

Analytische Charakterisierung von
Struktur und Biosynthese der Nudicauline
aus gelben *Papaver nudicaule* L. Blüten

Dissertation

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

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

von Frau Diplomchemikerin (Umweltchemie) Anne-Christin Warskulat
geboren am 13.05.1987 in Sömmerda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen W. Einax, Jena
2. PD Dr. Bernd Schneider, Jena
3. apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich, München

Tag der Verteidigung: 11. November 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Symbolverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	4
2.1 <i>P. nudicaule</i>	4
2.2 Blütenfarbstoffe in Pflanzen	5
2.2.1 Allgemeine Aspekte	5
2.2.2 Anthocyane	6
2.2.3 Ökologische Bedeutung von Duft und Blütenfarbe für Pflanzen	8
2.2.4 Farbstoffe in <i>P. nudicaule</i> Blüten	11
2.2.5 Studien zu Nudicaulin aus <i>P. nudicaule</i>	13
2.2.6 Weitere Nudicauline in der Literatur	15
2.3 Ansätze zur Biosyntheseaufklärung	17
2.3.1 Biosynthesenetzwerk	17
2.3.2 Ansatz A - Fütterungsexperimente	18
2.3.3 Ansatz B - Enzymassays	20
2.3.4 Ansatz C - genmodifizierte Pflanzenlinien	21
2.4 Hintergrund zur Nudicaulinbiosynthese	22
2.4.1 Allgemeines	22
2.4.2 Bildung von Shikimisäure	22
2.4.3 Indolbiosynthese	23
2.4.4 Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin	24
2.4.5 Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese	25
2.4.6 ¹³ CO ₂ -Studie zur Nudicaulinbiosynthese	28
2.5 NMR-Spektroskopie	30
2.5.1 Grundlegende Aspekte	30
2.5.2 Impuls-Experimente	32
2.5.3 Chemische Verschiebung	33

2.5.4	Spin-Spin-Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum	34
2.5.5	Kopplungskonstante J im ^1H -NMR-Spektrum	35
2.5.6	Intensität der Signale im ^1H -NMR-Spektrum	35
2.5.7	^{13}C -NMR-Spektroskopie	35
2.5.8	Verfahren der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie	36
2.6	Massenspektrometrie	37
2.7	Auswertung von ^{13}C -Fütterungsexperimenten	39
2.7.1	Bedeutung von ^{13}C im NMR- und MS-Spektrum	39
2.7.2	Massenspektrometrie zur Analyse von ^{13}C -Anreicherung	41
2.7.3	NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der ^{13}C -Anreicherung	42
2.8	Multivariat-statistische Auswertemethoden	44
2.8.1	Clusteranalyse	45
2.8.2	Lineare Diskriminanzanalyse	46
2.8.3	Hauptkomponentenanalyse	47
3	Experimentelles	49
3.1	Pflege der <i>P. nudicaule</i> Kultivare	49
3.2	Synthesen	49
3.2.1	Hydrierung der Nudicauline	49
3.2.2	Methylierung der Nudicauline	50
3.2.3	Enzymatische Hydrolyse der Nudicauline	50
3.2.4	Darstellung von $[2-^{13}\text{C}]-p$ -Cumarsäure	51
3.2.5	Herstellung von $[^{13}\text{C}_{10}]$ Tryptamin	51
3.3	Durchführung der Experimente	52
3.3.1	Fütterungsexperimente	52
3.3.2	Trennungsgang und Nudicaulinisolation	53
3.3.3	Einteilung Entwicklungsstadien	54
3.3.4	Duftsammlung	55
3.3.5	Probenvorbereitung Proteomanalyse	55
3.3.6	Probenvorbereitung Transkriptomanalyse	58
3.3.7	Maßnahmen zur Qualitätssicherung	59

4	Auswertung der Ergebnisse	64
4.1	Strukturaufklärung	64
4.1.1	HSQC- und HMBC-Korrelationen im Nudicaulin I	65
4.1.2	Hydrierung	67
4.1.3	Methylierung	68
4.1.4	Enzymatische Hydrolyse	68
4.1.5	Relative und absolute Konfiguration	69
4.1.6	Fazit zur Strukturaufklärung	72
4.2	Auswertung der Fütterungsexperimente	72
4.2.1	Universal markierte Glucose	73
4.2.2	Universal markiertes Phenylalanin	75
4.2.3	[2- ¹³ C]Tyrosin und [2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	77
4.2.4	[¹³ C ₂]Acetat	78
4.2.5	[ring- ¹³ C ₆]Anthranilsäure	80
4.2.6	Universal markiertes Tryptophan und Tryptamin	81
4.2.7	[2- ¹³ C]Indol	81
4.2.8	Fazit zu den Fütterungsexperimenten	82
4.3	Einteilung der Blütenentwicklung in Stadien	84
4.3.1	Ansätze zur Einteilung der Entwicklungsstadien	84
4.3.2	Clusteranalyse	85
4.3.3	Lineare Diskriminanzanalyse	86
4.3.4	Nudicauline in den Entwicklungsstadien	90
4.3.5	Fazit zur Einteilung der Entwicklungsstadien	91
4.4	Zusammenhang von Duft und Blütenfarbe in <i>P. nudicaule</i>	93
4.4.1	Analyse und Vergleich der Duftprofile	93
4.4.2	Hauptkomponentenanalyse zur Duftzusammensetzung	95
4.4.3	Vergleich der Bouquets der weißen und gelben Blüten	96
4.4.4	Bedeutung der spektralen Reflexion der vier Blütenfarben	97
4.4.5	Freilandversuche mit künstlichen Düften und Honigbienen	98
4.4.6	Fazit zur Duftanalyse der Blütenfarben in <i>P. nudicaule</i>	100
5	Zusammenfassung und Ausblick	102

Literaturverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XX
Tabellenverzeichnis	XXIV
Anhang	XXVI
Danksagung	XXXV
Selbstständigkeitserklärung	XXXVI
Lebenslauf	XXXVII

Abkürzungsverzeichnis

2D-DIGE	zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese
CD	Circulardichroismusspektroskopie
CE	Kapillarelektrophorese
COSY	Correlated Spectroscopy
DAD	Diodenarraydetektion
E4P	Erythrose-4-phosphat
EC	Enzymkommissionsnummer
ES	Entwicklungsstadium
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Ameisensäure
FE	Fütterungsexperiment
FID	Freier Induktionsabfall
GC	Gaschromatographie
HMBC	Hetero Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	High Resolution
HSQC	Hetero Single Quantum Coherence
LC	Flüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
<i>P. nudicaule</i>	<i>Papaver nudicaule</i> L.
PAH	Phenylalanin-4-hydroxylase
PAL	Phenylalanin-Ammoniaklyase
PCA	Hauptkomponentenanalyse

PEP	Phosphoenolpyruvat
PTAL	Phenylalanin/Tyrosin-Ammoniaklyase
REF	Referenz
ROESY	Rotating-Frame-Overhauser-Enhancement-(Effekt)-Spektroskopie
RT	Retentionszeit
SCX	Starker Kationenaustausch
SPE	Festphasenextraktion
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolette Strahlung

Symbolverzeichnis

n	Atomanzahl
δ	Chemische Verschiebung
ν	Frequenz
γ	Gyromagnetisches Verhältnis
I	Kernspinquantenzahl
J	Kopplungskonstante
ν_L	Lamorfrequenz
B	Magnetfeld
μ	Magnetisches Moment
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
I_{FE}	Multipllettintegral
M	Multiplizität
\hbar	Reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
I_{REF}	Referenzintegral
$[M]^+$	Relative Molekülmasse / Molekülpeak
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
I_{SAT}	Satellitenintegral

1 Einleitung

Pflanzen haben eine große Bedeutung für den Menschen. Abgesehen von ihrer Nutzung als Nahrung, Tierfutter und Rohstoff wurden sie schon in der Steinzeit [1] als Genuss- und Heilmittel oder, aufgrund der Farbenvielfalt von Blüten und Blättern, zur Zierde verwendet.

Die Wirkung der Heilpflanzen beruht vor allem auf der Anwesenheit von Sekundärmetaboliten, die in den Zellkompartimenten über unterschiedliche Biosynthesewege gebildet werden [2]. Obwohl die Anzahl der Edukte aus dem Primärstoffwechsel für diese Synthesen sehr klein ist, herrscht eine große strukturelle Diversität. Das Vorkommen einzelner Verbindungen ist selten ubiquitär, sondern taxonomisch begrenzt.

Die Untersuchung von Struktur und Bioaktivität der Sekundärmetabolite stellt besonders für die pharmazeutische Industrie und Medizin eine nahezu unerschöpfliche Quelle potentieller Wirkstoffe dar [3]. Weiterhin können durch synthetische Modifikationen der bekannten Verbindungen deren Eigenschaften manipuliert oder neue generiert werden. Das Studium der Biosynthesewege gibt dabei Impulse für die Herstellung der gewünschten Substanzen und liefert gleichzeitig Einblicke in Naturprozesse.

In den Wachstums- und Entwicklungsprozessen von Pflanzen spielen Sekundärmetabolite kaum eine Rolle. Stattdessen übernehmen diese Verbindungen Funktionen in ökologischen Interaktionen, wie beispielsweise beim Anlocken von potentiellen Bestäubern und Samenverteilern [4] oder in der Verteidigung gegen abiotischen und biotischen Stress [5, 6]. Dazu gehören unter anderem der Schutz gegen UV-B-Strahlung oder die Abwehr von Fraßfeinden bzw. Pathogenen.

Die wichtigsten Substanzklassen der Sekundärmetabolite sind Polyphenole, Terpene, Fettsäurederivate und stickstoffhaltige Verbindungen [7]. Zu letzteren gehören beispielsweise die Alkaloide, die häufig in der modernen Medizin Verwendung finden [8].

Das älteste von Menschen genutzte Alkaloidgemisch ist Opium. Es wird aus dem getrockneten Milchsaft unreifer Samenkapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) gewonnen und besteht zu bis zu 20 % aus Morphin [9]. 1925 wurde dessen vollständige Struktur von Sir Robert Robinson aufgeklärt. Seine Arbeitsgruppe beschäftigte sich außerdem mit Zusammensetzung und Struktur von Blütenfarbstoffen in verschiedenen

Papaverarten, wobei der Fokus auf der Chemie von Anthocyanen lag [10]. Im Zuge dieser Untersuchungen erfolgte ebenfalls die Analyse der Farbstoffe aus orangen, roten und gelben Blüten von *Papaver nudicaule* L. (*P. nudicaule*, umgangssprachlich Isländmohn).

