- bzw. D-Diprolin nach 19.5 min eluierte. Die Identifizierung der Diprolin enthaltenden Fraktionen erfolgte hierbei mittels GC/q-MS, indem die einzelnen Fraktionen in Chloroform gelöst und je 1 μl der entsprechenden Lösung mit Methode 4 analysiert wurde.

Strukturuntersuchung

Koinjektion

Für die Koinjektion mittels des GC-TOF-MS wurde das extrazelluläre Extrakt aus konditionierten MT⁻ Zellen, welches den Lockstoff-Kandidat enthält, in Acetonitril gelöst. Die Hälfte der Probe wurde mit einer gleichwertigen Menge an synthetischen L-Diprolin (Synthesemethode nach Nonappa) aufgestockt. Anschließend wurden die Proben für die Ko- und Einzelinjektion mit 150 μM Coffein als internem Standard versetzt. Es erfolgte

die Untersuchung von 1 μl der Lösung mittels Methode 2 im EI-Modus. Für die Koinjektion mittels des RP-UPLC-MS wurde das Acetonitril mittels eines Stickstoffstroms verdampft und die Proben in 100 μl H_2O gelöst und 5 μl mittels Methode 1 untersucht.

NMR

^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz), HMBC und COSY NMR Spektren wurden von 20 mg synthetischen L-Diprolin (Synthesemethode nach Nonappa) in deuteriertem Chloroform an einem 400 MHz-NMR Bruker Advance AC400 Spektrometer aufgenommen.

Quantifizierung von Diprolin

Für die Messung der absoluten Konzentration von Diprolin wurde eine Kalibration über das Gesamtverfahren mittels GC/q-MS erstellt. Dafür wurden nicht konditionierte MT^- Kulturen unterhalb der SST in Kulturflaschen (25 cm^2 , 50 ml) bis zu einer Dichte von 15k Zellen/ cm^2 kultiviert. Anschließend wurde 15 nmol Coffein und 0 – 80 nmol synthetisches L-Diprolin (Synthesemethode nach Nonappa) hinzugefügt und die Proben filtriert. Es erfolgte die Extraktion mittels HLB-SPE (60 mg). Nach der Beladung wurden die Kartuschen mit 2 ml MilliQ Wasser gewaschen und mit 1.5 ml Methanol eluiert. Dieses wurde im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in 100 μl Acetonitril gelöst. Nach Zentrifugation wurde 1 μl des Überstands mit GC/q-MS und Methode 4 analysiert. Das Verhältnis der Peakflächen Diprolin/Coffein wurde gegen die eingesetzte Stoffmenge von Diprolin aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Dabei wurde sowohl für Coffein als auch für Diprolin die Massenspur 194 (Molekülion beider Substanzen) integriert. Die Kalibrationsfunktion diente fortan zur Berechnung der extrazellulären Diprolinkonzentration in MT^- Kulturen, die in 50 ml Medium kultiviert wurden. Die Zugabe von 15 nmol Coffein als internem Standard erfolgte stets vor dem Abfiltrieren der Zellen.

CD-Spektroskopie

Zur Anreicherung von natürlichem Diprolin wurden je zehn MT^- und MT^+ Kulturen unterhalb der SST (je 175 cm^2 , 200 ml) bis zu einer Dichte von 15k Zellen/ cm^2 kultiviert. Nach Synchronisierung wurde der Überstand von MT^- mit zellfreiem MT^+ Medium ausgetauscht. Nach achtstündiger Belichtung wurden die Zellen abfiltriert. Je 200 ml des

Kulturmediums wurden mittels HLB-SPE (200 mg) extrahiert. Die Extraktionskartuschen wurden nach der Extraktion mit 5 ml Wasser gewaschen und mit 5 ml Methanol eluiert. Nach Vereinigung aller Eluate erfolgte das Verdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser gelöst und Diprolin durch präparative HPLC mit Methode 3 aufgereinigt. Das Lösungsmittel der erhaltenen Fraktion wurde im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 700 μ l Wasser gelöst. Die Konzentration von Diprolin betrug 700 μ M. Das natürliche Diprolin sowie 700 μ M des synthetischen L- und D-Diprolin (getestet wurden beide Syntheseansätze) wurden mit einem Jasco J-810 Circular-Dichroismus Spektropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) vermessen. Gleichzeitig wurde die UV-Absorption gemessen, um zu gewährleisten, dass alle Substanzen in den gleichen Ausgangskonzentrationen eingesetzt wurden.

7.12. Diprolin als Diatomeenpheromon

Test von synthetischen L- und D-Diprolin als Lockstoff

MT⁺ und MT⁻ unterhalb der SST wurden in Kulturflaschen (25 cm², 50 ml) bis zu einer Dichte von 25k Zellen/cm² kultiviert. Nach Synchronisierung wurde der Überstand von MT⁺ mit zellfreiem Kulturmedium von MT⁻ ausgetauscht. Zum Test des synthetischen Diprolins wurde 50 μ l (1 mg) frisches HLB-Material mit in Acetonitril gelöstem, gereinigtem L- und D-Diprolin (2 pmol – 2000 nmol, aus der Synthesemethode nach Nakamura) gemischt. Nach dem Abdampfen des Acetonitrils unter reduziertem Druck in einem Exsikkator wurde der Ansatz in 1 ml Wasser gelöst und 200 μ g der HLB-Partikel zu den konditionierten MT⁺ Zellen gegeben, die bereits 8 h belichtet wurden. Die Aktivität der Partikel wurde bestimmt (siehe S. 101) und nach 15 min wurden 15 nmol des internen Standards Coffein zugegeben und das Kulturmedium filtriert. Die Quantifizierung des von den HLB-Partikeln in das Medium freigesetzten Diprolins erfolgte wie bereits beschrieben mittels GC/q-MS und Methode 4 (S. 105). Die Analyse zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Unterschiede der Attraktion von L- und D-Diprolin und zur Kontrolle (0 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel) erfolgte in Kooperation mit Marnik Vuylsteke. Die Analyse erfolgte unter Verwendung eines Logit-Modells. Dafür wurden die binomialen Daten Logit-transformiert um Normalitätsbedingungen zu erreichen. Die transformierten Daten wurden mit den Faktoren "Diprolin" (2 Level: L- und D-Diprolin) und

“Konzentration” (8 Level: 7 verschiedene Konzentrationen) mittels Genstat (VSN International, Hemel Hempstead, UK) der Regressionsanalyse unterworfen. Als statistischer Test wurde der Wald-Test angewandt. Der Vergleich zur Kontrolle erfolgte durch paarweise Gegenüberstellung und der Berechnung der geringsten signifikanten Unterschiede auf Basis der Standardfehler der zwei Mittelwerte. Diese Analyse erfolgte ebenfalls auf dem Level der Logit-transformierten Daten. Durch die multiplen paarweisen Vergleiche wurden multiple p-Werte erzielt, die alle einen signifikanten Unterschied der Werte im Vergleich zur Kontrolle anzeigten.

Diprolinproduktion in paarenden und konditionierten Kulturen

MT⁻ und MT⁺ wurden in Kulturflaschen (25 cm², 50 ml) bis zu einer Dichte von 15k Zellen/cm² kultiviert. Nach Synchronisierung wurde der MT⁻ Überstand entfernt und entweder mit zellfreiem Überstand von MT⁺ oder mit einer suspendierten MT⁺ Kultur ersetzt. Für den Test von 18 Zeitpunkten (0 – 17 h nach Beleuchtung) der paarenden und konditionierten Kulturen sowie drei Replikaten pro Zeitpunkt wurden jeweils 54 Ansätze der zwei Kulturtypen vorbereitet. Diese wurden weitere 10 h in Dunkelheit inkubiert und anschließend belichtet. Nun wurde stündlich die Anzahl der vegetativen und paarenden Zellen sowie Zygoten bestimmt (siehe 7.8, S. 99). Anschließend wurde 15 nmol Coffein als Interner Standard hinzugefügt, das Medium filtriert und extrahiert. Nach Bestimmung der Diprolinkonzentration des SPE-Extrakts (S. 105) wurde dieses im Attraktionsbioassay verwendet, indem 10 µl (10%) des Extrakts mit 50 µl (1 mg) frischen, in Acetonitril suspendierten HLB-Material gemischt und das Lösungsmittel im Exsikkator entfernt wurde. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurden 54 µg des HLB-Materials zu MT⁺ unterhalb der SST gegeben (25k Zellen/cm², in Well-Plates), die zuvor 8 h mit 600 µl zellfreiem Kulturüberstand von MT⁻ unterhalb der SST konditioniert wurden. Nach 15 min erfolgte die Bestimmung der Zahl der aktiven HLB-Partikel (siehe S. 101). Das Lösungsmittel des übrigen Extrakts wurde unter reduziertem Druck im Exsikkator entfernt und der Rückstand bis zur Analyse mittels SFC bei -20°C eingefroren (siehe 7.16, S. 109).

7.13. Diprolinabbau

Die Trennung der im Kulturmedium vorhandenen Bakterien von *S. robusta* erfolgte durch das Abgießen des Kulturmediums. Dabei verbleiben die meisten Algenzellen auf dem Boden der Kulturflasche. Den im Wasser verbliebenen Algenzellen wurde ein Tag Zeit

gegeben, um sich an den Kulturflaschenboden anzuheften. Anschließend wurde erneut der Überstand entfernt. Die Prozedur wurde solange wiederholt, bis keinerlei Algen mehr im Mikroskop sichtbar waren. Der Algenüberstand mit den planktonischen Bakterien wurde anschließend für 3 d bei einem 12 h:12 h Licht/Dunkelrhythmus inkubiert. Zusätzlich wurde MT⁺ unterhalb der SST (mitsamt der im Kulturmedium enthaltenden Bakterien) 3 d bis zu einer Dichte von 25k Zellen/cm² kultiviert (75 cm², 75 ml). Nach Synchronisierung wurde 1 ml einer wässrigen 3.75 µM L-Diprolin-haltigen Lösung (aus Syntheseansatz nach Nakamura) zugesetzt, so dass die finale Konzentration von Diprolin im Kulturmedium 50 mM betrug. Das gleiche Protokoll wurde für reines Kulturmedium, welches weder Algen noch Bakterien enthielt, durchgeführt. Nach 13 h Belichtung wurde 15 nmol Coffein zugegeben, das Medium filtriert und die Diprolinkonzentration nach HLB-SPE (60 mg) bestimmt (siehe S. 105).

Der Vergleich der Paarungseffizienz von axenischen und nicht-axenischen Kulturen wurde von Jeroen Gillard durchgeführt. Für das Entfernen der Bakterien wurden *S. robusta* Kulturen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (ca. 15k Zellen/cm², siehe Abbildung 9, S. 25) durch eine Antibiotikabehandlung nach Provasoli behandelt (Provasoli *et al.* 1957). Dafür wurden 2 ml der Antibiotika-enthaltenden Mischung mit 12k Units Penicillin G, 50 µg Chloramphenicol, 300 Units Polymixin B und 60 µg Neomycin (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgien) zu 25 ml der Kulturen gegeben. Nach 24 h wurden 6.25 mg Cefotaxime und 12.5 mg Carbenicillin hinzugefügt. Nach 48 h wurde die Kultur in Antibiotika-freies Medium überführt. Die bakterielle Kontamination wurde in Kulturen in der späten logarithmischen Wachstumsphase (ca. 100k Zellen/cm²) dokumentiert. Dafür wurde der filtrierte Algenüberstand auf Agarplatten ausplattiert. Diese bestanden aus natürlichem Seewasser (1% bakteriologischer Agar, 2 mM Tris Base H₂SO₄ pH 7.4; Sigma-Aldrich, Bornem, Belgien). Vor dem Autoklavieren wurde dem Agar 1g/L BactoTM pepton (BD, Sparks, USA) zugefügt. Nach zweiwöchentlicher Inkubation bei Raumtemperatur in der Dunkelheit konnten höchstens 1-2 bakterieller Plaques beobachtet werden.

7.14. Andere Diketopiperazin-Produzenten

Der Pilz *Pleurotus citrinopileatus* wurde aus einem Pilzzuchtset (<http://stores.ebay.de/PILZATOR-Pilzzuchten-Heim-Garten>) nach der dort beschriebenen

Anleitung kultiviert. Die Fruchtkörper und das Myzel wurden gesammelt und mit Wasser gereinigt. Anschließend wurden 3.2 g Pilzmaterial im flüssigen Stickstoff mit 16 ml Methanol gemörsert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand filtriert, um die restlichen Partikel zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum mit einem Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand schrittweise in 100 µl Acetonitril gelöst. Anschließend wurde 1 µl im GC/TOF-MS mit Methode 2 gemessen.

7.15. Cyclodextrine

Chirale HPLC/MS

Für den Test der Trennung der beiden Diprolinenantiomere mittels Flüssigchromatographie auf einer Cyclodextrinphase wurde von dem gereinigten L- und D-Diprolin (aus Syntheseansatz nach Nakamura) eine 100 µM racemische Lösung in Wasser hergestellt. Von dieser wurde 1 µl mittels chiraler HPLC/MS am UPLC/MS-System mit Methode 5 untersucht.

Chirale GC/MS

Für den Test der Trennung der beiden Diprolinenantiomere mittels Gaschromatographie auf einer Cyclodextrinphase wurde von dem gereinigten L- und D-Diprolin (aus Syntheseansatz nach Nakamura) eine 150 µM racemische Lösung in Acetonitril hergestellt. Davon wurde 1 µl mittels GC/TOF-MS mit verschiedenen isothermischen Programmen (230°C, 220°C, 210°C, 200°C, 180°C) mit Methode 6 untersucht.

7.16. SFC-Trennung von Diprolin

Für die Trennung der beiden Diprolinenantiomere mittels SFC wurde eine 260 µM Lösung (in Methanol/Wasser 1:1) des gereinigten L- und D-Diprolin sowie des Racemats (aus Syntheseansatz nach Nakamura) hergestellt. Zum Test der verschiedenen stationären Phasen und Modifier wurde 1 µl dieser Lösung mittels SFC/MS mit Methode 7 untersucht. Zur Optimierung der Trennung auf dem Säulentyp ID wurde anschließend 1 µl von einer Mischung mit 60 µM L-Diprolin und 180 µM D-Diprolin sowie ein Extrakt aus konditionierten MT⁻ Kulturen mit natürlichen Diprolin analysiert. Hier wurden alle Proben

in Methanol gelöst und mit Methode 8 gemessen. Um zu testen, ob es während des Pheromonabbaus zu einer Racemisierung des Diprolins kommt, wurden anschließend die getrockneten und eingefrorenen Proben der Pheromonkinetik (siehe S. 107) in 100 µl Methanol gelöst und 1 µl mit Methode 8 injiziert. Zusätzlich zu Diprolin wurde auch der interne Standard Coffein gemessen, um die relative Menge von Diprolin in den einzelnen Proben angeben zu können.

7.17. Identifizierung des SIP⁺-Kandidaten

Test verschiedener Extraktionskartuschen

MT⁺ wurde 2 d bis zu einer Zelldichte von 25k Zellen/cm² kultiviert (200 ml, 175 cm²) und nach fünfstündiger Belichtung am dritten Tag filtriert. Es erfolgte die Extraktion auf verschiedenen RP-SPE-Kartuschentypen. Die Extraktionsbedingungen sind folgender Übersicht zu entnehmen

Kartuschentyp	Waschschritt nach Extraktion	Elution nach Waschen
HLB (60 mg)	2 ml Wasser	2 ml Methanol
C18 (500 mg)	5 ml Wasser	5 ml Acetonitril/0.1% Ameisensäure
Easy (60 mg)	2 ml Wasser/5% Methanol	2 ml Methanol

Das Eluat wurde unter reduziertem Druck in einem Exsikkator entfernt und der Rückstand in 1 ml Wasser gelöst. Je 100 µl des gelösten Rückstandes wurden im Diprolin-Induktionsassay eingesetzt. Dafür wurde MT⁻ unterhalb der SST für 2 d bis zu einer Dichte von 50k Zellen/cm² kultiviert (25 cm², 50 ml) und synchronisiert. Anschließend wurde das zu testende Extrakt hinzugegeben und die Zellen für 8 h belichtet. Nach Zugabe des Internen Standards Coffein erfolgte die Bestimmung der extrazellulären Diprolinkonzentration wie bereits beschrieben mittels GC/q-MS und Methode 4 (S. 105).

Bestimmung der Retentionszeit

Der Überstand einer MT⁺ Kultur mit 25k Zellen/cm² wurde wie bereits im vorigen Experiment beschrieben mittels HLB-SPE extrahiert. Das Methanol Eluat wurde unter reduziertem Druck in einem Exsikkator verdampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Wasser gelöst und 20 µl mittels RP-UPLC mit Methode 9 vermessen. Anschließend wurden erneut

20 µl injiziert und das Extrakt alle 30 Sek fraktioniert. Um zu testen, ob die Fraktionen SIP⁺ enthielten, wurden diese im Diprolin-Induktionsassay (Bedingungen wie im vorigen Experiment) getestet. Nach dem Eingrenzen der Retentionszeit von SIP⁺ zwischen 1 - 2 min wurde das Extrakt erneut injiziert und in diesem Bereich alle 3 Sek eine Fraktion gesammelt. Nach dem Test der Fraktionen im Diprolin-Induktionsassay konnte der Retentionszeitbereich von SIP⁺ zwischen 1.4 – 1.7 min bestimmt werden.

7.18. Anreicherung von SIP⁺

Anreicherung

MT⁺ unterhalb der SST wurde 2 d bzw. 3 d bis zu einer Dichte von etwa 35k Zellen/cm² bzw. 83k Zellen/cm² (25 cm², 50 ml) kultiviert und filtriert. Es folgten HLB-SPE, der Diprolin-Induktionsassay von verschiedenen Verdünnungen des Extraktes und die Bestimmung der extrazellulären Diprolinkonzentration wie bereits beschrieben mittels GC/q-MS und Methode 4 (S. 105).

Zur Korrelation der Produktion von SIP⁺ mit der Wachstumsphase von MT⁺ wurde MT⁺ unterhalb der SST (25 cm², 50 ml) in 24 Kulturflaschen für 15 d kultiviert. Es wurden jeweils 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13 und 15 d nach Kultivierungsbeginn pro Zeitpunkt drei Kulturflaschen nach achtstündiger Belichtung filtriert. Vor dem Filtrieren des Mediums wurde die Kultur fotografiert und die Zelldichte auf der Kultivierungsoberfläche bestimmt. Das HLB-SPE-Eluat wurde nach Trocknung in 100 µl Wasser gelöst und zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl mittels RP-UPLC und Methode 9 im ESI-Negativmodus gemessen. Zur Quantifizierung wurde das Signal des anionisierten Moleküls [M-H]⁻ von SIP⁺ integriert. Zusätzlich wurde das Signal einer unbekannt Substanz mit einem $m/z = 441$ bestimmt, welche mit SIP⁺ koeluierte. Dieses Signal wurde als Interner Standard verwendet, da es unabhängig vom Kultivierungszeitpunkt in jedem Mediumextrakt in gleichbleibender Intensität nachzuweisen war. Es handelt sich wahrscheinlich um eine aus dem Kulturmedium stammende Substanz, deren Menge von *S. robusta* und den assoziierten Bakterien nicht beeinflusst wird. Mit Hilfe dieser Substanz wurde die relative Menge von SIP⁺ im Medium im Vergleich zu dem Signal mit $m/z = 441$ berechnet.

Metabolomischer Vergleich

MT⁻ unterhalb der SST sowie MT⁺ oberhalb und unterhalb der SST wurden 4 d bis zu einer Zelldichte von 100k Zellen/cm² (200 ml, 185 cm²) kultiviert. Anschließend wurde nach weiterer fünfstündiger Belichtung am fünften Tag das Medium filtriert und das Filtrat mittels HLB-SPE (200 mg) extrahiert. Die Kartuschen wurden mit 5 ml Wasser gewaschen und mit 5 ml Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde in einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 100 µl Wasser gelöst. Nach Zentrifugation wurden 20 µl des Überstands mit RP-UPLC und Methode 9 analysiert. Die Erstellung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte durch das Programm MarkerLynx V4.1 unter Verwendung folgender Parameter: Startretentionszeit: 0 min, Endretentionszeit: 13 min, Niedrige Masse: 50, Hohe Masse: 1000, Absolute Massentoleranz: 0.2, Peakbreite bei 5% Höhe (in Sek): 3, Peak-zu-Peak Basislinienrauschen: 300, Massen pro Retentionszeit: 200, Minimale Intensität des BPI: 0.9, Massenfenster: 0.15, Retentionszeitfenster: 0.1, Eliminierungsstufe des Rauschens: 0. Zusätzlich erfolgte die Entfernung von Isotopenpeaks. Die Untersuchung der Hochregulierten Metabolite erfolgte mit XCMS Online mit der bereits beschriebenen Methode (siehe Metabolomische Untersuchung, S. 102).

7.19. Reinigung von SIP⁺

Zum Durchführen der zweidimensionalen Chromatographie wurde SIP⁺ enthaltene MT⁺ Medium von 100k Zellen/cm² sowie die Extraktion mittels HLB-SPE wie bereits beschrieben (siehe Metabolomischer Vergleich, S. 112) durchgeführt. Zur Reinigung von SIP⁺ wurde das getrocknete Extrakt in 100 µl Wasser:Acetonitril (2:3) gelöst. Anschließend erfolgte die Injektion von 20 µl des Extrakts und Fraktionierung von SIP⁺ mit HILIC-HPLC/MS und Methode 10 am UPLC/MS-System. Die Injektion und Fraktionierung wurde 5x wiederholt, so dass insgesamt 100 µl (das komplette Extrakt aus 200 ml Medium) aufgereinigt werden konnte. Von den gesammelten Fraktionen wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 100 µl Wasser gelöst. Nachdem die chromatographische Trennung von SIP⁺ vorwiegend über dessen polare Eigenschaften stattfand, erfolgte nun eine weitere Reinigung von SIP⁺ über die apolaren Eigenschaften der Substanz. Dafür wurde 20 µl des gelösten Rückstands mittels RP-UPLCS/MS und Methode 11 getrennt und SIP⁺ bei 6% Acetonitril (0.1% HCOOH)

fraktioniert. Damit die Fraktion im Diprolin-Induktionsassay getestet werden konnte, wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 100 µl Wasser gelöst.

Zur Erhöhung der Selektivität während des Extraktionsprozesses von SIP⁺ erfolgte Anionen-Austausch-SPE von 60 ml filtriertem MT⁺ Medium mittels MAX-SPE. Nach Beladung der Kartuschen wurde sie zunächst mit 2 ml Wasser gewaschen und alle nicht-anionischen Metabolite mit Methanol eluiert. Anschließend erfolgte die Elution der Anionen durch 2 ml Methanol (2% HCOOH). Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand für den Test im Diprolin-Induktionassay in 100 µl Wasser gelöst.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Substanz mit einem anionisierten Molekül [M-H]⁻ bei $m/z = 842$ um SIP⁺ handelt, wurden von den gesammelten Fraktionen, Extrakten und Überständen jeweils 10% im Diprolin-Induktionsassay eingesetzt und die extrazelluläre Diprolinkonzentration wie bereits beschrieben mittels GC/q-MS und Methode 4 (S. 105) bestimmt.

7.20. SIP⁺ als Zellzyklusarretierungspheromon

Die Extraktion von SIP⁺ enthaltendem MT⁺ Medium von 100k Zellen/cm² (200 ml) wurde wie bereits beschrieben (siehe Metabolomischer Vergleich, S. 112) durchgeführt. Das getrocknete Extrakt wurde in 1 ml Wasser gelöst und SIP⁺ mit RP-UPLC/MS und Methode 11 bei 6% B fraktioniert. Zur Kontrolle wurde MT⁻ unterhalb der SST und das Medium von 100k Zellen/cm² mit beschriebener Methode extrahiert und in RP-UPLC/MS (Methode 11) bei 6% B fraktioniert. Die Fraktionen wurden im Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl Wasser eluiert.

MT⁻ unterhalb der SST wurde bis zu einer Dichte von 25k Zellen/cm² (25 cm², 50 ml) kultiviert und synchronisiert. Für drei Replikate, neun Zeitpunkte und zwei Behandlungstypen wurden insgesamt 54 Kulturflaschen benötigt. Anschließend wurden zu 27 Kulturflaschen je 37 µl der SIP⁺ haltigen MT⁺ Fraktion und zu 27 Kulturflaschen je 37 µl der MT⁻ Fraktion zugefügt. Nach Belichtung wurde stündlich die Anzahl der sich teilenden Zellen bestimmt (siehe 7.8, S. 99). Anschließend wurden 15 nmol Coffein als interner Standard hinzugefügt, das Medium filtriert und die extrazelluläre Diprolinkonzentration (S. 105) bestimmt.