Der gelbe Farbstoff wurde 1939 Nudicaulin genannt und als Anthocyan deklariert [11]. Die Revision dieser Zuordnung folgte 1965, wobei der Farbstoff den Alkaloiden zugeteilt wurde [12]. Erst 2006 konnte gezeigt werden, dass in gelben Blüten von *P. nudicaule* insgesamt acht Nudicauline vorliegen [13]. Aus ihnen resultierten nach alkalischer Hydrolyse zwei Diastereomere. Die Analyse der spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten ergab einen ersten Strukturvorschlag. Dieser zeigte, dass die Nudicauline eine außergewöhnliche Klasse von Indolalkaloiden darstellen, weil sie eine polyphenolartige Teilstruktur aufweisen. Daraus folgte das Interesse an der Biosynthese der neuartigen Substanzklasse, denn ein gemeinsames Produkt aus dem Indol- und Polyphenolbiosyntheseweg war in der Literatur bisher nicht bekannt.

Die Untersuchung der Nudicaulinbiosynthese bietet die Möglichkeit, eine neue Biosyntheseroute aufzuklären sowie nützliche Kenntnisse für den Einsatz in Forschung und Pharmazie zu gewinnen.

In einer ersten Studie wurden intakte *P. nudicaule* Pflanzen einer $^{13}\text{CO}_2$ angereicherten Atmosphäre ausgesetzt, um ^{13}C -markierte Metabolite zu gewinnen. Mit diesen Experimenten gelang auch der Nachweis, dass Intermediate des Indol- und des Flavonoidbiosyntheseweges an der Nudicaulinbildung beteiligt sind [14]. Es war jedoch keine Aussage darüber möglich, welche Vorstufen und Enzyme dabei eine Rolle spielen und wo bzw. wann die Biosynthese stattfindet. Welche ökologische Bedeutung diesen Substanzen zukommt, blieb ebenfalls ungeklärt. Des Weiteren warf der Strukturvorschlag von 2006 einige Fragen bezüglich der Bindungen zwischen dem Indol- und dem Polyphenolteil auf, so dass in der vorliegenden Arbeit zunächst eine weiterführende Strukturuntersuchung der Nudicauline aus gelben *P. nudicaule* Blüten erfolgte.

An die Synthese von strukturell modifizierten Nudicaulinderivaten aus den zuvor isolierten Diastereomeren schlossen sich umfangreiche Strukturanalysen an [15]. Die Aufklärung der absoluten Konfiguration der beiden Aglykone erfolgte hierbei mithilfe der Circular dichroismusspektroskopie (CD). Auf Grundlage der gewonnenen Daten bestätigte sich unter anderem die Zusammensetzung des Moleküls aus einer Indol- und einer

Polyphenoleinheit. Daraus leiteten sich die im Anschluss bearbeiteten Fragestellungen ab:

- Wo findet die Nudicaulinbildung statt?
- Welche Metabolite sind an ihr beteiligt?
- In welchem zeitlichen Rahmen verläuft die Nudicaulinbiosynthese?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Biochemie von Blütenfarbstoffen und der Duftkomposition bei *P. nudicaule*?

Um zu untersuchen, in welchem Gewebe die Nudicaulinbiosynthese stattfindet und welche Metaboliten daran beteiligt sind, wurden Fütterungsexperimente (FE) mit ^{13}C -markierten potentiellen Vorstufen durchgeführt. Mit Hilfe von Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie (MS) konnte erfasst werden, ob und in welchen Positionen ein ^{13}C -Einbau in die Zielmoleküle stattgefunden hatte.

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs des Bildungsprozesses fand eine Einteilung in fünf Entwicklungsstadien durch multivariat-statistische Auswertemethoden statt. Diese Ergebnisse wurden zur Durchführung von Probennahmen für Proteom- und Transkriptomstudien herangezogen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Duft und Blütenfarbe der weiß, gelb, orange und rot blühenden *P. nudicaule* Pflanzen. Dazu wurden Duftproben der verschiedenfarbigen Blüten gesammelt und mittels Gaschromatographie (GC) analysiert. Außerdem erfolgte die Aufnahme der spektralen Reflexionsprofile aller vier Blütenfarben und ein Vergleich mit dem Wahrnehmungsspektrum von Honigbienen, die potentielle Bestäuber von *P. nudicaule* sind. Es schlossen sich Lernexperimente mit Honigbienen an, um zu zeigen, welchen Einfluss Farbe und Duft einer Blüte auf die Wahl der Bestäuber haben. Daraus leitete sich eine erste Aussage zur ökologischen Bedeutung der Farben und Düfte bei *P. nudicaule* ab.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die theoretischen Grundlagen und das experimentelle Vorgehen erläutert. Daran schließen sich die Vorstellung und Diskussion der Ergebnisse an. Auf die Zusammenfassung aller Resultate folgt weiterhin ein Ausblick auf offene Fragestellungen.

2 Grundlagen

2.1 *P. nudicaule*

Die Familie der Mohngewächse (Papaveraceae) wird in drei Unterfamilien eingeteilt, die etwa 50 Gattungen und 700 Arten umfassen [16]. *Papaver* L. gehört zu den Gattungen des Tribus Papavereae aus der Unterfamilie Papaveroideae. Zu den etwa 120 Arten dieser Gattung zählt *P. nudicaule*. In älteren Literaturstellen werden außerdem die Bezeichnungen *P. nudicaule* Hort. non L. und *Papaver croceum* (Altaischer Mohn) verwendet [17]. Die angelsächsische Bezeichnung Iceland Poppy (Islandmohn) gilt als irreführend, da auf Island ausschließlich *Papaver radicatum* (Arktischer Mohn) natürlich vorkommt [18, 19]. Diese Art ist außerdem in Norwegen, Lappland, Nordamerika sowie in Nordsibirien beheimatet. Ihre blass gelbe Blütenfarbe wird im Gegensatz zu *P. nudicaule* durch Gossypetinderivate verursacht (siehe Abbildung 2.1). Aufgrund der Gemeinsamkeiten in Gestalt und Verbreitung kam es zur Verwechslung von *P. nudicaule* mit *Papaver radicatum*, so dass *P. nudicaule* im Sprachgebrauch als Islandmohn bezeichnet wird.

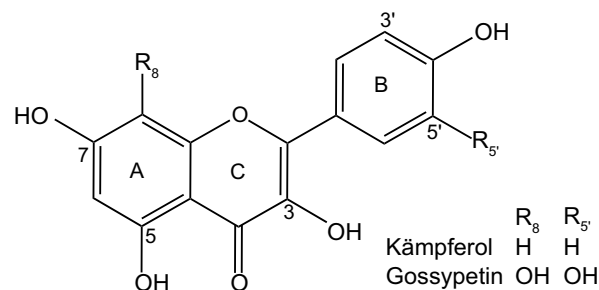


Abbildung 2.1: Aglykonstruktur von Gossypetin- und Kämpferolderivaten

Das natürliche Vorkommen der weiß bzw. gelb blühenden *P. nudicaule* Pflanzen beschränkte sich auf die Gebirgsregionen und Flussufer Nordostasiens bis zum Arktischen Ozean [20]. Im 18. Jahrhundert wurden sie in Europa und China eingeführt und kultiviert [21]. Auch heutzutage ist *P. nudicaule* in Europa und Nordamerika als Zierpflanze beliebt. Das große Spektrum an Blütenfarben entstand durch Züchtung [20, 22]. Sowohl Samenmischungen als auch Pflanzen werden im größeren Maßstab im Gartenhandel vertrieben [23, 24]. Im Gegensatz zur Nutzung als Zierpflanze kommen Extrakte aus

Blüten, Samenkapseln oder dem gesamten oberirdischen Teil in der traditionellen Medizin Chinas, Pakistans und der Mongolei zur Anwendung [25–27]. Die Eigenschaften der Arzneien reichen von husten- und schmerzstillend bis leicht sedierend. So existiert beispielsweise ein Patent für die Gewinnung einer traditionellen mongolischen Medizin zur Behandlung der chronischen Dickdarmentzündung *Colitis ulcerosa* [28].

P. nudicaule ist eine aufrechte Staude, die im Garten über zwei Jahre kultiviert werden kann [29]. Die Blätter sind blaugrün und fiederteilig. Die Blüten verströmen einen intensiven Duft und befinden sich einzeln an behaarten, blattlosen Trieben mit einer Höhe von bis zu 40 cm. Gartenpflanzen können Temperaturen bis -15 °C überdauern.

Für die vorliegende Arbeit wurden weiß, gelb, orange und rot blühende *P. nudicaule* Kultivare im Gewächshaus des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie herangezogen (siehe Abbildung 2.2). Die Bezugsquellen und die Rahmenbedingungen sind in Abschnitt 3.1 zusammengefasst.



Abbildung 2.2: Die vier unterschiedlichen Blütenfarben der untersuchten Kultivare von *P. nudicaule*

2.2 Blütenfarbstoffe in Pflanzen

2.2.1 Allgemeine Aspekte

Die meisten Blüten- und Fruchtfarbstoffe gehören entweder der Substanzklasse der Carotenoide, der Flavonoide oder der Betalaine an [30]. Die Flavonoide werden unter anderem in Anthocyane, Flavone und Flavonole unterschieden. Für jede Verbindungsklasse ist in Abbildung 2.3 ein Beispiel aufgeführt.