7.21. Strukturanalyse

Zur Anreicherung von SIP⁺ wurden 30 Ansätze von MT⁺ (175 cm², 200 ml) für 5 d bis zu einer Dichte von 100k Zellen/cm² kultiviert. Es folgte die Filtration am nächsten Tag nach 4 h Belichtung. Die leeren Kulturflaschen wurden gereinigt und anschließend erneut inokuliert, um Kosten zu sparen. Die Wiederverwendung der nach der Benutzung unsterilen Kulturflaschen behinderte nicht das Wachstum der Zellen und führte zu keiner geringeren Ausbeute an SIP⁺. Das von den Zellen abfiltrierte Kulturmedium (6 L) wurde mit 0.1% HCOOH versetzt und mittels HLB-SPE (6000 mg) extrahiert. Die Kartusche wurde anschließend mit 30 ml Wasser/1% Ameisensäure gewaschen und mit 150 ml 30% Methanol eluiert. Ebenso wie die Kulturflaschen konnte die Extraktionskartusche nach dem Waschen mit weiteren 60 ml Methanol für erneute Extraktionen genutzt werden, um Kosten zu sparen. Das Eluat wurde getrocknet, indem zunächst im Vakuum am Rotationsverdampfer das Methanol verdampft wurde. Anschließend wurde im Vakuum am Lyophilisator das Wasser entfernt und der Rückstand in 1 ml Wasser gelöst. Nach Zentrifugation und Filtration wurde das Extrakt mittels RP-HPLC/MS fraktioniert. Hierfür wurden 900 µl Extrakt injiziert und mit Methode 12 untersucht. SIP⁺ konnte durch einen Splitter (5% des Eluats zum Massenspektrometer, 95% in die Fraktion) abgetrennt werden, wobei der Metabolit nach 23 min eluierte. Insgesamt wurde das Extrakt von 30 L Medium fraktioniert. Alle Fraktion wurde vereinigt, im Lyophilisator getrocknet und der Rückstand in 200 µl Wasser gelöst. Zur Aufnahme von MS²-Spektren wurde 0.1 µl mittels RP-UPLC/MS und Methode 13 analysiert. Für die Evaluation der Aktivität der Fraktion wurde sie in den Verdünnungsstufen $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ und $1/10^6$ im Diprolin-Induktionassay genutzt und die extrazelluläre Diprolinkonzentration wie bereits beschrieben mittels GC/q-MS und Methode 4 (S. 105) bestimmt.

Zur Messung der exakten Masse von SIP⁺ wurde 1 µl der gereinigten Fraktion mittels HPLC/Orbitrap-MS und Methode 14 in Kooperation mit Andrea Perner (HKI-Jena) vermessen. Alternativ wurde 1 µl in 50 µl Wasser verdünnt und mittels Direktinjektion in das Orbitrap-System mit Methode 15 in Kooperation mit Marco Kai (MPI-Jena) analysiert.

Anschließend wurde die Fraktion im Lyophilisator getrocknet und in Kooperation mit Bernd Schneider (MPI-Jena) das ¹H NMR Spektrum von SIP⁺ aufgenommen. Dafür wurde der Rückstand mit 85 µl Deuteriumoxid (99.9) gelöst und in einer 2 mm Kapillare mit

einem Bruker Avance 500 MHz NMR Spektrometer gemessen. Dieses war mit einem TCI cryoprobe NS 2400 Probenkopf ausgestattet.

7.22. Diversität der Pheromone

MT⁻ unterhalb der SST (25 cm², 50 ml) wurde kultiviert und synchronisiert. Die Zelldichte für den Stamm P34 betrug 36k Zellen/cm², für den Stamm P30 64k Zellen/cm². MT⁺ unterhalb der SST wurde bis zu einer Zelldichte von 31k Zellen/cm² (Stamm P36) bzw. 84k Zellen (Stamm P13) kultiviert. Das Filtrat sowie SIP⁺ (Isolation siehe 7.19, S. 112) wurden genutzt, um die Diprolinproduktion in den verschiedenen MT⁻ Stämmen zu induzieren. Nach achtstündiger Belichtung wurde 15 nmol Coffein als interner Standard hinzugefügt, das Medium filtriert und die extrazelluläre Diprolinkonzentration (S. 105) bestimmt.

8. Literaturverzeichnis

Abe, I.; Musha, S. (1980): Resolution of amino acid enantiomers by glass capillary gas chromatography on easily prepared optically active stationary phases. In: *J. Chromatogr. A* 200, S. 195–199.

Adair, W. S. (1985): Characterization of *Chlamydomonas* cell specific sexual agglutinins. In: *J. Cell Sci.* 2, S. 233–260.

Agrawal, S. C. (2012): Factors controlling induction of reproduction in algae—review: the text. In: *Folia Microbiol.* 57 (5), S. 387–407.

Al-Hasani, H.; Jaenicke, L. (1992): Characterization of the sex-inducer glycoprotein of *Volvox carteri f. weismannia*. In: *Sex. Plant Reprod.* 5 (1), S. 8–12.

Amato, A.; Orsini, L.; D'Alelio, D.; Montresor, M. (2005): Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planctonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). In: *J. Phycol.* 41 (3), S. 542–556.

Amin, S. A.; Parker, M. S.; Armbrust, E. V. (2012): Interactions between diatoms and bacteria. In: *Microbiol. Mol. Biol. R.* 76 (3), S. 667–684.

Amsler, C. D.; Fairhead, V. A. (2006): Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. In: *Adv. Bot. Res.* 43, S. 1–91.

Armbrust, E. V. (2004): The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. In: *Science* 306 (5693), S. 79–86.

Armstrong, D. W.; DeMond, W.; Alak, A.; Hinze, W. L.; Riehl, T. E.; Bui, K. H. (1985): Liquid chromatographic separation of diastereomers and structural isomers on cyclodextrin-bonded phases. In: *Anal. Chem.* 57 (1), S. 234–237.

Aswad, D. W. (1984): Determination of d- and l-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthalaldehyde. In: *Anal. Biochem.* 137 (2), S. 405–409.

Bao, H.; Zhang, Y.; Tolgor; Li, Y. (2004): Chemical components of *Pleurotus citrinopileatus* Singer. In: *Junwu Xuebao* 23 (2), S. 262.

Barksdale, A.; Lasure, L. (1974): Production of hormone B by *Achlya heterosexalis*. In: *Appl. Microbiol.* 28 (4), S. 544–566.

- Bassler, B. L.; Losick, R. (2006): Bacterially Speaking. In: *Cell* 125 (2), S. 237–246.
- Belin, P.; Moutiez, M.; Lautru, S.; Seguin, J.; Pernodet, J.-L.; Gondry, M. (2012): The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. In: *Nat. Prod. Rep.* 29 (9), S. 961.
- Berger, T. A. (1997): Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography. In: *J. Chromatogr. A* 785 (1-2), S. 3–33.
- Bhatt, J. P.; Sajwan, M. S. (2001): Ovarian steroid sulphate functions as priming pheromone in male *Barilius bendelisis* (Ham.). In: *J. Biosci.* 26 (2), S. 253–263.
- Bocker, S.; Rasche, F. (2008): Towards de novo identification of metabolites by analyzing tandem mass spectra. In: *Bioinformatics* 24 (16), S. 149–155.
- Boland, W.; Pohnert, G.; Maier, I. (1995): Pericyclic reactions in nature: spontaneous cope rearrangement inactivates algae pheromones. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 34 (15), S. 1602–1604.
- Borden, J.; Chong, L.; McLean, J.; Slessor, K.; Mori, K. (1976): *Gnathotrichus sulcatus*: synergistic response to enantiomers of the aggregation pheromone sulcatol. In: *Science* 192 (4242), S. 894–896.
- Borthwick, A. D. (2012): 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. In: *Chem. Rev.* 112 (7), S. 3641–3716.
- Bowler, C.; Allen, A. E.; Badger, J. H.; Grimwood, J.; Jabbari, K.; Kuo, A. *et al.* (2008): The phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. In: *Nature* 456 (7219), S. 239–244.
- Brasier, C. M.; Cooke, D. E. L.; Duncan, J. M. (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (10), S. 5878–5883.
- Brawley, S. H. (1992): Fertilization in natural populations of the dioecious brown alga *Fucus ceranoides* and the importance of the polyspermy block. In: *Mar. Biol.* 113 (1), S. 145–157.
- Campbell, J.; Lin, Q.; Geske, G. D.; Blackwell, H. E. (2009): New and unexpected insights into the modulation of luxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. In: *ACS Chem. Biol.* 4 (12), S. 1051–1059.

- Campbell, L. (1958): Reductive degradation of pyrimidines. 4. Purification and properties of dihydouracil hydase. In: *J. Biol. Chem.* 233 (5), S. 1236–1240.
- Carlson, K. L.; Lowe, S. L.; Hoffmann, M. R.; Thomasson, K. A. (2006): Theoretical UV circular dichroism of Cyclo(L-Proline-L-Proline). In: *J. Phys. Chem. A* 110 (5), S. 1925–1933.
- Cembella, A. D. (2003): Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. In: *Phycologia* 42 (4), S. 420–447.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G. (1997): Variation in the sexual behaviour of natural clones of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). In: *Euro. J. Phycol.* 32 (2), S. 147–154.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G. (2004): Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms. In: *Phycological Res.* 52 (1), S. 1–12.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G.; Dassow, P. von; Armbrust, E. V.; Sabbe, K.; Dasseville, R.; Vyverman, W. (2006): Oogamous reproduction, with two-step auxosporulation, in the centric diatom *Thalassiosira punctigera* (Bacillariophyta). In: *J. Phycol.* 42 (4), S. 845–858.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G.; Dassow, P. von; Vanormelingen, P.; Gillard, J.; Inzé, D. *et al.* (2008): In search of new tractable diatoms for experimental biology. In: *Bioessays* 30 (7), S. 692–702.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G.; Sabbe, K.; Vyverman, W. (2004): Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. In: *Int. Rev. Cytol.* 237, S. 91–154.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G.; Vyverman, W.; Sabbe, K.; Danielidis, D. B. (2002): Sexual reproduction, mating system, and protoplast dynamics of *Seminavis robusta* (Bacillariophyceae). In: *J. Phycol.* 38 (5), S. 1004–1019.
- Coelho, S. M.; Scornet, D.; Rousvoal, S.; Peters, N. T.; Darteville, L.; Peters, A. F.; Cock, J. M. (2012): *Ectocarpus*: a model organism for the brown algae. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2012 (2), S. 193–198.
- Coleman, A. W. (2012): A comparative analysis of the Volvocaceae (Chlorophyta). In: *J. Phycol.* 48 (3), S. 491–513.

- Coleman, A. W.; Jaenicke, L.; Starr, R. C. (2001): Genetics and sexual behavior of the pheromone producer *Clamydomonas allensworthii* (Chlorophyceae). In: *J. Phycol.* 37 (2), S. 345–349.
- Consalvey, M.; Paterson, D.,M.; Underwood, G.,J.C. (2004): The ups and downs of life in a benthic biofilm: Migration of benthic diatoms. In: *Diatom Res.* 19 (2), S. 181–202.
- D’Alelio, D.; Amato, A.; Luedeking, A.; Montresor, M. (2009): Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. In: *Harmful Algae* 8 (2), S. 225–232.
- Davidovich, N. A.; Bates, S. S. (1998): Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). In: *J. Phycol.* 34 (1), S. 126–137.
- Davidovich, N. A.; Kaczmarska, I.; Karpov, S. A.; Davidovich, O. I.; MacGillivray, M. L.; Mather, L. (2012): Mechanism of male gamete motility in araphid pennate diatoms from the genus *Tabularia* (Bacillariophyta). In: *Protist* 163 (3), S. 480–494.
- Davidovich, N. A.; Mouget, J.-L.; Gaudin, P. (2009): Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). In: *Euro. J. Phycol.* 44 (2), S. 251–261.
- Degrassi, G.; Aguilar, C.; Bosco, M.; Zahariev, S.; Pongor, S.; Venturi, V. (2002): Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Cross-Talk with quorum sensing bacterial sensors. In: *Curr. Microbiol.* 45 (4), S. 250–254.
- Ding, Z.; Bao, Z.; Yang, X.; Jiang, M. (2003): Three cyclic dipeptides from the root of *Psammosilene tunicoides*. In: *J. Chin. Materia Medica* 28 (4), S. 337.
- Dührkop, K.; Scheubert, K.; Bocker, S. (2013): Molecular formula identification with SIRIUS. In: *Metabolites* 3 (2), S. 506–516.
- Edlund, M. B.; Stoermer, E. F. (1997): Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. In: *J. Phycol.* 33 (6), S. 897–918.
- Eliyahu, D.; Mori, K.; Takikawa, H.; Leal, W. S.; Schal, C. (2004): Behavioral activity of stereoisomers and a new component of the contact sex pheromone of female german cockroach, *Blattella germanica*. In: *J. Chem. Ecol.* 30 (9), S. 1839–1848.

- Ender, F.; Hallmann, A.; Amon, P.; Sumper, M. (1999): Response to the sexual pheromone and wounding in the green alga *Volvox*: Induction of an extracellular glycoprotein consisting almost exclusively of hydroxyproline. In: *J. Biol. Chem.* 274 (49), S. 35023–35028.
- Falkowski, P. G. (1998): Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. In: *Science* 281 (5374), S. 200–206.
- Farran, D.; Echalié, D.; Martínez, J.; Dewynter, G. (2009): Regioselective and sequential reactivity of activated 2,5-diketopiperazines. In: *J. Pept. Sci.* 15 (7), S. 474–478.
- Fdhila, F.; Vázquez, V.; Sánchez, J. L.; Riguera, R. (2003): DD-diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. In: *J. Nat. Prod.* 66 (10), S. 1299–1301.
- Field, C. B. (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. In: *Science* 281 (5374), S. 237–240.
- Fischer, E.; Schrauth, W. (1907): Aufspaltung von Diketopiperazinen und Dipeptide des Tyrosins. In: *Liebigs Ann. Chem.* 354 (1), S. 21–38.
- Florance, J.; Galdes, Z.; Konteatis, Z.; Kosarych, K.; Langer, K.; Martucci, C. (1987): High-Performance liquid chromatographic separation of peptide and amino acid stereoisomers. In: *J. Chromatogr. A* 414, S. 313–322.
- Florance, J.; Konteatis, Z. (1991): Chiral high-performance liquid chromatography of aromatic cyclic dipeptides using cyclodextrin stationary phases. In: *J. Chromatogr. A* 543, S. 299–305.
- Fry, W. E.; Goodwin, S. B. (1997): Resurgence of the irish potato famine fungus. In: *BioScience* 47 (6), S. 363–371.
- Fukumoto, R.; Dohmae, N.; Takio, K.; Satoh, S.; Fujii, T.; Sekimoto, H. (2002): Purification and characterization of a pheromone that induces sexual cell division in the unicellular green alga *Closterium ehrenbergii*. In: *Plant Physiol. Bioch.* 40 (2), S. 183–188.
- Fukumoto, R.; Fujii, T.; Sekimoto, H. (1998): A newly identified chemotactic sexual pheromone from *Closterium ehrenbergii*. In: *Sex. Plant Reprod.* 11 (2), S. 81–85.

- Fukumoto, R.; Fujii, T.; Sekimoto, H. (2005): Cloning and characterization of a cDNA encoding a sexual cell division-inducing pheromone from a unicellular green alga *Closterium ehrenbergii* (Chlorophyta). In: *J. Phycol.* 39 (5), S. 931–936.
- Fukumoto, R.-h.; Fujii, T.; Sekimoto, H. (1997): Detection and evaluation of a novel sexual pheromone that induces sexual cell division of *Closterium ehrenbergii* (Chlorophyta). In: *J. Phycol.* 33 (3), S. 441–445.
- Fuqua, C.; Greenberg, E. P. (2002): Signalling: Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (9), S. 685–695.
- Furtado, N. A. J. C.; Pupo, M. T.; Carvalho, I.; Campo, V. L.; Duarte, M. C. T.; Bastos, J. K. (2005): Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. In: *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (6b), S. 1448–1453.
- Giessen, T. W.; von Tesmar, Alexander M.; Marahiel, M. A. (2013): Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides. In: *Chem. Biol.* 20 (6), S. 828–838.
- Gilav, E.; Feibush, B.; Charless, R. (1966): Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. In: *Tetrahedron Lett.* (10), S. 1009.
- Gillard, J. (2009): The pennate diatom life cycle: a genetic, physiological and biochemical study using *Seminavis robusta* as a new experimental model. Dissertation. Ghent University, Ghent. Laboratorium voor Protistologie en Aquatische Ecologie.
- Gillard, J.; Devos, V.; Huysman, M. J.; Veylder, L. de; D'Hondt, S.; Martens, C. *et al.* (2008): Physiological and transcriptomic evidence for a close coupling between chloroplast ontogeny and cell cycle progression in the pennate diatom *Seminavis robusta*. In: *Plant Physiol.* 148 (3), S. 1394–1411.
- Godl, K.; Hallmann, A.; Rappel, A.; Sumper, M. (1995): Pherophorins: a family of extracellular matrix glycoproteins from *Volvox* structurally related to the sex-inducing pheromone. In: *Planta* 196 (4), S. 781–787.
- Goodenough, U.; Lin, H.; Lee, J.-H. (2007): Sex determination in *Chlamydomonas*. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 18 (3), S. 350–361.

- Graz, C.; Grant, G.; Brauns, S.; Hunt, A.; Jamie, H.; Milne, P. (2000): Cyclic dipeptides in the induction of maturation for cancer therapy. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (1), S. 75–82.
- Gu, B.; He, S.; Yan, X.; Zhang, L. (2013a): Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (19), S. 8439–8453.
- Gu, Q.; Fu, L.; Wang, Y.; Lin, J. (2013b): Identification and characterization of extracellular cyclic dipeptides as quorum-sensing signal molecules from *Shewanella baltica*, the specific spoilage organism (SSO) of *Pseudosciaena crocea* during 4 degrees C storage. In: *J. Agric. Food Chem.*, S. 11645–11652.
- Guillard, R. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*, S. 26–60.
- Haas, E.; Sumper, M. (1991): The sexual inducer of *Volvox carteri*. In: *FEBS Letters* 294 (3), S. 282–284.
- Hallmann, A.; Godl, K.; Wenzl, S.; Sumper, M. (1998): The highly efficient sex-inducing pheromone system of *Volvox*. In: *Trends Microbiol.* 6 (5), S. 185–189.
- Hamm, C. E.; Merkel, R.; Springer, O.; Jurkojc, P.; Maier, C.; Prectel, K.; Smetacek, V. (2003): Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. In: *Nature* 421 (6925), S. 841–843.
- Haniotakis, G.; Francke, W.; Mori, K.; Redlich, H.; Schurig, V. (1986): Sex-specific activity of (R)-(-)- and (S)-(+)-1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, the major pheromone of *Dacus oleae*. In: *J. Chem. Ecol.* 12 (6), S. 1559–1568.
- Hara, S.; Dobashi, A.; Kinoshita, K.; Hondo, T.; Saito, M.; Senda, M. (1986): Carbon dioxide supercritical fluid chromatography on a chiral diamide stationary phase for the resolution of D- and L-amino acid derivatives. In: *J. Chromatogr. A* 371, S. 153–158.
- Hay, M. E.; Piel, J.; Boland, W.; Schnitzler, I. (1998): Seaweed sex pheromones and their degradation products frequently suppress amphipod feeding but rarely suppress sea urchin feeding. In: *Chemoecology* 8 (2), S. 91–98.
- Hildebrand, M. (2008): Diatoms, biomineralization processes, and genomics. In: *Chem. Rev.* 108 (11), S. 4855–4874.

- Hill, G. J. C.; Cunningham, M. R.; Byrne, M. M.; Ferry, T. P.; Halvorson, J. S. (1989): Chemical control of androspore morphogenesis in *Oedogonium donnellii* (Chlorophyta, oedogoniales). In: *J. Phycol.* 25 (2), S. 368–376.
- Hillbur, Y.; Bengtsson, M.; Löfqvist, J.; Biddle, A.; Pillon, O.; Plass, E. *et al.* (2001): A chiral sex pheromone system in the pea midge, *Contarinia pisi*. In: *J. Chem. Ecol.* 27 (7), S. 1391–1407.
- Hoham, R.; Marcarelli, A.; Rogers, H.; Ragan, M.; Petre, B.; Ungerer, M. *et al.* (2000): The importance of light and photoperiod in sexual reproduction and geographical distribution in the green snow alga, *Chloromonas sp.-D* (Chlorophyceae, Volvocales). In: *Hydrol. Process.* 14 (18), S. 3309–3321.
- Holden, M. T.; Ram Chhabra, S.; Nys, R. de; Stead, P.; Bainton, N. J.; Hill, P. J. *et al.* (1999): Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. In: *Mol. Microbiol.* 33 (6), S. 1254–1266.
- Hoye, T. R.; Dvornikovs, V.; Fine, J. M.; Anderson, K. R.; Jeffrey, C. S.; Muddiman, D. C. *et al.* (2007): Details of the structure determination of the sulfated steroids PSDS and PADS: New components of the Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*) migratory pheromone. In: *J. Org. Chem.* 72 (20), S. 7544–7550.
- Hsiao, S. I. C.; Druehl, L. D. (1973): Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. IV. *In situ* development of gametophytes and young sporophytes. In: *J. Phycol.* 9 (2), S. 160–164.
- Huberman, L.; Gollop, N.; Mumcuoglu, K. Y.; Breuer, E.; Bhusare, S. R.; Shai, Y.; Galun, R. (2007): Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. In: *Med. Vet. Entomol.* 21 (2), S. 127–131.
- Hughes, D. T.; Sperandio, V. (2008): Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. In: *Nat. Rev. Micro.* 6 (2), S. 111–120.
- Ianora, A.; Bentley, M. G.; Caldwell, G. S.; Casotti, R.; Cembella, A. D.; Engström-Öst, J. *et al.* (2011): The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: an emerging field. In: *Mar. Drugs* 9 (9), S. 1625–1648.

Idei, M.; Osada, K.; Sato, S.; Toyoda, K.; Nagumo, T.; Mann, D. G.; Waller, R. F. (2012): Gametogenesis and auxospore development in *Actinocyclus* (Bacillariophyta). In: *PLoS ONE* 7 (8), S. 1–15.

Imaizumi, M.; Sekimoto, H.; Noguchi, T. (2007): Induction of sex pheromone secretion and observations of the secretory pathway in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. In: *Plant Sci.* 173 (2), S. 206–212.

Ishida, K. (2007): Sexual pheromone induces diffusion of the pheromone-homologous polypeptide in the extracellular matrix of *Volvox carteri*. In: *Eukaryot. Cell* 6 (11), S. 2157–2162.

Jaenicke, L. (1982): *Volvox* biochemistry comes of age. In: *Trends Biochem. Sci.* 7 (2), S. 61–64.

Jaenicke, L.; Feldwisch, O.; Merkl, B.; Cremer, A.; Haas, I. G. (1993): Expression of highly active sex-inducing pheromone of *Volvox carteri f. nagariensis* in a mammalian cell system. In: *FEBS Letters* 316 (3), S. 257–260.

Jaenicke, L.; Marner, F. J. (1995): Lurlene, the sexual pheromone of the green flagellate *Chlamydomonas allensworthii*. In: *Liebigs Ann. Chem.* (7), S. 1343–1345.

Jaenicke, L.; Starr, R. C. (1996): The lurlenes, a new class of plastoquinone-related mating pheromones from *Chlamydomonas allensworthii* (Chlorophyceae). In: *Eur. J. Biochem.* 241 (2), S. 581–585.

Jainta, M.; Nieger, M.; Bräse, S. (2008): Microwave-assisted stereoselective one-pot synthesis of symmetrical and unsymmetrical 2,5-diketopiperazines from unprotected amino acids. In: *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (32), S. 5418–5424.

Jung, M.; Schurig, V. (1993): Extending the scope of enantiomer separation by capillary supercritical fluid chromatography on immobilized polysiloxane-anchored permethyl- β -cyclodextrin (Chirasil-Dex). In: *J. High Resol. Chromatogr.* 16 (4), S. 215–223.

Kaczmarzka, I.; Poulíčková, A.; Sato, S.; Edlund, M. B.; Idei, M.; Watanabe, T.; Mann, D. G. (2013): Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages. In: *Diatom Res.* 28 (3), S. 263–294.