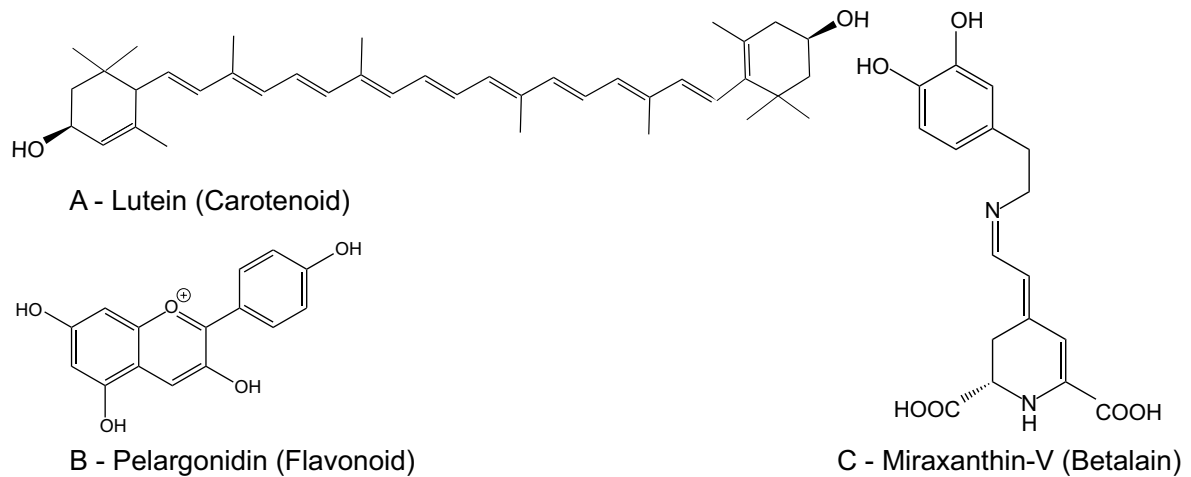


Abbildung 2.3: Strukturbeispiele für die häufigsten Blütenfarbstoffklassen: Lutein (Carotenoid), Pelargonidin (Flavonoid) und Miraxanthin V (Betalain)

Farbstoffe nehmen unter anderem eine große ökologische Rolle ein, da sie die Attraktivität von Blüten und Früchten für Tiere erhöhen, um die Bestäubung bzw. Samenverteilung sicherzustellen [4], siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3. Außerdem sind sie Teil der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress [5, 6] und wirken beispielsweise als Schutz gegen UV-B-Strahlung und Oxidation.

Die Carotenoide sind für den menschlichen Organismus essentiell, da sie eine Vorstufe zum Vitamin A darstellen [31]. Betalaine und Anthocyane werden auf ihre Wirkung beispielsweise bei der Krebsbehandlung und als Antioxidanzien gegen freie Radikale im Blut untersucht [6]. Eine Übersicht zu den Hauptmerkmalen der häufigsten Substanzklassen und ihrer Verteilung gibt Tabelle 2.1.

2.2.2 Anthocyane

Von den genannten Substanzklassen weisen die Anthocyane aus der Gruppe der Flavonoide die größte Farbvielfalt auf [32]. Ihr Spektrum reicht von lachsfarben, pink, scharlachrot, magenta, violett bis hin zu dunkelblau. Sie leiten sich von den glycosylierten Polyhydroxy- oder Polymethoxyderivaten des 2-Phenylbenzopyriliums (Flavyliumsalz) ab [30]. Des Weiteren können die Zuckereinheiten aromatisch oder aliphatisch acetyliert vorliegen. Beispiele für Substituenten sind Hydroxyzimt-, Hydroxybenzoe- sowie Dicarbonsäuren, hierbei insbesondere Malonsäure.

Tabelle 2.1: Hauptmerkmale, Verteilung und Beispiele der häufigsten Farbstoffklassen

	Carotenoide	Betalaine	Flavonoide
Vorkommen	ubiquitär in Pflanzen	Chemopodimiae + Basidiomycetes	Gefäßpflanzen
Pflanzen-kompartiment	Blüte, Frucht, Blatt, selten Wurzel	Blüte, Blatt, Frucht, Wurzel	Blüte, Frucht, Blatt, Sprossachse, Keimling, Samen
Zellorgan	Plastid	Vakuole (pH 3-6)	Vakuole (pH 3-6)
Blütenfarben	blass gelb bis rot	gelb (Betaxanthine), rot bis violett (Betacyane)	orange bis blau (Anthocyane), farblos bis blass gelb (Flavonole/Flavone)
Löslichkeit	lipophil	hydrophil	hydrophil
Ausgangsstoff (Biosynthese)	Isopentyldiphosphat	Tyrosin	Phenylalanin
Stabilität	stabil gegenüber Hitze und pH-Wert-Änderungen, lichtempfindlich	hitze- und lichtempfindlich	pH-Wert abhängig
Funktion	essentiell für Pflanzen, Tiere und Menschen	UV-B-Schutz, Antioxidant	UV-B-Schutz, Antioxidant

Die Aglykone, d.h. die Grundstrukturen ohne Substituenten, werden als Anthocyanidine bezeichnet. Zu den drei häufigsten zählen Pelargonidin (orange-rot bis scharlachrot), Cyanidin (karminrot bis magenta) und Delphinidin (malvenfarbig bis blau) [33]. In Abbildung 2.4 sind ihre Strukturen dargestellt. Nur in seltenen Fällen treten verschiedene Anthocyane nebeneinander im selben Gewebe auf [33].

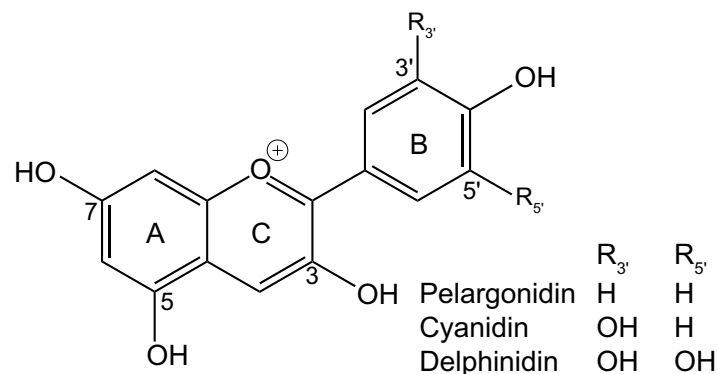


Abbildung 2.4: Aglykonstrukturen der häufigsten Anthocyane

Die Anthocyane sind aufgrund ihrer Glycosylierungen hydrophil und werden in den

Vakuolen gespeichert [4]. Dabei hängt ihre Struktur stark vom pH-Wert ab. Im sauren Milieu liegen das Flavyliumkation, die chinoiden Anhydrobasen und die Carbinolpseudobasen im Gleichgewicht vor [32]. Je nach Struktur bildet sich im alkalischen Milieu das korrespondierende Chalkon. In Abbildung 2.5 ist die Abhängigkeit der Anthocyanidinstruktur vom pH-Wert dargestellt.

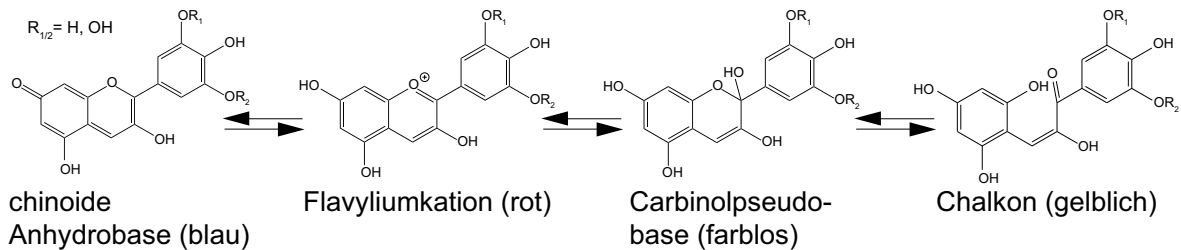


Abbildung 2.5: Abhängigkeit der Anthocyanidinstruktur vom pH-Wert nach [34]

Der pH-Wert der Vakuole liegt meist zwischen 3 und 6. Daraus folgte, dass die Aglykone nicht allein für das große Farbspektrum verantwortlich sein können. Die intensiven Farben werden durch unterschiedliche Mechanismen stabilisiert [30]. Dazu gehören inter- und intramolekulare Wechselwirkungen mit farblosen oder nur schwachfarbigen Verbindungen (engl. Co-pigments), wie zum Beispiel Flavonen und/ oder Flavonolen. Glycosylierungen oder Methylierungen des Aglykones tragen ebenfalls zur Stabilität des Chromophores bei. Außerdem tritt vor allem bei den Blautönen häufig eine Chelatbildung mit Metallionen (zum Beispiel Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} oder Al^{3+}) auf.

2.2.3 Ökologische Bedeutung von Duft und Blütenfarbe für Pflanzen

Ökologische Interaktionen zwischen Pflanzen und Tieren sind sehr vielfältig. Eine besondere Rolle kommt dabei einer Vielzahl flüchtiger Verbindungen zu, die als Blütenduft in unterschiedlicher Konzentration auftreten und hauptsächlich aus dem Shikimi-säure- bzw. Phenylpropanoid-, Terpen- oder Fettsäurebiosyntheseweg stammen [35]. Diese Metabolite dienen der Pflanze zur Kommunikation mit ihrer unmittelbaren Umgebung. Dazu zählen beispielsweise das Anlocken von potentiellen Bestäubern (Pollinatoren) oder von Feinden der Herbivore, die die Pflanze befallen haben [36, 37].

Der Duft kann dabei aus verschiedenen Teilen der Blüte verströmt werden, insbesondere

die Pollen und die Epidermiszellen der Kronblätter sind hier zu nennen [38]. Im Pollen- und Gesamtduft des Klatschmohns (*Papaver rhoeas*) bestehen beispielsweise nur Abweichungen in den relativen Mengen der einzelnen Komponenten [39]. In Trollblumen (*Trollius europaeus*) sind auch Sekret bildende Drüsen an der Duftemission beteiligt. Es existieren Hinweise darauf, dass die Bildung von flüchtigen Verbindungen über den Phenylpropanoidbiosyntheseweg sogar in Mesophyllzellen von Petunienblüten stattfinden kann [40]. Dabei müssen bisher unbekannte Transportmechanismen beteiligt sein, da die Emission des Dufts über die Epidermiszellen erfolgt.

Um die Samenproduktion blühender Pflanzen zu gewährleisten, sind Fremd- bzw. Selbstbestäubung die einzigen Möglichkeiten. Erstere erfolgt hauptsächlich durch Insekten bzw. Tiere, die zunächst angelockt werden müssen. Zu den vielfältigen Pollinatoren zählen beispielsweise Ameisen, Käfer, Fliegen, Bienen, Hummeln oder Vögel. Dabei spielen die Blütenmerkmale Form, Farbe, Duft, Orientierung der Blütenöffnung und die Verfügbarkeit von Nektar eine ausschlaggebende Rolle [41]. Diese Charakteristiken nehmen, ebenso wie die geografische Lage des Habitats, Einfluss darauf, welche Bestäuber die Blüte aufsuchen. So gehören Hummeln und Fliegen zu den häufigsten Pollinatoren in arktischen Regionen [42]. Die Fähigkeit zwischen Blüten verschiedener Pflanzen zu wählen, ist den Bestäubern zum Teil angeboren, kann aber auch erlernt werden.