Kanzaki, H.; Mizuta, N.; Nitoda, T.; Kawazu, K. (2000): Novel diketopiperazine metabolism in a microorganism: Two-step hydrolysis of Cyclo(Gly-Leu) to amino acids

- and preliminary characterization of cyclo(Gly-Leu) hydrolase and dipeptidase. In: *J. Biosci. Bioeng.* 89 (6), S. 602–605.
- Karlson, P.; Butenandt, A. (1959): Pheromones (Ectohormones) in Insects. In: *Annu. Rev. Entomol.* 4 (1), S. 39–58.
- Karlson, P.; Lüscher, M. (1959): ‘Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances. In: *Nature* 183 (4653), S. 55–56.
- Kirk, D.; Birchem, R.; King, N. (1986): The extracellular matrix of *Volvox* - A comparative study and proposed system of nomenclature. In: *J. Cell Sci.* 80, S. 207–231.
- Kirk, D.; Kirk, M. (1986): Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. In: *Science* 231 (4733), S. 51–54.
- Klerck, K. de; Mangelings, D.; Vander Heyden, Y. (2012): Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. In: *J. Pharmaceut. Biomed.* 69, S. 77–92.
- Klesper, E.; Corwin, A. H.; Turner, D. A. (1962): High pressure gas chromatography above critical temperatures. In: *J. Org. Chem.* 27 (2), S. 700–706.
- Ko, W. (1988): Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. In: *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 (1), S. 57–73.
- Koester, J. A.; Brawley, S. H.; Karp-Boss, L.; Mann, D. G. (2007): Sexual reproduction in the marine centric diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyta). In: *Euro. J. Phycol.* 42 (4), S. 351–366.
- Kröger, N.; Poulsen, N. (2008): Diatoms—from cell wall biogenesis to nanotechnology. In: *Annu. Rev. Genet.* 42 (1), S. 83–107.
- Kumar, S. N.; Siji, J. V.; Nambisan, B.; Mohandas, C. (2012): Activity and synergistic antimicrobial activity between diketopiperazines against bacteria in vitro. In: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (8), S. 2285–2296.
- Lautru, S.; Gondry, M.; Genet, R.; Pernodet, J.-L. (2002): The Albonoursin Gene Cluster of *S. noursei* Biosynthesis of Diketopiperazine Metabolites Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. In: *Chem. Biol.* 9 (12), S. 1355–1364.

- Lecanu, L.; Hashim, A. I.; McCourty, A.; Papadopoulos, V. (2012): A steroid isolated from the water mold *Achlya heterosexalis* induces neurogenesis in vitro and in vivo. In: *Steroids* 77 (3), S. 224–232.
- Li, Q.; Du, W.; Liu, D. (2008): Perspectives of microbial oils for biodiesel production. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (5), S. 749–756.
- Li, W. (2002): Bile acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. In: *Science* 296 (5565), S. 138–141.
- Liu, Y.; Berthod, A.; Mitchell, C. R.; Xiao, T. L.; Zhang, B.; Armstrong, D. W. (2002): Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases. In: *J. Chromatogr. A* 978 (1-2), S. 185–204.
- Machlis, L. (1973): The effects of bacteria on the growth and reproduction of *Oedogonium cardiacum*. In: *J. Phycol.* 9 (3), S. 342–344.
- Machlis, L.; Hill, G. G. C.; Steinback, K. E.; Reed, W. (1974): Some characteristics of the sperm attractant from *Oedogonium cardiacum*. In: *J. Phycol.* 10 (2), S. 199–204.
- Mages, H. W.; Tschochner, H.; Sumper, M. (1988): The sexual inducer of *Volvox carteri* primary structure deduced from cDNA sequence. In: *FEBS Letters* 234 (2), S. 407–410.
- Maier, I. (1993): Gamete orientation and induction of gametogenesis by pheromones in algae and plants. In: *Plant Cell Environ.* 16 (8), S. 891–907.
- Maier, I. (1997): The fine structure of the male gamete of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae). II. The flagellar apparatus. In: *Euro. J. Phycol.* 32 (3), S. 255–266.
- Maier, I.; Calenberg, M. (1994): Effect of extracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} -antagonists on the movement and chemoorientation of male gametes of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). In: *Bot. Acta* 107 (6), S. 451–460.
- Maier, I.; Hertweck, C.; Boland, W. (2001a): Stereochemical specificity of lamoxirene, the sperm-releasing pheromone in kelp (Laminariales, Phaeophyceae). In: *Biol. Bull.* 201 (2), S. 121.
- Maier, I.; Müller, D. G. (1982): Antheridium fine structure and spermatozoid release in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). In: *Phycologia* 21 (1), S. 1–8.

- Maier, I.; Müller, D. G. (1986): Sexual pheromones in algae. In: *Biol. Bull.* 170 (2), S. 145–175.
- Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W. (2001b): Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. In: *J. Chromatogr. A* 906 (1-2), S. 3–33.
- Mann, D.; Chepurinov, V. (2005): Auxosporulation, mating system, and reproductive isolation in *Neidium* (Bacillariophyta). In: *Phycologia* 44 (3), S. 335–350.
- Mann, D. G. (1993): Patterns of sexual reproduction in diatoms. In: *Hydrobiologia* 269-270 (1), S. 11–20.
- Mann, D. G.; Droop, S. J. M. (1996): 3. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. In: *Hydrobiologia* 336 (1-3), S. 19–32.
- Mann, D. G.; Vanormelingen, P. (2013): An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. In: *J. Eukaryot. Microbiol.* 60 (4), S. 414–420.
- Martins, M. B.; Carvalho, I. (2007): Diketopiperazines: biological activity and synthesis. In: *Tetrahedron* 63 (40), S. 9923–9932.
- Matthijs, N.; Maftouh, M.; Vander Heyden, Y. (2006): Chiral separation strategy in polar organic solvent chromatography and performance comparison with normal-phase liquid and supercritical-fluid chromatography. In: *J. Sep. Sci.* 29 (10), S. 1353–1362.
- Matthijs, N.; Perrin, C.; Maftouh, M.; Massart, D.; Vander Heyden, Y. (2004): Definition and system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal- or reversed-phase liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. In: *J. Chromatogr. A* 1041 (1-2), S. 119–133.
- McClelland, K.; Milne, P. J.; Lucieto, F. R.; Frost, C.; Brauns, S. C.; Van De Venter, M. *et al.* (2004): An investigation into the biological activity of the selected histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Phe) and cyclo(His-Tyr). In: *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (9), S. 1143–1153.
- McConnell, O.; He, Y.; Nogle, L.; Sarkahian, A. (2007): Application of chiral technology in a pharmaceutical company. Enantiomeric separation and spectroscopic studies of key asymmetric intermediates using a combination of techniques. Phenylglycidols. In: *Chirality* 19 (9), S. 716–730.

- McMorris, T. C.; Arunachalam, T. (1975): Synthesis of antheridiol-(22,23-3H). In: *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 11 (4), S. 577–581.
- McMorris, T. C.; Barksdale, A. (1967): Isolation of a sex hormone from the water mould *Achlya bisexualis*. In: *Nature* 215 (5098), S. 320–321.
- McMorris, T. C.; Seshadri, R.; Weihe, G. R.; Arsenault, G. P.; Barksdale, A. (1975): Structures of oogoniol-1, -2, and -3, steroidal sex hormones of the water mold, *Achlya*. In: *J. Am. Chem. Soc.* 97 (9), S. 2544–2545.
- Miller, J. R.; Mori, K.; Roelofs, W. L. (1977): Gypsy moth field trapping and electroantennogram studies with pheromone enantiomers. In: *J. Insect. Physiol.* 23 (11-12), S. 1447–1453.
- Mori, K. (2011): Bioactive natural products and chirality. In: *Chirality* 23 (6), S. 449–462.
- Mori, K.; Takanashi, S.-i. (1996a): Stereoselective synthesis of lurlenic acid and lurlenol, the sex pheromones of the green flagellate *Chlamydomonas*. In: *Proc. Jpn. Acad. B.-Phys.* 72 (8), S. 174–177.
- Mori, K.; Takanashi, S.-i. (1996b): Synthesis of lurlene, the sex pheromone of the green flagellate *Chlamydomonas allensworthii*. In: *Tetrahedron Lett.* 37 (11), S. 1821–1824.
- Mouget, J.-L.; Gastineau, R.; Davidovich, O.; Gaudin, P.; Davidovich, N. A. (2009): Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia*. In: *FEMS Microbiol. Ecol.* 69 (2), S. 194–201.
- Mougous, J. D. (2006): A sulfated metabolite produced by *stf3* negatively regulates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (11), S. 4258–4263.
- Mougous, J. D.; Green, R. E.; Williams, S. J.; Brenner, S. E.; Bertozzi, C. R. (2002): Sulfotransferases and Sulfatases in Mycobacteria. In: *Chem. Biol.* 9 (7), S. 767–776.
- Mourier, P. A.; Eliot, E.; Caude, M. H.; Rosset, R. H.; Tambute, A. G. (1985): Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers. In: *Anal. Chem.* 57 (14), S. 2819–2823.
- Mukherjee, P. S. (2007): Validation of direct assay of an aqueous formulation of a drug compound AZY by chiral supercritical fluid chromatography (SFC). In: *J. Pharmaceut. Biomed.* 43 (2), S. 464–470.

- Müller, D. G.; Boland, W.; Jaenicke, L.; Gassmann, G. (1985): Diversification of chemoreceptors in *Ectocarpus*, *Sphacelaria* and *Adenocystis* (Phaeophyceae). In: *ACS Chem. Biol.* 40 (5-6), S. 457–459.
- Müller, D. G.; Gassmann, G. (1980): Sexual hormone specificity in *Ectocarpus* and *Laminaria* (Phaeophyceae). In: *Naturwissenschaften* 67 (9), S. 462–463.
- Müller, D. G.; Gassmann, G.; Lünig, K. (1979): Isolation of a spermatozoid-releasing and -attracting substance from female gametophytes of *Laminaria digitata*. In: *Nature* 279 (5712), S. 430–431.
- Müller, D. G.; Jaenicke, L.; Donike, M.; Akintobi, T. (1971): Sex attractant in a brown alga: chemical structure. In: *Science* 171 (3973), S. 815–817.
- Muro, T.; Tominaga, Y.; Okada, S. (1985): Purification and some properties of cyclo(Gly-Gly) hydrolase from a strain of *Bacillus*-sp No-106. In: *Agr. Biol. Chem.* 49 (6), S. 1567–1572.
- Musgrave, A.; van den Ende, H. (1987): How *Chlamydomonas* court their partners. In: *Trends Biochem. Sci.* 12, S. 470–473.
- Nagai, S.; Hori, Y.; Manabe, T.; Imai, I. (1995): Restoration of cell size by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). In: *Phycologia* 34 (6), S. 533–535.
- Nagai, S.; Imai, I. (1998): Enumeration of bacteria in seawater and sediment from the Seto Inland Sea of Japan that promote sperm formation in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). In: *Phycologia* 37 (5), S. 363–368.
- Nakamura, D.; Kakiuchi, K.; Koga, K.; Shirai, R. (2006): Design and synthesis of novel C2-symmetric chiral piperazines and an application to asymmetric acylation of σ -symmetric 1,2-diols. In: *Org. Lett.* 8 (26), S. 6139–6142.
- Nelson, D. M.; Tréguer, P.; Brzezinski, M. A.; Leynaert, A.; Quéguiner, B. (1995): Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. In: *Global Biogeochem. Cycles* 9 (3), S. 359–372.

Nimura, N.; Toyama, A.; Kasahara, Y.; Kinoshita, T. (1982): Reversed-phase liquid chromatographic resolution of underivatized D,L-amino acids using chiral eluents. In: *J. Chromatogr. A* 239, S. 671–675.

Nojiri, T.; Fujii, T.; Sekimoto, H. (1995): Purification and characterization of a novel sex pheromone that induces the release of another sex pheromone during sexual reproduction of the heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. In: *Plant Cell Physiol.* 36 (1), S. 79–84.

Nonappa; Ahonen, K.; Lahtinen, M.; Kolehmainen, E. (2011): Cyclic dipeptides: catalyst/promoter-free, rapid and environmentally benign cyclization of free amino acids. In: *Green Chem.* 13 (5), S. 1203.

Nozaki, H. (1996): Morphology and evolution of sexual reproduction in the Volvocaceae (Chlorophyta). In: *J. Plant Res.* 109 (3), S. 353–361.

Nozaki, H.; Ott, F. D.; Coleman, A. W. (2006): Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of two new species of *Pleodorina* (Volvocear, Chlorophyceae). In: *J. Phycol.* 42 (5), S. 1072–1080.

Oi, N.; Horiba, M.; Kitahara, H. (1980): Gas chromatographic separation of amino acid amide enantiomers on optically active stationary phases. In: *J. Chromatogr. A* 202 (2), S. 299–301.

Ojika, M.; Molli, S. D.; Kanazawa, H.; Yajima, A.; Toda, K.; Nukada, T. *et al.* (2011): The second *Phytophthora* mating hormone defines interspecies biosynthetic crosstalk. In: *Nat. Chem. Biol.* 7 (9), S. 591–593.

Ottiger, S.; Kluge, J.; Rajendran, A.; Mazzotti, M. (2007): Enantioseparation of 1-phenyl-1-propanol on cellulose-derived chiral stationary phase by supercritical fluid chromatography. In: *J. Chromatogr. A* 1162 (1), S. 74–82.

Park, D.-K.; Lee, K.-E.; Baek, C.-H.; Kim, I. H.; Kwon, J.-H.; Lee, W. K. *et al.* (2006): Cyclo(Phe-Pro) Modulates the Expression of ompU in *Vibrio* spp. In: *J. Bacteriol.* 188 (6), S. 2214–2221.

Parrish, D. A.; Mathias, L. J. (2002): Five- and Six-Membered Ring Opening of Pyroglutamic Diketopiperazine. In: *J. Org. Chem.* 67 (6), S. 1820–1826.

- Pätzold, R.; Theis, C.; Brückner, H. (2006): Gas-chromatographic separation of stereoisomers of dipeptides. In: *Chirality* 18 (7), S. 551–557.
- Paul, C.; Barofsky, A.; Vidoudez, C.; Pohnert, G. (2009): Diatom exudates influence metabolism and cell growth of co-cultured diatom species. In: *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 389, S. 61–70.
- Pearson, G. A. (2006): Revisiting synchronous gamete release by fucoid algae in the intertidal zone: fertilization success and beyond? In: *Integr. Comp. Biol.* 46 (5), S. 587–597.
- Perzborn, M. (2012): Mikrobielle und enzymatische Hydrolyse von cyclischen Dipeptiden (Diketopiperazine) sowie Etablierung von Analysemethoden zum Nachweis der Edukte und Produkte. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.
- Pfannerstill, E. (2012): Licht- und signalinduzierte Pheromonproduktion in *Seminavis robusta*. Bachelorarbeit. Friedrich-Schiller-Universität, Jena. Institut für Analytische und Inorganische Chemie.
- Pickett-Heaps, J.; Schmid A-M.M.; Edgar, L. (1990): The cell biology of diatom valve formation. In: *Prog. Phycol. Res.* 7, S. 1–168.
- Pohnert, G.; Boland, W. (1996): Biosynthesis of the algal pheromone hormosirene by the fresh-water diatom *Gomphonema parvulum* (Bacillariophyceae). In: *Tetrahedron* 52 (30), S. 10073–10082.
- Pohnert, G.; Boland, W. (2002): The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. In: *Nat. Prod. Rep.* 19 (1), S. 108–122.
- Pohnert, G.; Steinke, M.; Tollrian, R. (2007): Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. In: *Trends Ecol. Evol.* 22 (4), S. 198–204.
- Poulson, K. L.; Sieg, R. D.; Kubanek, J. (2009): Chemical ecology of the marine plankton. In: *Nat. Prod. Rep.* 26 (6), S. 729.
- Prasad, C. (1995): Bioactive cyclic dipeptides. In: *Peptides* 16 (1), S. 151–164.
- Prasad, C.; Matsui, T.; Peterkofsky, A. (1977): Antagonism of ethanol narcosis by histidyl-proline diketopiperazine. In: *Nature* 268 (5616), S. 142–144.

- Prince, E. K.; Pohnert, G. (2010): Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (1), S. 193–197.
- Provasoli, L.; McLaughlin, J. J. A.; Droop, M. R. (1957): The development of artificial media for marine algae. In: *Archiv. Mikrobiol.* 25 (4), S. 392–428.
- Qi, J. (2005): Characterization of a *Phytophthora* mating hormone. In: *Science* 309 (5742), S. 1828.
- Quijano-Scheggia, S.; Garcés, E.; Andree, K.; Fortuño, J. M.; Camp, J. (2009): Homothallic auxosporeulation in *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyta). In: *J. Phycol.* 45 (1), S. 100–107.
- Raven, J. A. (1983): The transport and function of silicon in plants. In: *Biol. Rev.* 58 (2), S. 179–207.
- Ren-Qi, W.; Teng-Teng, O.; Siu-Choon, N.; Weihua, T. (2012): Recent advances in pharmaceutical separations with supercritical fluid chromatography using chiral stationary phases. In: *Trends Anal. Chem.* 37, S. 83–100.
- Riisberg, I.; Orr, R. J.; Kluge, R.; Shalchian-Tabrizi, K.; Bowers, H. A.; Patil, V. *et al.* (2009): Seven Gene Phylogeny of Heterokonts. In: *Protist* 160 (2), S. 191–204.
- Roche, P.; Debellé, F.; Maillet, F.; Lerouge, P.; Faucher, C.; Truchet, G. *et al.* (1991): Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. In: *Cell* 67 (6), S. 1131–1143.
- Roumeliotis, P.; Unger, K.; Kurganov, A.; Davankov, V. (1983): High-performance ligand-exchange chromatography of α -amino acid enantiomers. In: *J. Chromatogr. A* 255, S. 51–66.
- Round, F. E.; Crawford, R. M.; Mann, D. G. (1990): Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. In: *Cambridge University Press* (Lehrbuch).
- Roy, J. S.; Poulson-Ellestad, K. L.; Drew Sieg, R.; Poulin, R. X.; Kubanek, J. (2013): Chemical ecology of the marine plankton. In: *Nat. Prod. Rep.* 30 (11), S. 1364.
- Rui, F.; Boland, W. (2010): Algal Pheromone Biosynthesis: Stereochemical Analysis and Mechanistic Implications in Gametes of *Ectocarpus siliculosus*. In: *J. Org. Chem.* 75 (12), S. 3958–3964.

- Runser, S. M.; Meyer, P. C. (1993): Purification and biochemical characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium* species. A hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity. In: *Eur. J. Biochem.* 213 (3), S. 1315–1324.
- Sabbe, K.; Chepurinov, V. A.; Mann, D. G.; Vyverman, W. (2004a): Sexual behaviour, auxosporulation and chloroplast dynamics in a marine *Amphora* (Bacillariophyceae) studied in culture. In: *Bot. Mar.* 47 (1).
- Sabbe, K.; Chepurinov, V. A.; Vyverman, W.; Mann, D. G. (2004b): Apomixis in *Achnanthes* (Bacillariophyceae); development of a model system for diatom reproductive biology. In: *Euro. J. Phycol.* 39 (3), S. 327–341.
- Sabine, C. L. (2004): The oceanic sink for anthropogenic CO₂. In: *Science* 305 (5682), S. 367–371.
- Sasso, S.; Pohnert, G.; Lohr, M.; Mittag, M.; Hertweck, C. (2012): Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (4), S. 761–785.
- Sato, S.; Beakes, G.; Idei, M.; Nagumo, T.; Mann, D. G.; Lobaccaro, J.-M. A. (2011): Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms. In: *PLoS ONE* 6 (10), S. e26923.
- Savage, E.; Clayton, C.; Hunter, J.; Brennema, J.; Laviola, C.; Gallegly, M. (1968): Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. In: *Phytopathology* 58 (7), S. 1004–1021.
- Scharf, J. (2013): Untersuchungen des Auf- und Abbaus des Sexualpheromons Diprolin in *Seminavis robusta*. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität, Jena. Institut für Analytische und Inorganische Chemie.
- Schmid, C. E. (1993): Cell-Cell-Recognition during fertilization in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). In: *Hydrobiologia* 261, S. 437–443.
- Schmidt, U.; Nikiforov, A. (1975): Cis- Cycloprolylprolin-Anion - ein konfigurationsstabiles Carbanion. Zur Racernisierung von cyclo-(L-Pro-L-Pro). In: *On Amino Acids and Peptides* (13), S. 313–320.

- Schnitzler, I.; Pohnert, G.; Hay, M.; Boland, W. (2001): Chemical defense of brown algae (*Dictyopterus* spp.) against the herbivorous amphipod *Ampithoe longimana*. In: *Oecologia* 126 (4), S. 515–521.
- Scott, R.P.W (1994): Liquid Chromatography for the Analyst. 1. Aufl.: CRC Press.
- Sekimoto, H.; Abe, J.; Tsuchikane, Y. (2012): New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. In: *Int. Rev. Cel. Mol. Bio.* 297, S. 309–338.
- Sekimoto, H.; Satoh, S.; Fujii, T. (1990): Biochemical and physiological properties of a protein inducing protoplast release during conjugation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. In: *Planta* 182 (3), S. 348–354.
- Sieg, R. D.; Poulson-Ellestad, K. L.; Kubanek, J. (2011): Chemical ecology of the marine plankton. In: *Nat. Prod. Rep.* 28 (2), S. 388.
- Snell, W. J. (1985): Cell-cell interactions in *Chlamydomonas*. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36 (1), S. 287–315.
- Sorensen, P. W.; Fine, J. M.; Dvornikovs, V.; Jeffrey, C. S.; Shao, F.; Wang, J. *et al.* (2005): Mixture of new sulfated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey. In: *Nat. Chem. Biol.* 1 (6), S. 324–328.
- Spoerner, M.; Wichard, T.; Bachhuber, T.; Stratmann, J.; Oertel, W. (2012): Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors. In: *J. Phycol.* 48 (6), S. 1433–1447.
- Starr, R. C. (1960): The culture collection of algae at Indiana University. In: *Am. J. Bot.* 47 (1), S. 67.
- Starr, R. C. (1974): Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri f. nagariensis* Iyengar. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (4), S. 1050–1054.
- Starr, R. C. (1980): L-Glutamic acid as a mediator of sexual morphogenesis in *Volvox capensis*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (2), S. 1025–1028.
- Starr, R. C.; Marnier, F. J.; Jaenicke, L. (1995): Chemoattraction of male gametes by a pheromone produced by female gametes of *Chlamydomonas*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (2), S. 641–645.

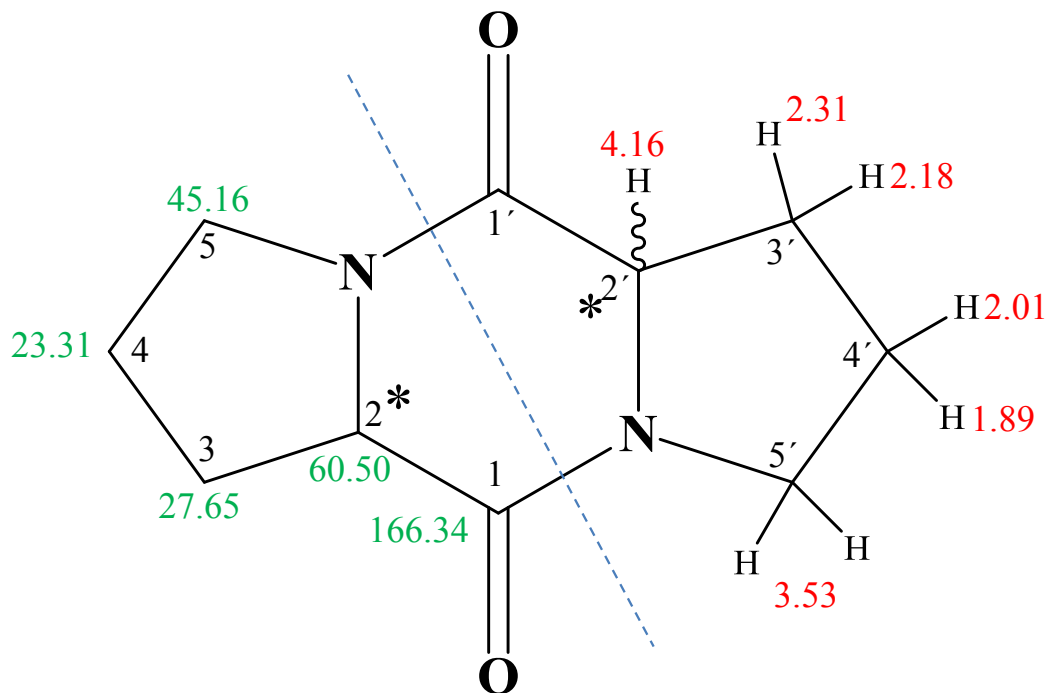
- Stratmann, J.; Paputsoglu, G.; Oertel, W. (1996): Differentiation of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) gametangia and gamete release are controlled by extracellular inhibitors. In: *J. Phycol.* 32 (6), S. 1009–1021.
- Stratmann, K.; Boland, W.; Müller, D. G. (1992): Pheromones of Marine Brown Algae; A New Branch of the Eicosanoid Metabolism. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (9), S. 1246–1248.
- Sumper, M.; Berg, E.; Wenzl, S.; Godl, K. (1993): How a sex-pheromone might act at a concentration below 10^{-16} M. In: *Embo J.* 12 (3), S. 831–836.
- Sumper, M.; Hallmann, A. (1998): Biochemistry of the extracellular matrix of *Volvox* 180, S. 51–58.
- Szejtli, J. (1982): Cyclodextrins and their inclusion complexes. In: *Starch* 34 (11), S. 395.
- Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Rinehart, D.; Siuzdak, G. (2012): XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. In: *Anal. Chem.* 84 (11), S. 5035–5039.
- Terfloth, G. (2001): Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. In: *J. Chromatogr. A* 906 (1-2), S. 301–307.
- Theriot, E. C. (2010): A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. In: *Plecevo* 143 (3), S. 278–296.
- Tillman, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J. (1999): Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. In: *Insect Biochem. Molec.* 29 (6), S. 481–514.
- Tschochner, H.; Lottspeich, F.; Sumper, M. (1987): The sexual inducer of *Volvox carteri* - purification, chemical characterization and identification of its gene. In: *Embo J.* 6 (8), S. 2203–2207.
- Tsubo, Y. (1961): Chemotaxis and sexual behavior in *Chlamydomonas*. In: *J. Eukaryot. Microbiol.* 8 (2), S. 114–121.
- Tsuchikane, Y. (2005): A sex pheromone, protoplast release-inducing protein (PR-IP) inducer, induces sexual cell division and production of PR-IP in *Closterium*. In: *Plant Cell Physiol.* 46 (9), S. 1472–1476.