Schon Mitte des 19. Jahrhunderts wurde diskutiert, dass zwischen Blüteneigenschaften und den häufigsten Bestäubern eine Beziehung besteht [43]. Beispielsweise treten vorrangig duftlose, rote Blüten mit großen Mengen an verdünntem Nektar auf, wenn die Bestäubung durch Vögel erfolgt [41]. An anderer Stelle wurde darauf hingewiesen, dass die Blütenduftevolution aufgrund von Änderungen im Bestäuberverhalten, also durch Selektionsdruck, aufgetreten sein könnte [44]. In dieser Studie erfolgte die Untersuchung der Duftkompositionen von fünf Wildtyppopulationen der Gewöhnlichen Nachtviole (*Hesperis matronalis*). Innerhalb einer Population traten kaum Unterschiede im Duftprofil und in den Emissionsraten bei der gleichen Blütenfarbe auf, jedoch zwischen den Populationen. Dafür könnten beispielsweise Umweltfaktoren und Unterschiede in der Genetik der Populationen mitverantwortlich sein.

Löwenmäulchen (*Antirrhinum*) emittieren tagesperiodisch verschiedene Mengen Me-

thylbenzoat [45]. Am Tag ist der Anteil um das Vierfache höher, genau zu der Zeit, in der ihre Bestäuber (Bienen) fliegen. Im Gegensatz dazu tritt im Duftprofil von Petunien (*Petunia cv Mitchell*) und Tabakpflanzen (*Nicotiana suaveolens*) das Maximum der Methylbenzoatkonzentration in der Nacht auf. Dieser Befund passt zeitlich mit dem Flug ihrer nachtaktiven Pollinatoren (Motten) zusammen. Nach der Bestäubung fällt der Anteil an Methylbenzoat im Duft von Löwenmäulchen und Petunien innerhalb von 30 bzw. 40 Stunden um 70 bis 75 % [46].

Blütenfarbe und Duft gelten als essentiell für das Anlocken von Pollinatoren und damit für den Fortpflanzungserfolg einer Art [47]. Aus diesem Grund wäre es vom evolutionären Standpunkt her möglich, dass ein Zusammenhang zwischen den Biosynthesewegen besteht, die zur Bildung der Duft- bzw. Farbmethylbenzoate führen. Für diese Überlegung sprechen auch die Ergebnisse folgender Studien.

1994 fiel bei der Untersuchung einiger nahverwandter Theophrastaceae auf, dass der Duft oranger Blüten von *Jacquinia macrocarpa* und *Jacquinia sprucei* Degradierungsprodukte von Carotenoiden enthielt [48]. Da letztere die orange Blütenfarbe erzeugen, wurde vermutet, dass sie während der Blüte abgebaut und ihre Abbauprodukte emittiert werden. Damit bestand ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Duftkomposition und Blütenfarbstoffen.

Eine weitere Studie an Petunien, in die ein Transkriptionsfaktor von *Arabidopsis thaliana* zur Produktion von Anthocyanen eingeführt wurde, zeigte, dass neben der Anthocyankonzentration auch der Anteil an flüchtigen Verbindungen aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel um das Zehnfache anstieg [35]. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass durch die mögliche Verbindung zwischen Produktion des Bouquets und der Blütenfarbe bei Blockierung eines Biosynthesezweiges der jeweils andere verstärkt werden könnte. Diese Theorie unterstützen die Ergebnisse einer Untersuchung an weißen und violetten Orchideen (*Orchis mascula*, *Orchis simia*) [43]. Es stellte sich heraus, dass weiße Blüten flüchtige Verbindungen des Shikimisäurebiosynthesewegs emittieren, die im Duft der violetten Blüten fehlen, da sie zur Bildung der farbgebenden Anthocyane verwendet werden. Weiß blühende Pflanzen wiesen außerdem einen höheren Anteil an Terpenen und Fettsäurederivaten im Bouquet auf.

In einer Studie an roten Landnelken (*Dianthus caryophyllus*) wurde ein Gen ausge-

schaltet, das ein Enzym der Anthocyanbiosynthese codiert [47]. Das Resultat waren blasse bzw. farblose Blüten, die einen intensiven Duft verströmten. Der Anteil an Metaboliten des Phenylpropanoidweges (zum Beispiel Methylbenzoat, 2-Hydroxymethylbenzoat) war im Duft gegenüber der Kontrolle fünf- bis siebenfach höher. Im Gegensatz dazu ergaben sich für die Konzentration des ebenfalls auftretenden Sesquiterpens β -Caryophyllen keine Änderungen im Vergleich zur Kontrolle.

Abgesehen von den aufgeführten Beispielen wurde diskutiert, dass die Hypothese einer gemeinsamen Biochemie von Duft und Blütenfarbe nicht allein die Variation innerhalb der Duftphänotypen erklärt [44]. Denn eine gemeinsame Biochemie zwischen Duft- und Farbproduktion limitiere die Variationsmöglichkeiten der Duftphänotypen stark. Damit ist der Forschungsbedarf zu diesem Thema sehr groß. Es ist davon auszugehen, dass viele weitere Untersuchungen folgen werden, denn beispielsweise hegen die Agrarwirtschaft und die Floristikindustrie ein besonders ökonomisches Interesse an der Duftmanipulation (engl. scent engineering) durch molekularbiologische Methoden [49]. Dabei steht das Ziel im Vordergrund, die Ernteausbeute und Qualität der Kulturpflanzen sowie die Ästhetik der Zierpflanzen und Schnittblumen zu gewährleisten bzw. zu verbessern.

Die Bouquets der in dieser Arbeit untersuchten vier *P. nudicaule* Kultivare unterscheiden sich so stark voneinander, dass es sogar der wenig empfindliche menschliche Geruchssinn wahrnehmen kann. Damit gab es einen ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Duft und Blütenfarbe, dem in der Arbeit nachgegangen wurde. Das experimentelle Vorgehen der sich anschließenden Untersuchungen und ihre Ergebnisse werden in Abschnitt 3.3.4 bzw. 4.4 erläutert.

2.2.4 Farbstoffe in *P. nudicaule* Blüten

Die *P. nudicaule* Blüten wurden seit 1931 auf Anthocyane untersucht, wobei insbesondere das Auftreten von Pelargonidinderivaten in den roten und orangen Varietäten im Mittelpunkt stand [50–52].

Der wasserlösliche Farbstoff aus den gelben *P. nudicaule* Petalen wurde 1939 erstmals isoliert und Nudicaulin genannt [11]. Die sich anschließende Strukturuntersuchung ließ

auf ein stickstoffhaltiges Flavyliumkation mit einem 4-Hydroxyphenylring und zwei Glucoseeinheiten schließen. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Blütenblätter in den geschlossenen Knospen rot sind und diese Farbe durch ein Pelargonidinderivat verursacht wird. Dieselben Autoren wiesen Nudicaulin auch in Blüten von *Meconopsis cambrica* (Pyrenäen-Scheinmohn) nach.

1962 erfolgte die Analyse der Farbstoffe in Staubblättern, Blütenblattbasis und Blütenblatt von 21 Papaverarten in einer chemotaxonomischen Untersuchung [53]. Im Falle von *P. nudicaule* konnten Pelargonidinderivate ausschließlich in den roten Blüten nachgewiesen werden. Dafür wurde ein gelber Farbstoff, der laut der Autoren kein Anthocyan war, sowohl in den Blättern als auch in den Staubblättern aller Farben (weiß, gelb, orange, blass- und dunkelrot) isoliert. Es erfolgte jedoch keine nähere Bezeichnung oder Charakterisierung, obwohl es sich zumindest zum Teil um Nudicaulin gehandelt haben könnte.

Die Vermutung, dass Nudicaulin aus gelben *P. nudicaule* zu den Flavonoiden gehören könnte, widerlegte Jeffrey Harborne 1965 [12]. In dieser Studie wurde der gewonnene Farbstoff einer sauren Hydrolyse unterzogen, bei der die Abspaltung einer Glucoseeinheit auftrat. In einem zweiten Experiment erfolgte durch enzymatische Hydrolyse die Abtrennung von zwei Glucoseeinheiten. Daher wurde auf ein Triglycosid geschlossen. Die spektralen Eigenschaften des Chromophores veränderten sich durch die Hydrolyseuntersuchungen nicht. Nudicaulin zeigte bei 258 nm und 467 nm maximale Absorption sowie ein lokales Maximum bei 330 nm. Aus der Wasserlöslichkeit, den chemischen Eigenschaften und den spektralen Daten resultierte, dass es sich bei diesem Farbstoff weder um ein Flavonoid, ein Carotenoid noch um ein Betaxanthin handeln konnte. Harborne ordnete Nudicaulin abschließend den Alkaloiden zu. Aus der Papierchromatografie des Blütenextrakts ergab sich weiterhin, dass noch ein zweiter gelber Farbstoff auftrat. Er wurde als Quercetagetin-7-*O*- β -glucosid identifiziert, jedoch 1969 von Harborne zu Gossypetin-7-*O*- β -glucosid revidiert [54].

Im selben Jahr wies eine andere Publikation darauf hin, dass es sich bei Nudicaulin um mehrere Substanzen mit sehr ähnlichen Strukturen handeln könnte [16]. Nudicaulin war bei der Farbstoffuntersuchung weiterer Papaverarten aufgetreten, insbesondere zusammen mit Pelargonidin-3-sophorosid-7-glucosid in den orangen *P. nudicaule*

Kronblättern. In einer weiteren Arbeit wurde Nudicaulin auch in den Staubblättern von verschiedenen Papaverarten nachgewiesen, ohne dass über die Struktur Näheres bekannt war [55]. Andere gelb blühende Papaverarten enthalten im Gegensatz dazu Carotenoide als farbgebende Substanzen.

Im Jahr 1981 wurde Pelargonidin-3-malonylsophorosid als einziges Pelargonidinderivat, abgesehen vom Degenerationsprodukt Pelargonidin-3-sophorosid, in roten *P. nudicaule* Blüten nachgewiesen. Dieser Befund verdeutlicht, wie instabil die Anthocyane sind und welche entscheidende Rolle die Extraktionsmethode spielt [56]. Unter Berücksichtigung der Datenlage von 1969 ist davon auszugehen, dass Pelargonidin-3-sophorosid-7-glucosid mit mindestens einer Malonyleinheit in roten Blüten von *P. nudicaule* vorkommt und dass bei saurer Extraktion (pH-Wert <3) der Verlust einer Glucose auftreten kann.

In Tabelle 2.2 ist das Vorkommen der verschiedenen Inhaltsstoffe in den vier hier untersuchten *P. nudicaule* Kultivaren zusammengefasst. Ihre Strukturen sind im Anhang A aufgeführt.

Tabelle 2.2: Inhaltsstoffe in offenen *P. nudicaule* Blüten nach [57], Aufschlüsselung der Strukturen im Anhang A

Derivate	weiß	gelb	orange	rot
Kämpferol	1-7	1-7	1-7	1-7
Gossypetin	A	A	A	A
Nudicaulin	-	I-VIII	I-VIII	-
Pelargonidin	-	-	8-10	8 & 11-12

Abgesehen von den Blütenfarbstoffen wurden auch die Alkaloide in den gesamten Pflanzen vieler Papaverarten untersucht. Zu diesem Thema empfiehlt sich folgende weiterführende Literatur: [58–60].

2.2.5 Studien zu Nudicaulin aus *P. nudicaule*

Erst im Jahr 2006 wurde gezeigt, dass in gelben *P. nudicaule* Blüten insgesamt acht Nudicauline auftreten [13]. An ihre Isolation mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) schlossen sich NMR-

und MS-Analysen an. Es konnte bestätigt werden, dass jedes Nudicaulin drei Glucoseinheiten besaß. Die Zahl von acht Nudicaulinen resultierte aus dem Auftreten von Diastereomeren mit unterschiedlichen Malonylierungspositionen und -graden an den Glucoseeinheiten **A** und **C**. Aus Verseifungsreaktionen wurden schließlich zwei Diastereomere ohne Malonsäuresubstituenten gewonnen. Als Aglykonstruktur wurde 19-(4-Hydroxyphenyl)-10*H*-1,10-ethenochromeno[2,3-*b*]indol-8,8,18-triol vorgeschlagen, siehe Abbildung 2.6.

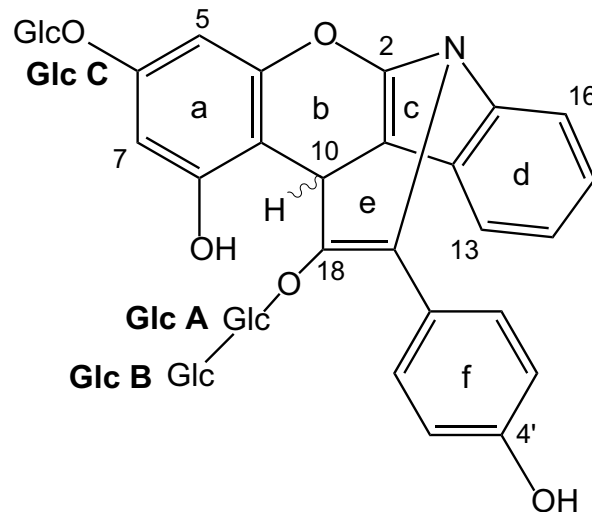


Abbildung 2.6: Strukturvorschlag für das Nudicaulinaglykon nach [13]

Die Diastereomere waren im Ring **a** an Position C-6 mit Glucose und an Position C-18 mit Sophorose *O*-glycolisiert. Dasselbe Substitutionsmuster wiesen die ebenfalls isolierten sieben Kämpferolderivate und ein Gossypetinderivat auf.

Damit wurden erstmals Indolalkaloide publiziert, die eine flavonoidähnliche Teilstruktur aufwiesen und deren Biosynthese, einschließlich der daran beteiligten Enzyme, unbekannt war. Aus der Molekülzusammensetzung leitete sich die Hypothese ab, dass Intermediate aus den voneinander unabhängigen Biosyntheserouten der Flavonoid- und Indolbildung beteiligt sind. Dazu wurde eine erste Untersuchung mit Hilfe von $^{13}\text{CO}_2$ -Experimenten an ganzen Pflanzen durchgeführt [14]. Ihre Ergebnisse und die daraus abgeleitete Hypothese zur Nudicaulinbiosynthese werden in Abschnitt 2.4 vorgestellt.

Die acht Nudicauline wurden ebenfalls in den orangen Blüten von *P. nudicaule* sowie in gelb und orange blühenden *Papaver alpinum* nachgewiesen [57]. In gelben *Mecopopsis cambrica* Kronblättern traten die beiden Nudicaulindiastereomere sowohl ohne

Glucosesubstituenten als auch mit Malonsäure bzw. 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure an Glucose C substituiert, auf.

Jedoch bestanden Zweifel am Strukturvorschlag von 2006, da die Aglykone durch die Verzerrung des stickstoffhaltigen Sechsrings **e** sehr unter Spannung stehen mussten. Außerdem passte das UV-Spektrum mit dem Maximum bei 460 nm nicht zum unvollständig konjugierten System des Chromophors.

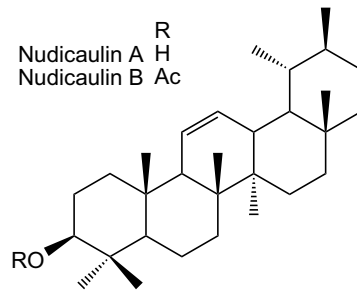
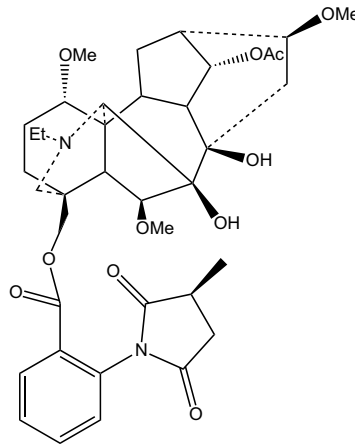
Die Zweifel am vorgeschlagenen Aufbau der Nudicauline und der unbekannte Biosyntheseweg bilden die Ausgangspunkte der vorliegenden Arbeit. Zunächst wurde die Struktur der beiden Diastereomere durch Derivatisierung und sich anschließenden NMR-, MS-, Circular dichroismusspektroskopiemessungen sowie quantenmechanischen Berechnungen detailliert analysiert. Danach erfolgte die Untersuchung der ungewöhnlichen Biosynthese einerseits durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen und andererseits während der Blütenentwicklung. Dazu war beispielsweise die Einteilung in Entwicklungsstadien notwendig. Zusätzlich erfolgten erste Schritte zur Aufklärung der an der Nudicaulinbiosynthese beteiligten Enzyme und ihrer komplementären DNA.

Im Folgenden wird zunächst auf weitere Nudicauline hingewiesen, die in der Literatur auftreten, bevor ein Überblick zu den allgemeinen Methoden der Biosyntheseaufklärung gegeben und im Anschluss der Hintergrund der Nudicaulinbildung vorgestellt wird. Den Ausgangspunkt bildet die $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14], aus deren Hypothese die Substrate der durchgeführten Fütterungsexperimente resultierten. In den Kapiteln 3 und 4 stehen das experimentelle Vorgehen und die Ergebnisse dieser Analysen im Mittelpunkt.

2.2.6 Weitere Nudicauline in der Literatur

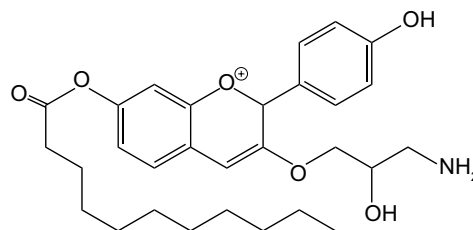
Der Name Nudicaulin wird in der Literatur auch für andere aus Pflanzen extrahierte Verbindungen verwendet. Diese stammen aus *Launaea nudicaulis* und einigen Delphiniumarten. Aus der erstgenannten Pflanze wurden zwei Triterpene (siehe Abbildung 2.7) isoliert und Nudicaulin A und B genannt [61].

Ein aus Delphiniumarten gewonnenes norditerpenoides Alkaloid erhielt den Namen Nudicauline [62]. Die Struktur ist in Abbildung 2.8 dargestellt.


 Abbildung 2.7: Nudicaulin A und B aus *Launaea nudicaulis*

 Abbildung 2.8: Nudicauline aus *Delphinium*

Es existiert weiterhin ein Nudicaulin, das tatsächlich aus *P. nudicaule* bzw. seiner Varietät *P. nudicaule chinense* stammt [63]. Es gibt Hinweise darauf, dass es für die Bioaktivität der Auszüge aus dem oberirdischen Material der Pflanzen verantwortlich ist. Die Rohextrakte kommen in der traditionellen chinesischen Medizin bei Erkältungssymptomen, wie zum Beispiel Husten, zum Einsatz [25]. In Abbildung 2.9 ist die Struktur dieses Nudicaulins gezeigt.

Da in keinem der genannten Fälle ein Zusammenhang zum Blütenfarbstoff der gelben *P. nudicaule* Blüten besteht, soll hier nur auf die Namensgleichheit hingewiesen werden.


 Abbildung 2.9: Nudicaulin aus *P. nudicaule* var. *chinense*

2.3 Ansätze zur Biosyntheseaufklärung

2.3.1 Biosynthesenetzwerk

Das Netzwerk der Biosynthesen einer Zelle wird durch mehrere, voneinander abhängige Ebenen geprägt. Im **Genom** erfolgt die Speicherung der Informationen zur Bildung von Proteinen und Ribonukleinsäuren (RNA) auf verschiedenen Genen durch Desoxyribonukleinsäuren (DNA) [64]. Die Differenzierung und die Funktionen in einer Zelle sind dabei maßgeblich von der Expression verschiedener Gene abhängig. Um die Baupläne für Proteine abzurufen, wird der korrespondierende DNA-Abschnitt zunächst auf messenger-RNAs (m-RNAs) übertragen. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet, wobei die Gesamtheit aller zu einem Zeitpunkt vorliegenden m-RNAs das sogenannte **Transkriptom** bilden. Im nächsten Schritt erfolgt das Ablesen der Information von den m-RNAs und die Rekonstruktion des entsprechenden Proteins mit Hilfe von transfer-RNAs (t-RNAs) und ribosomalen-RNAs (r-RNAs). Es stehen Methoden zur Verfügung, um das Transkriptom zu analysieren und somit Rückschlüsse auf exprimierte Gene sowie die codierten Proteine zu ziehen.