- Tsuchikane, Y.; Ito, M.; Sekimoto, H. (2008): Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). In: *J. Phycol.* 44 (5), S. 1197–1203.
- Vanormelingen, P.; Vanelslander, B.; Sato, S.; Gillard, J.; Trobajo, R.; Sabbe, K.; Vyverman, W. (2013): Heterothallic sexual reproduction in the model diatom *Cylindrotheca*. In: *Euro. J. Phycol.* 48 (1), S. 93–105.
- Vite, J. P.; Klimetzek, D.; Loskant, G.; Hedden, R.; Mori, K. (1976): Chirality of insect pheromones - response interruption by inactive antipodes. In: *Naturwissenschaften* 63 (12), S. 582–583.
- Waters, C. M.; Bassler, B. L. (2005): Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in bacteria. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (1), S. 319–346.
- Wenzl, S.; Sumper, M. (1986): Early event of sexual induction in *Volvox*: Chemical modification of the extracellular matrix. In: *Dev. Biol.* 115 (1), S. 119–128.
- Wichard, T.; Oertel, W. (2010): Gametogenesis and gamete release of *Ulva mutabilis* and *Ulva lactuca* (Chlorophyta): regulatory effects and chemical characterization of the “swarming inhibitor”. In: *J. Phycol.* 46 (2), S. 248–259.
- William, M.; Lewis, J. R. (1984): The diatom sex clock and its evolutionary significance. In: *Am. Nat.* 123, S. 73–80.
- Williams, K. L.; Sander, L. C. (1997): Enantiomer separations on chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography. In: *J. Chromatogr. A* 785 (1-2), S. 149–158.
- Yajima, A.; Qin, Y.; Zhou, X.; Kawanishi, N.; Xiao, X.; Wang, J. *et al.* (2008): Synthesis and absolute configuration of hormone $\alpha 1$. In: *Nat. Chem. Biol.* 4 (4), S. 235–237.
- Yoshida, M.; Murata, M.; Inaba, K.; Morisawa, M. (2002): A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (23), S. 14831–14836.

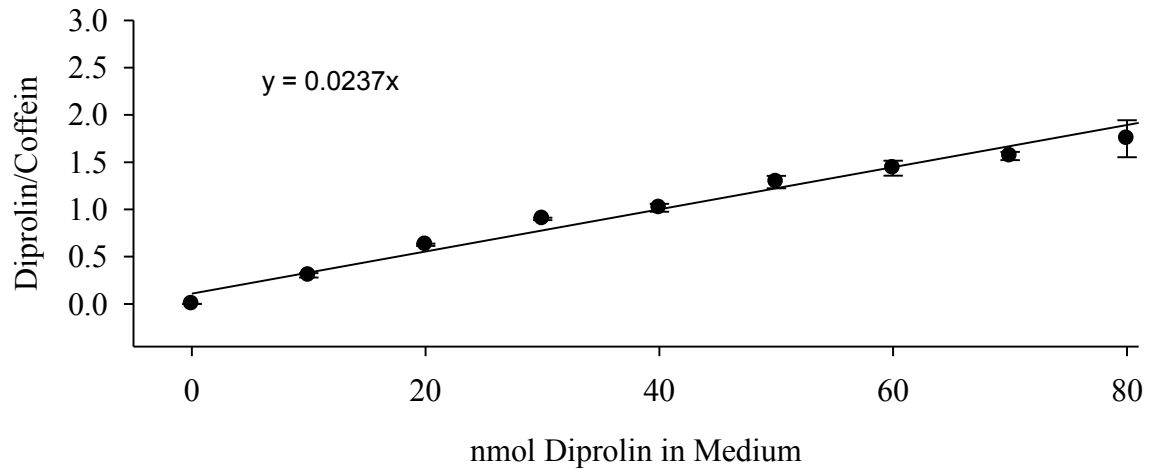
9. Anhang

Anhang 1: NMR Daten für Strukturaufklärung von Diprolin. Die Messung erfolgte an einem 400 MHz Spektrometer mit deuteriertem Chloroform als Lösungsmittel. Grüne Zahlen zeigen die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoff-Atome, rot die der Protonen.

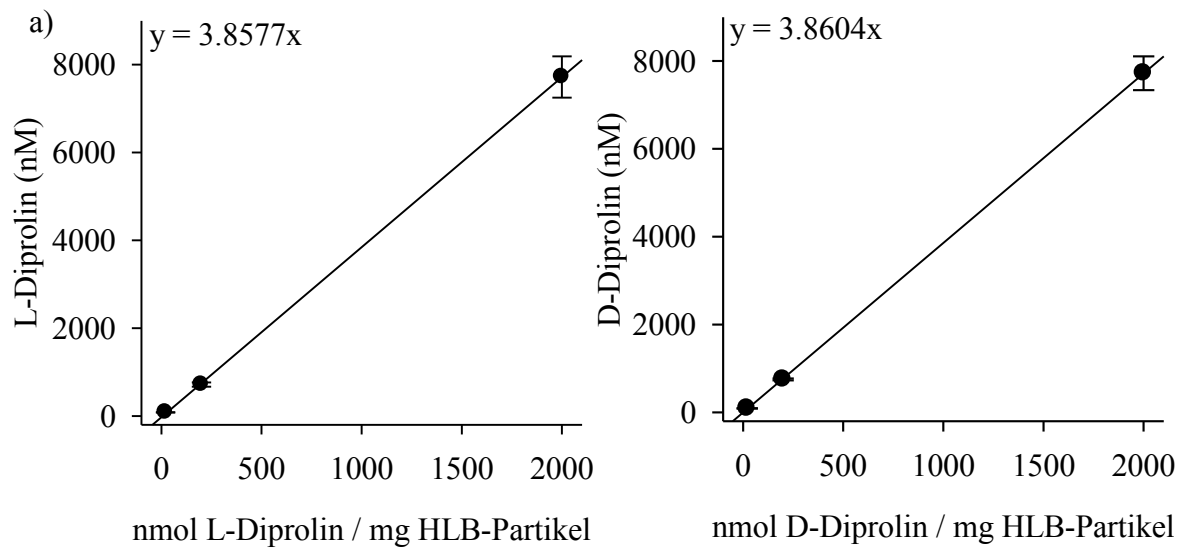
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J in Hz)	HMBC	COSY
1	166.34	X	H ₂ , H _{3A} , H _{3B} , H ₅	
2	60.5	4.165 t (8)	H _{3A} , H _{3B} , H _{4A} , H _{4B} , H ₅	H _{3A} , H _{3B}
3	27.67	2.31 m	H ₂ , H _{4A} , H _{4B} , H ₅	H ₂ , H _{3B} , H _{4A} , H _{4B}
		2.18 m		H ₂ , H _{3A} , H _{4A} , H _{4B}
4	23.31	2.03 m	H _{3A} , H _{3B} , H ₅	H _{3A} , H _{3B} , H _{4B} , H ₅
		1.89 m		H _{3A} , H _{3B} , H _{4A} , H ₅
5	45.16	3.53 dd (5.2; 8) 2H	H _{3A} , H _{3B} , H _{4A} , H _{4B}	H _{4A} , H _{4B}



Anhang 2: Kalibrationskurve über das Gesamtverfahren. Zur Kalibration von Diprolin wurde 15 nmol Coffein als interner Standard verwendet. (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 4$).



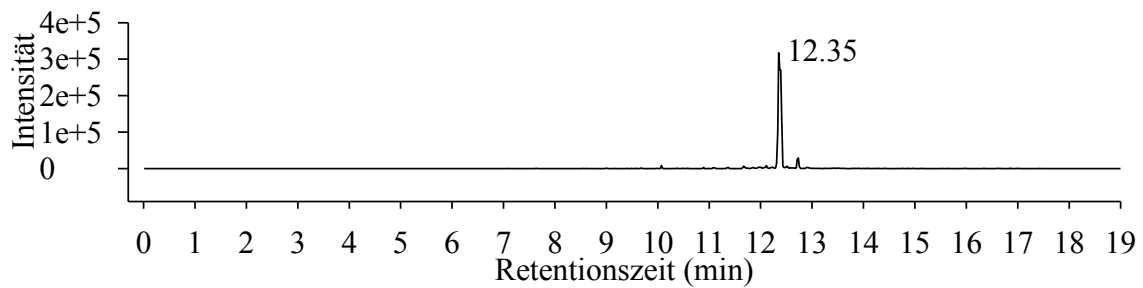
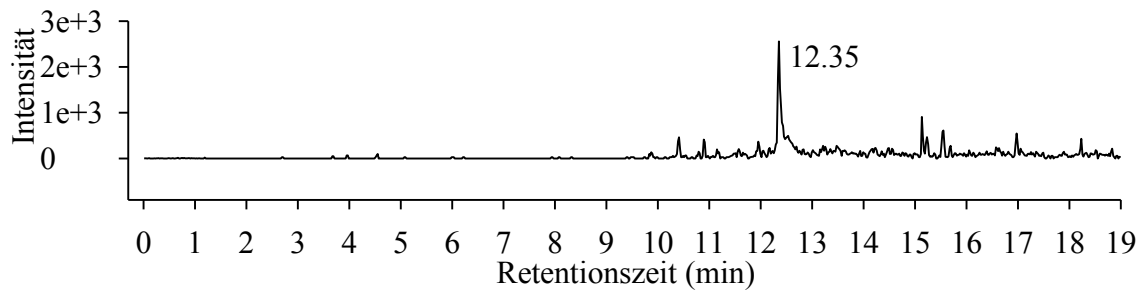
Anhang 3: Abschätzen der aktiven L- und D-Diprolinkonzentration. a) Lineare Regression mit den gemessenen Konzentration von 20 – 2000 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$, siehe Abbildung 18). b) Angabe der gemessenen Konzentrationen (kursiv) sowie der aus der Regression ermittelten Schätzwerte (fett) für die Diprolinkonzentrationen im Bereich 0.002 – 2 nmol Diprolin/mg HLB-Partikel.



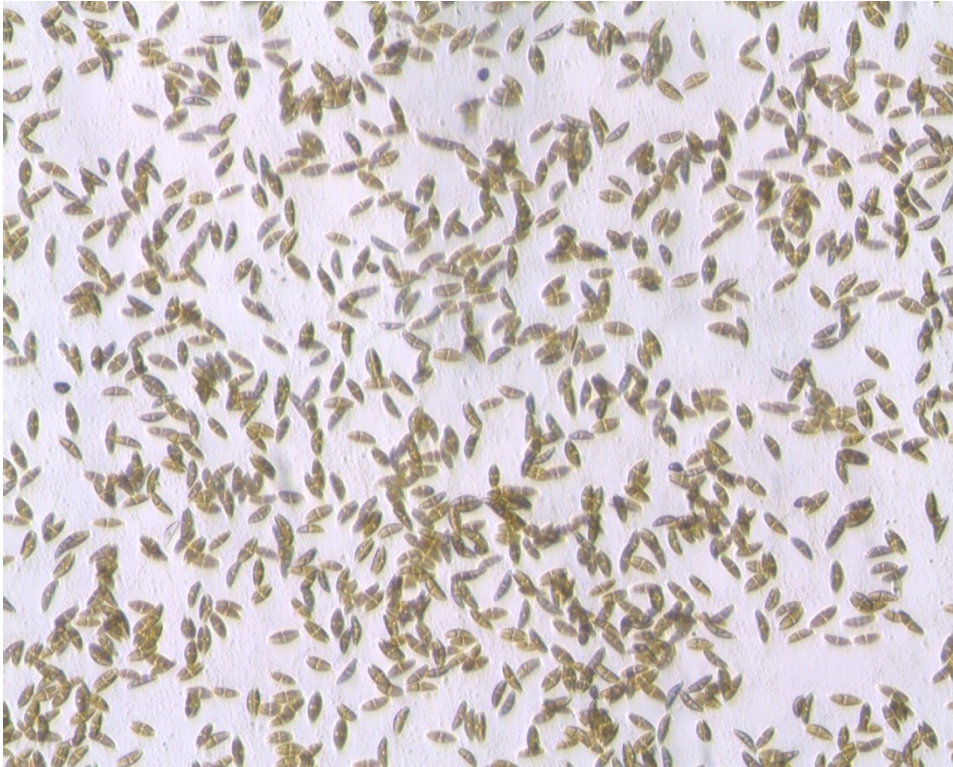
b)

Konzentration	L-Diprolin (nM)	D-Diprolin (nM)
0.002	0.0077	0.0077
0.02	0.077	0.077
0.2	0.77	0.77
2	7.7	7.7
20	87	89
200	715	749
2000	7720	7722

Anhang 4: GC/MS von Diprolin. Das intrazelluläre Extrakt aus *Pleurotus citrinopileatus* (oben) und das extrazelluläre Extrakt aus *Seminavis robusta* (unten) wurden mittels GC/MS auf das Vorkommen von Diprolin (Elution nach 12.35 min) untersucht. Im Chromatogramm ist die Massenspur $m/z = 194$ (Molekülion von Diprolin) dargestellt.