Unter dem Begriff **Proteom** werden alle Proteine einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt zusammengefasst [65, 66]. Sie können extrahiert und im Anschluss identifiziert werden. Eine besondere Rolle innerhalb der Proteine kommt dabei den Enzymen zu [8]. Sie katalysieren chemische Reaktionen und nehmen so Einfluss auf die Vielfalt an Metaboliten, die in der Zelle auftreten, verstoffwechselt oder akkumuliert werden. Es wird zwischen membrangebundenen und im Zellkompartimentmedium gelösten Enzymen unterschieden. Dabei treten auch Gruppierungen von kooperierende Enzymen in makromolekularen Komplexen (engl. metabolon) auf, in denen zumindest teilweise Bindungen zu Strukturelementen der Zelle bestehen [67]. Der Vorteil dieser Verbände liegt darin, dass ein direkter Transfer (engl. channeling) eines Intermediates in hoher lokaler Konzentration zum nächsten Enzym gewährleistet werden kann, ohne dass Verluste durch Diffusion im Zellmedium auftreten. Der gesonderte Transport von toxischen bzw. reaktiven Intermediaten stellt außerdem einen Schutzmechanismus dar. Zudem bietet das Channeling eine Möglichkeit zur Koordination der Biosyntheseaktivität sowie zur Regulation der Konkurrenz um ein Substrat zwischen unterschiedlichen

Biosyntheserouten. Insbesondere die Synthese und Akkumulation der Sekundärmetabolite wird räumlich und zeitlich durch Regulierungsproteine (engl. transcription factors) kontrolliert [7].

Um die Biosynthese eines Metaboliten in einer Pflanze zu untersuchen, existieren drei generelle Strategien. Dazu zählen Fütterungsexperimente mit isotoopenmarkierten Verbindungen (A), Enzymassays mit Enzymen aus Wirtsorganismen oder dem Untersuchungsobjekt (B) sowie die Untersuchung des Metabolitennetzwerks von genetisch modifizierten Pflanzenlinien (C). Welche davon gewählt wird, hängt maßgeblich vom Umfang der Vorkenntnisse zur gestellten Problematik und den zur Verfügung stehenden Analysemethoden ab.

2.3.2 Ansatz A - Fütterungsexperimente

Seit den Dreißigerjahren des 20. Jahrhunderts kommen Verbindungen mit radioaktiven oder stabilen Isotopen zur Aufklärung von Synthesen bzw. Biosyntheserouten in Organismen zum Einsatz [68]. Zu den frühesten Ergebnissen der sogenannten Fütterungsexperimente zählen beispielsweise die Aufklärung der Kohlenstoffdioxidfixierung durch Photosynthese und die Anwendung des radioaktiven Isotops ^{131}I zur Untersuchung der Schilddrüsenfunktion. Zwischen 1970 und 1990 konnten mithilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie unter anderem die Biosynthesen von Polyketiden und Terpenen erforscht werden.

Fütterungsexperimente kommen zum Einsatz, wenn weder Kandidaten für die an der Reaktion beteiligten Vorstufen oder Enzyme noch die für sie codierenden Gene bekannt sind. In diesem Fall dient eine Hypothese zur Biosynthese und den dazugehörigen Ausgangsstoffen als Startpunkt. Dabei ist zu beachten, dass die zur Verfügung gestellten Vorstufen für das biologische System bioverfügbar sein müssen. Löslichkeit und Transportfähigkeit der Substrate spielen eine entscheidende Rolle, ebenso wie die Eigenschaften des Gewebes, in dem die Biosynthese stattfindet. Außerdem müssen die beteiligten Enzyme zugänglich und aktiviert vorliegen. Bei der Wahl der Markierung stehen radioaktive und stabile Isotope zur Verfügung. Die gewünschten isotoopenmarkierten Verbindungen bzw. ihre Vorstufen müssen dabei kommerziell erhältlich sein. Außerdem ist die Empfindlichkeit der angestrebten Detektion zu berücksichtigen.

Häufig kommen die stabilen Isotope ^2H , ^{13}C oder Radioisotope wie zum Beispiel ^{14}C zum Einsatz [69]. Sie werden im Zielmetabolit mittels Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie oder im Fall der radioaktiven Isotope beispielsweise mit Flüssigszintillationszählern nachgewiesen.

Wenn die Isotopenmarkierung im gewünschten Molekül wiedergefunden wird, lässt sich daraus eine Vorstufen-Produkt-Beziehung ableiten [70]. Es kann jedoch keine Aussage darüber erfolgen, an welcher Stelle die Vorstufe in der Biosynthese steht, ob sie direkt eingebaut oder zunächst metabolisiert wird. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass der Überschuss dieses Substrates oder seine strukturelle Ähnlichkeit der eigentlichen Vorstufe zum Einbau in das Zielmolekül führt. Auf der anderen Seite bedeutet ein negativer Befund eines Fütterungsexperiments nicht zwangsläufig, dass die Vorstufe kein Bestandteil der Biosynthese ist. Das markierte Substrat muss zunächst das aktive Zentrum des Enzymkomplexes erreichen, wobei Stabilität und Verfügbarkeit der Enzyme auch von den äußeren Bedingungen des Experiments abhängen. Der Entwicklungsstand des verwendeten Pflanzenmaterials ist ebenfalls ein möglicher Einflussfaktor. Außerdem kann die Konzentration des markierten Substrates durch einen Überschuss an natürlicher Vorstufe oder durch eine konkurrierende Biosyntheseroute (engl. scrambling) so verringert werden, dass die Detektion der Markierung im Zielmolekül unmöglich wird [71, 72].

Zu den wichtigsten Metaboliten des primären Kohlenstoffmetabolismus zählen unter anderem Erythrose-4-phosphat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat [2]. Sie sind beispielsweise Startpunkte zur Bildung von aliphatischen und aromatischen Aminosäuren, stickstoffhaltigen Verbindungen, Polyphenolen, Terpenen und Fettsäurederivaten. Diese Substanzen werden über die Biosyntheserouten des Shikimisäure-, Polyketid-, Mevalonsäure-, Fettsäure- und des Methylerythriolphosphatweges synthetisiert.

Das Kohlenstoffgerüst der niedermolekularen Verbindungen wird komplett oder teilweise in die im Folgenden synthetisierten Substanzen eingebracht [73]. Durch Isotopenmarkierung lässt sich der Verbleib dieser Kohlenstoffgerüste im Netzwerk der Biosynthesen verfolgen (siehe Abschnitt 2.7).

Bei einem Experiment mit einer ^{13}C -markierten Vorstufen kann im Zielmolekül eine

^{13}C -Anreicherung an einer einzigen Stelle (Positionsmarkierung, engl. position labelling) oder an mehreren Positionen einzeln oder zusammenhängend (Bindungsmarkierung, engl. bond labelling) auftreten [74]. Letzteres wird oft in Verbindung mit der retrobiosynthetischen Vorgehensweise genutzt. Diese bildet das Gegenstück zur Retrosynthese in der organischen Chemie [75], wobei hauptsächlich ^{13}C -markierte Verbindungen wie $[^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Natriumacetat}$, $[^{13}\text{C}_2]\text{Natriumacetat}$ oder $^{13}\text{CO}_2$ eingesetzt werden [76]. Der Vorteil bei der Verwendung von universal markierter Glucose besteht darin, dass Mechanismen zur Verteilung in die subzellulären Kompartimente existieren [77].

Bei der Auswertung von Retrobiosynthesestudien dienen die Markierungsprofile von Verbindungen bekannten biosynthetischen Ursprungs, wie beispielsweise von Aminosäuren oder Nucleosiden, zur Rekonstruktion bzw. Vorhersage von Markierungsmustern der zentralen Intermediate [76]. In besonderen Fällen können auch die Markierungsmuster von Sekundärmetaboliten herangezogen werden, deren Biosynthese bereits aufgeklärt ist [14], mit dem Ziel die Beziehung zwischen Vorstufe(n) und Produkt (Zielmetabolit) zu charakterisieren [70].

2.3.3 Ansatz B - Enzymassays

Wenn die hypothetischen Vorstufen des gewünschten Zielmetaboliten bereits bekannt sind, kann nach Enzymen gesucht werden, die diese Biosynthese katalysieren. Dazu wird zunächst eine computergestützte Literatursuche nach Genen durchgeführt, die Enzyme der zu analysierenden Reaktion codieren könnten. Diese Kandidaten werden im Anschluss aus der Pflanze geklont und in einem heterologen System exprimiert [78]. Meist dienen Bakterien- oder Pilzkolonien als Wirt und produzieren bei einer erfolgreichen Genexpression das gewünschte Enzym. Dieses wird schließlich isoliert und seine Aktivität mit den bekannten Vorstufen in Enzymassays getestet.

Wenn bereits ein Protokoll zur Extraktion der benötigten Enzyme aus dem Pflanzenmaterial existiert, können gleich Aktivitätsuntersuchungen mit potentiellen Ausgangsverbindungen durchgeführt werden. Die Enzymlösung wird mit den potentiellen Vorstufen versetzt und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Analyse des Zielmoleküls.

2.3.4 Ansatz C - genmodifizierte Pflanzenlinien

Um zu untersuchen, ob verschiedene Genkandidaten in der zu analysierenden Biosynthese eine Rolle spielen, können transgene Pflanzen produziert werden, in denen die entsprechenden Gene ausgeschaltet oder fremde Gene eingeführt sind [79]. Die Untersuchung ihres Materials zeigt, worin der Einfluss der genetischen Änderung auf die Bildung des Zielmoleküls besteht. Außerdem schließt sich meist die Frage an, welche Funktion dem Metaboliten im biologischen System zukommt.

Da zu Beginn der Nudicaulinbiosyntheseuntersuchung keinerlei molekularbiologische Daten vorlagen, wurden zunächst Fütterungsexperimente durchgeführt. Aus der besonderen Molekülzusammensetzung der Nudicaulinaglykone (Abschnitt 2.2.5), aus Indol und einer flavonoidähnlichen Einheit resultierte die Hypothese, dass Metaboliten und Enzyme der vielfältig untersuchten Indol- und Polyphenolbiosyntheserouten an der Nudicaulinbildung beteiligt sind. Diese Verbindungen wurden als potentielle Vorstufen in den Fütterungsexperimenten eingesetzt. Im folgenden Abschnitt 2.4 werden die Verläufe dieser Biosynthesen vorgestellt, wie sie aus anderen Pflanzen bekannt sind. Im Anschluss erfolgt die kurze Vorstellung der Ergebnissen der vorangegangenen $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] zur Nudicaulinbiosynthese an *P. nudicaule* Pflanzen.

2.4 Hintergrund zur Nudicaulinbiosynthese

2.4.1 Allgemeines

Im Folgenden werden die Biosynthesewege von Indol und Polyphenolen vorgestellt, wobei einige der zugehörigen Metabolite ebenfalls Teil der Nudicaulinbildung sein könnten. Die Intermediate resultieren aus enzymkatalysierten Reaktionen. Für essentielle Schritte werden Beispielenzyme angegeben, die die jeweilige Reaktion laut Literatur katalysieren können [80, 81]. Alle besitzen eine sogenannte EC-Nummer (engl. Enzyme Commission number), deren Zusammensetzung sich aus der katalysierten Reaktion ableitet [82]. Dass die genannten Enzyme auch in den *P. nudicaule* Blüten vorhanden sind, muss jedoch erst mittels Proteomanalyse bestätigt werden. Auskunft zu Enzymen, ihren EC-Nummern und Funktionen sowie weiterführende Information über die verschiedensten Biosynthesen geben frei zugängliche Datenbanken, wie [80, 81, 83].

2.4.2 Bildung von Shikimisäure

Die Biosynthesewege von Indolderivaten und Polyphenolen beginnen mit Shikimisäure und trennen sich bei Chorismat. Erythrose-4-phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) sind die Ausgangsstoffe für Shikimisäure. Aus E4P stammen vier Kohlenstoffatome, die übrigen drei aus PEP. Shikimisäure wird dann über mehrere Zwischenschritte in Chorismat umgewandelt, wie in Abbildung 2.10 dargestellt. Dabei sind Kohlenstoffatome desselben biosynthetischen Ursprungs in der gleichen Farbe codiert. Bis zur Bildung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin findet die Shikimisäureroute in den Chloroplasten statt.

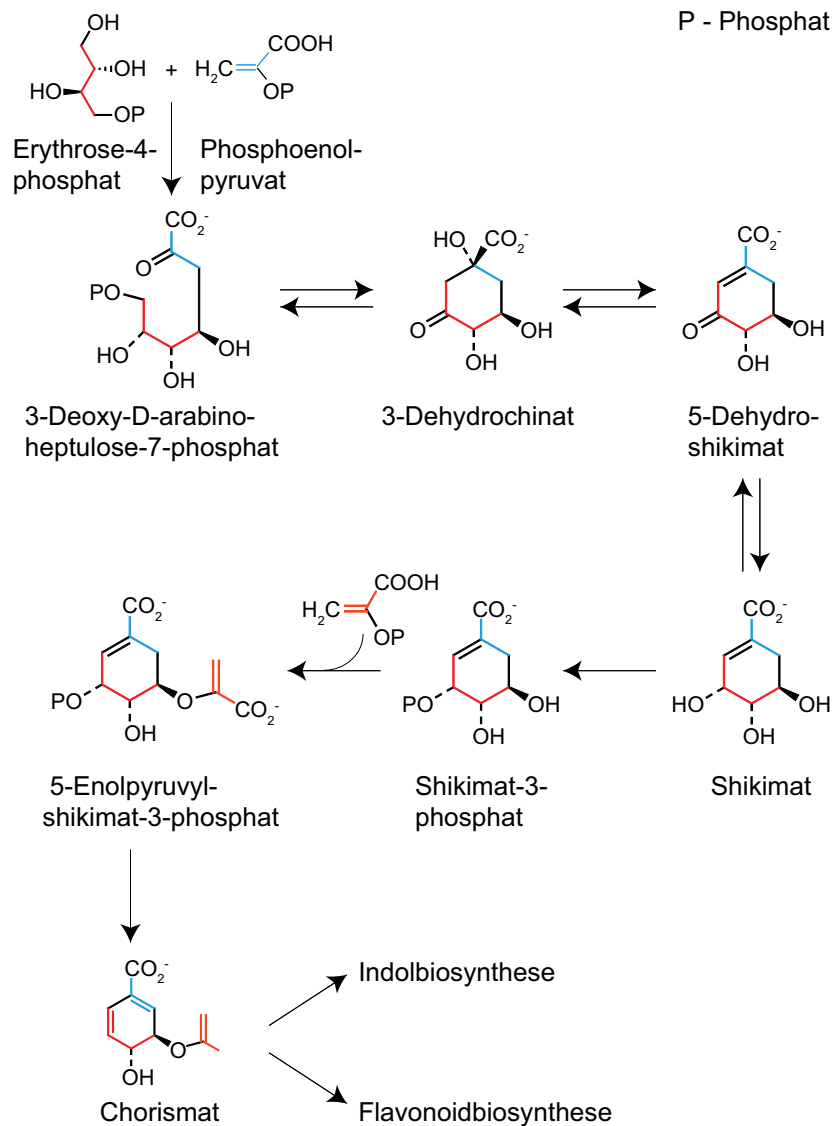


Abbildung 2.10: Bildung von Shikimisäure ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat nach [73] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)

2.4.3 Indolbiosynthese

Durch das Enzym Anthranilatsynthase (EC 4.1.3.27) wird aus Chorismat das Anion der Anthranilsäure gebildet. Mit Hilfe von Anthranilatphosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18) erfolgt die Reaktion mit Phosphoribosyldiphosphat zu N-(5'-Phospho- β -D-Ribosyl)-anthranilat. Es wird über zwei weitere Zwischenschritte zu Indol-3-glycerinphosphat metabolisiert, wobei nun durch einen Enzymkomplex (EC 4.2.1.20) Indol und Tryptophan synthetisiert werden können. Die Biosynthese ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

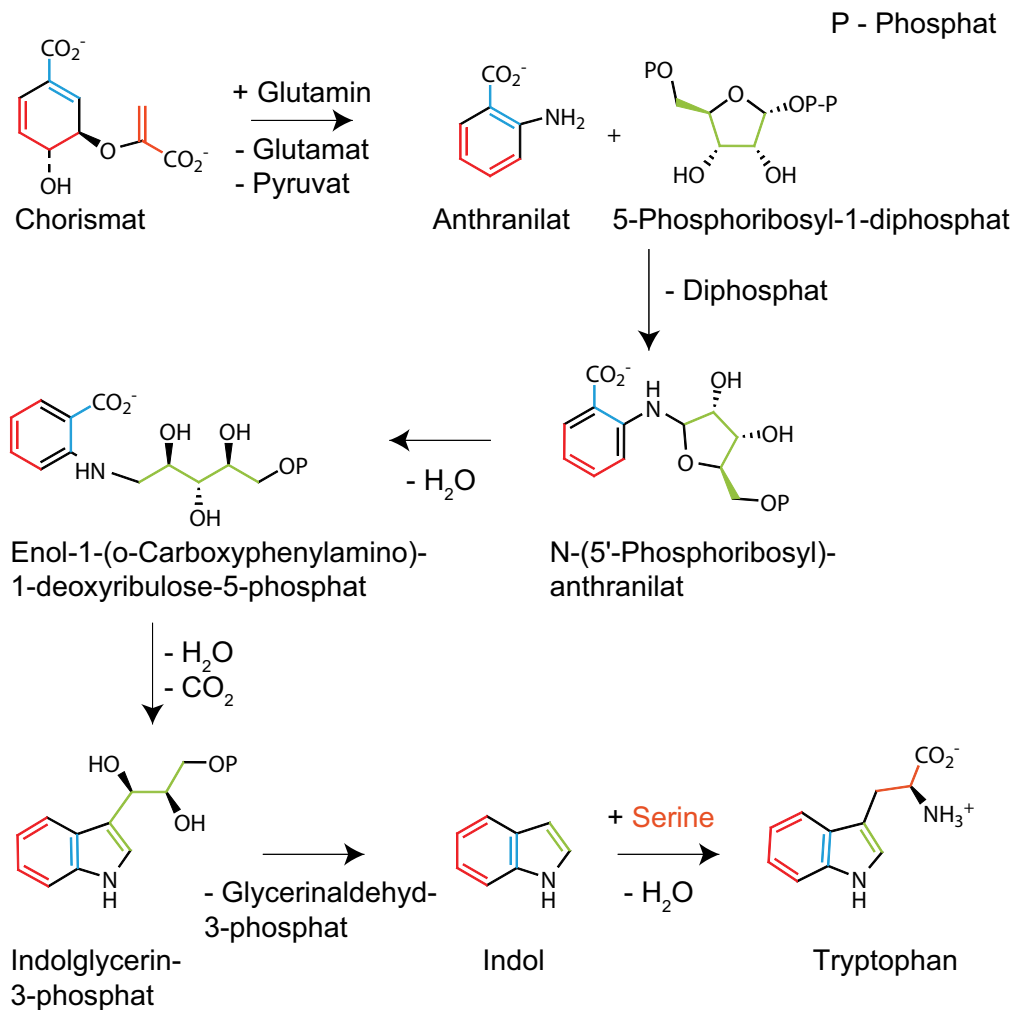


Abbildung 2.11: Indolbiosyntheseweg ausgehend von Chorismat nach [84]
 (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)

2.4.4 Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin

Für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wird Chorismat zunächst von Chorismatmutase (EC 5.4.99.5) in Prephenat umgewandelt. Ab diesem Punkt existieren drei mögliche Wege, wie in Abbildung 2.12 dargestellt. Im ersten Fall wird mit Hilfe von Transaminasen L-Arogenat gebildet, woraus dann durch unterschiedliche Enzyme entweder Phenylalanin oder Tyrosin gewonnen werden. Die Bildung von Phenylalanin kann jedoch auch ausgehend von Prephenat über Phenylpyruvat erfolgen. Dem gegenüber steht die Darstellung von Tyrosin über den Zwischenschritt 4-Hydroxyphenylpyruvat. Wenn die Biosynthese von Phenylalanin über

L-Arogenat unterbrochen ist, besteht die Möglichkeit diese Aminosäure durch Abbau von Tyrosin zu gewinnen [85].