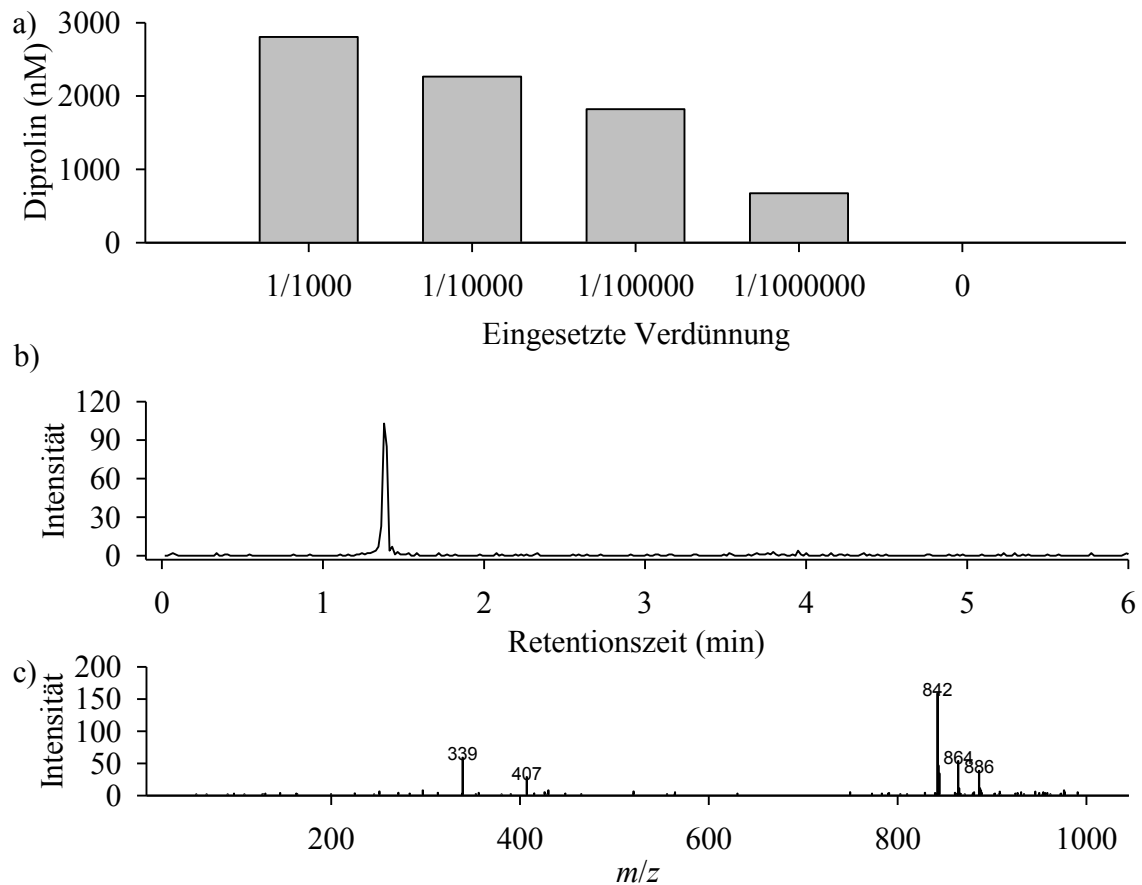
Anhang 5: Antibiotikabehandlung von *S. robusta*. Oberes Bild: Kultur vor Antibiotikabehandlung. Die Algen umgebende weiße Erhebungen stellen Bakterienkolonien dar. Unteres Bild: Kultur nach Antibiotikabehandlung. Die Bakterienkolonien sind deutlich reduziert, dafür werden Pilzhyphen sichtbar.



Anhang 6: Verlust von Wasser im MS² Spektrum von SIP⁺. Dargestellt sind die Fragmente des anionisierten Moleküls [M-H]⁻ mit $m/z = 842$. Die Fragmentation wurde in einem qTOF-MS durch kollisionsinduzierte Dissoziation mit Argon als Kollisionsgas bei einer Kollisionsenergie von 30eV durchgeführt. Zwischen den Fragmenten 1 und 2 ist ein Masseabgang detektierbar, welcher eine geringe Massendifferenz zu Wasser aufweist.

Fragment 1	Fragment 2	Verlust von	ΔH_2O
706.26	688.26	17.98 Da	0.03
688.27	670.27	17.99 Da	0.02
670.28	652.28	18.00 Da	0.01
649.26	631.26	17.99 Da	0.02
640.33	622.33	18.02 Da	-0.01
615.28	597.28	17.98 Da	0.03
583.31	565.31	18.03 Da	-0.02
405.22	387.22	17.97 Da	0.04
348.26	330.26	18.01 Da	0.00
330.25	312.25	17.99 Da	0.02

Anhang 7: Gereinigtes SIP⁺ für NMR. a) Diprolin-Induktion in MT⁻ durch verschiedene Verdünnungen der NMR-Fraktion. b) SIP⁺ in 1/2000 der NMR-Fraktion mit c) korrespondierendes Massenspektrum, aufgenommen im negativen ESI-Modus. Im Chromatogramm ist die Massenspur des anionisierten Moleküls [M-H]⁻ mit $m/z = 842$ dargestellt.



Anhang 8: Diprolinproduktion in verschiedenen Paarungsgruppen. Induktion der Diprolinproduktion (blau) in den MT⁻ Stämmen P34 und P30 mit dem zellfreiem Überstand der MT⁺ Stämme P36, P13 sowie mit SIP⁺, welches aus dem Stamm 85A isoliert wurde. P34, P36 und 85A bilden eine Paarungsgruppe (rot), sowie P30 und P13 (grün). (Mittelwert ± Standardfehler, n = 3).

Stamm	nM Diprolin	nM Diprolin
MT ⁺ MT	P34	P30
P36	912.4 ± 465.9	369.4 ± 79.5
P13	1062.9 ± 557.4	597.9 ± 530.7
SIP ⁺ (85A+)	678.9 ± 472.9	136.1 ± 99.4

Danksagung

Diese Arbeit wäre niemals ohne die Hilfe von vielen Menschen entstanden, denen ich hier danken möchte. Zunächst möchte ich meiner Familie für Ihre Unterstützung während meines Studiums und den Rest meines Lebens danken.

Großer Dank gilt Professor Georg Pohnert, dass er mir das Thema zu Verfügung gestellt und zudem die Möglichkeit gegeben hat, auf dem Gebiet der analytischen Chemie zu arbeiten. Zudem möchte ich ihn für seine stetige, tatkräftige Unterstützung danken, sowohl während der Forschungsarbeiten, als auch beim Verfassen von Publikationen und der Dissertationsschrift. Ebenso möchte ich Professor Boland für seine Funktion als Zweitgutachter und Professor Kröger als Drittgutachter danken. Großer Dank gilt meinen Kooperationspartnern, insbesondere Professor Wim Vyverman und Jeroen Gillard, ohne deren Mithilfe und Vorarbeiten auf dem Gebiet diese Forschung niemals zustande gekommen wäre. Zudem danke ich Valerie Devos, welche mir die Arbeit mit den Diatomeen näher gebracht hat sowie Pieter Vanormelingen und Olga Chepurnova, welche mir stets einen Nachschub an frischen *Seminavis robusta* Stämmen geliefert haben.

Großer Dank gilt der IMPRS (International Max Planck Research School) für das Stipendium und dafür, dass mir die Forschungsaufenthalte in Belgien ermöglicht wurden.

Die drei Jahre Arbeit haben mir großen Spaß gemacht, was der ganzen Arbeitsgruppe zu verdanken ist. Vielen Dank an die Frauen und Tinos Oma, welche immer für einen reichhaltigen Nachschub an Kuchen gesorgt und soziale Aktivitäten organisiert haben. Ebenso werde ich die spaßigen Kicker- und Doppelkopffrunden nie vergessen. Ich danke Carsten und Martin, welche mir am Anfang sehr geholfen haben, mich mit allem zurechtzufinden. Vielen Dank an Björn, Thomas und Jan für die zahlreichen Tipps, an Phillip für seine Hilfe bei Fahrrad- und Computersachen und an Dominique für die Auswertung der NMR-Daten. Hannes sei gedankt für die Medien-Zubereitung und dass er sich um alles sofort gekümmert hat.

Für ihre Zuarbeiten in den Bachelor- und Diplomarbeiten möchte ich Eva und Julia danken. Außerdem danke ich Conny, Björn, Ralf und Christine für die kritische Durchsicht meiner Doktorarbeit, es war sicherlich nicht immer leicht. Ich danke Doktor Perner, Doktor Kai und Doktor Schneider für die Durchführung der NMR- und Orbitrap-Messungen sowie Doktor Wess für die SFC-Analysen.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Johannes Frenkel
Geburtsdatum: 01.09.1986
Geburtsort: Leipzig
Nationalität: Deutsch
E-Mail: johannes_frenkel@outlook.de
Telefon: 0151 577 93330

AUSBILDUNG

01/2011 – 12/2013 Stipendiat der International Max Planck Research School (IMPRS)
01/2011 – 03/2014 Doktorand an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Arbeitsgruppe Bioorganische Analytik – Professor Pohnert
10/2006 – 12/2010 Diplom in Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie
Arbeitsgruppe Professor Diekert
08/1998 – 07/2005 Abitur, Geschwister-Scholl-Gymnasium, Taucha

LEHRTÄTIGKEIT

2011 – 2012 Praktikumsbetreuung für Bachelor-Studenten (FSU Jena)
2012 Betreuung einer Bachelorarbeit (FSU Jena)
2013 Betreuung einer Diplomarbeit (FSU Jena)

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

02/2011 – 03/2011 Aufenthalt an der Universität Ghent (Belgien)
10/2008 – 09/2010 Hilfwissenschaftler am Institut für Mikrobiologie,
Arbeitsgruppe Mikrobielle Kommunikation
07/2009 – 09/2009 Praktikum an der Universität Clemson (USA)

Konferenzen

22TH INTERNATIONAL DIATOM SYMPOSIUM, Ghent, BE, Aug 2012, Präsentation: “Investigation of the mating pathway in the diatom *Seminavis robusta*”. Auszeichnung für den besten Vortrag.

Publikationen

Frenkel, J.; Gillard, J.; Devos, V.; Vyverman, W.; Pohnert, G. (2014): A sulfated pheromon induces cell cycle arrest and production of the attractant diproline in the diatom *Seminavis robusta*. Für: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Status: In Bearbeitung).

Frenkel, J.; Vyverman, W.; Pohnert, G. (2014): Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. In: *Plant J.* (Status: Zur Publikation akzeptiert, in Revision).

Frenkel, J.; Wess, C.; Vyverman, W.; Pohnert, G. (2014): Chiral separation of a diketopiperazine pheromone from marine diatoms using supercritical fluid chromatography. In: *J. Chrom. B* 951-952, S. 58–61.

Gillard, J*.; **Frenkel, J*.**; Devos, V*.; Sabbe, K.; Paul, C.; Rempt, M. *et al.* (2013): Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (3), S. 854–857. * geteilte Erstautorenschaft

Teile der vorliegenden Arbeit waren die Grundlage zu den oben genannten Publikationen.

Jena,

Johannes Frenkel

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena,

Johannes Frenkel