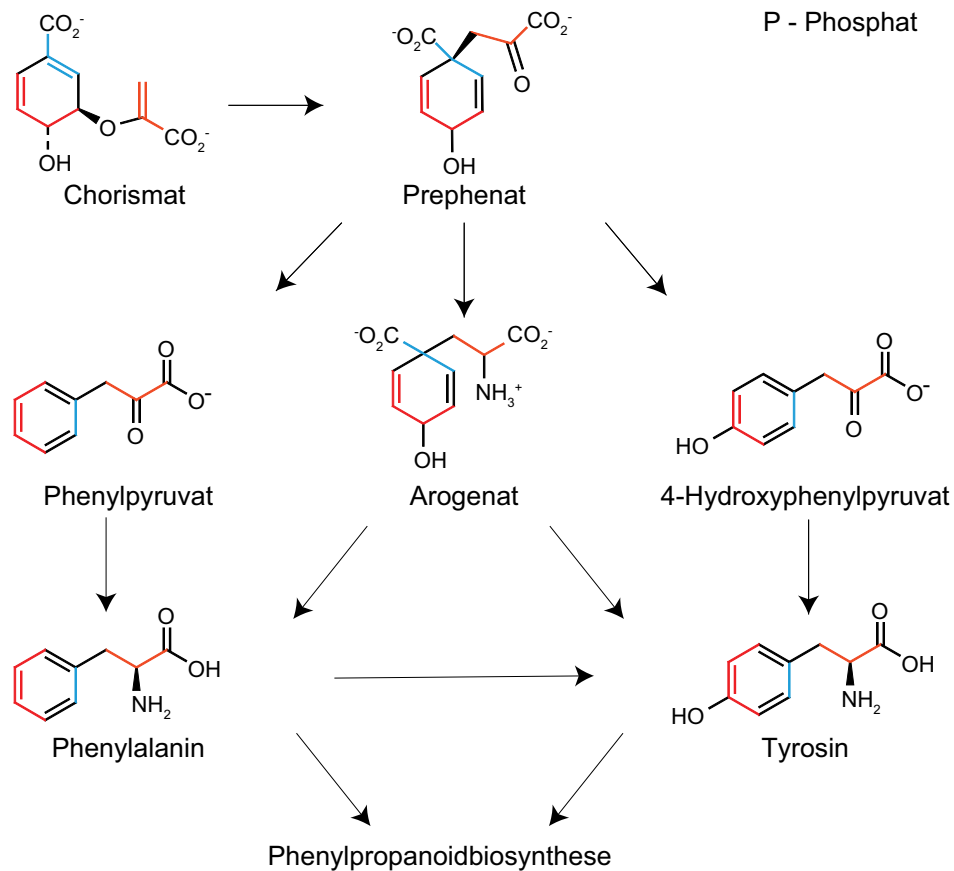


Abbildung 2.12: Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanine aus Chorismat nach [81, 84] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)

2.4.5 Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese

An die Bildung von Phenylalanin und Tyrosin schließt sich der Phenylpropanoidbiosyntheseweg an. Bei den Ausgangsstoffen für die Flavonoidbiosynthese handelt es sich um Ester von Zimtsäure und *p*-Cumarsäure mit dem Coenzym A (Abk. CoA). Ein Überblick über die Biosynthese ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Die Zimtsäure entsteht aus Phenylalanin durch das Enzym Phenylalaninammoniumlyase (EC 4.3.1.24). Darauf folgt entweder die Bildung von Zimtsäure-CoA durch Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (EC 6.2.1.12) oder von *p*-Cumarsäure mit Hilfe einer Monooxygenase (EC 1.14.13.11). Letztere kann auch von Phenylalanin-/ Tyrosinammoniumlyase (EC 4.3.1.25) aus Tyrosin gebildet werden. Im Anschluss stellt Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase (EC 6.2.1.12)

daraus *p*-Cumaroyl-CoA her. Eine der genannten Monooxygenasen (EC 1.14.13.11) ist auch in der Lage den Zimtsäure-CoA-Ester in *p*-Cumaroyl-CoA zu metabolisieren.

Das Substrat *p*-Cumaroyl-CoA-Ester wird im Cytosol mit drei Malonyl-CoA-Einheiten durch Chalkonsynthese (EC 2.3.1.74) zu Naringeninchalkon umgesetzt. Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Flavonoidwegenzyme als makromolekulare Komplexe auftreten, wobei Kontakt zwischen vielen Proteinen besteht, um Channeling von Substraten wie *p*-Cumaroyl-CoA-Ester zu ermöglichen [86–88].

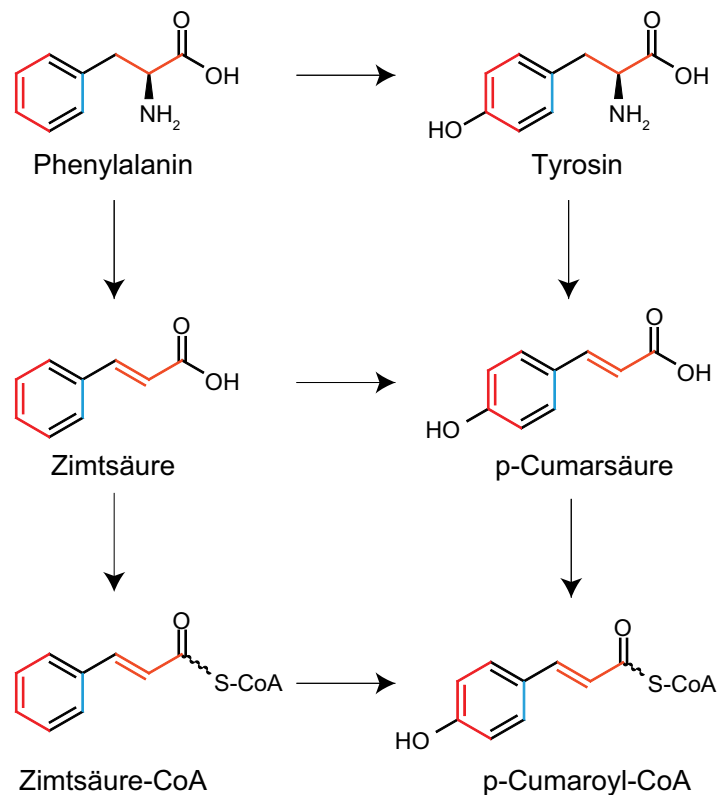


Abbildung 2.13: Darstellung von Zimtsäure-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA ausgehend von Tyrosin bzw. Phenylalanine nach [81] (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)

Malonyl-CoA ist Bestandteil des Polyketidbiosyntheseweges und wird aus Acetyl-CoA synthetisiert. Diese Vorstufe wird im Cytosol zuvor direkt oder indirekt aus Pyruvat gebildet. Naringeninchalkon weist schon das typische C6-C3-C6-Grundgerüst der Flavonoide auf. Das Enzym Chalkonisomerase (EC 5.5.1.6) cyclisiert den Metaboliten zum Naringenin. Daraus erfolgt die Bildung von Dihydrokämpferol durch Naringenin-3-dioxygenase (EC 1.14.11.9). In Abbildung 2.14 wird die Darstellung von Naringeninchalkon, Dihydrokämpferol und Malonyl-CoA dargestellt.

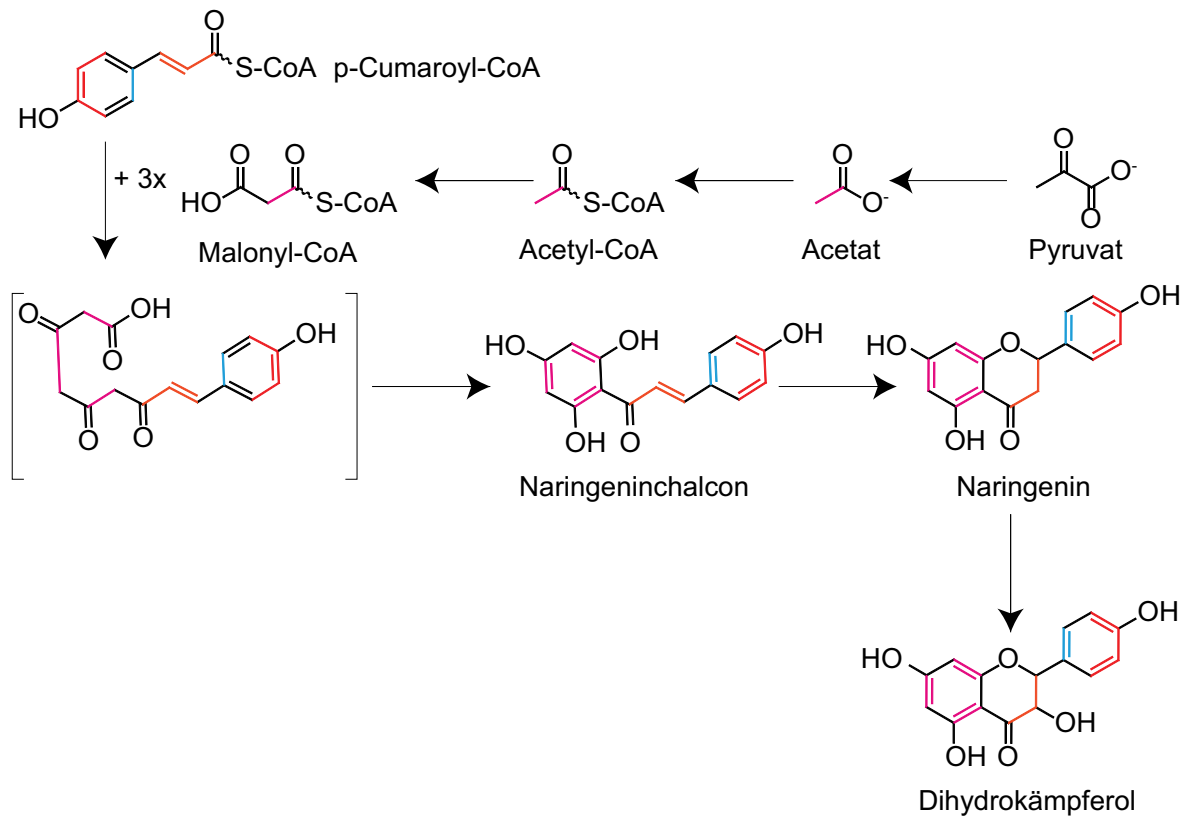


Abbildung 2.14: Umsetzung von *p*-Cumaroyl- und Malonyl-CoA zu Dihydrokämpferol nach [84, 81] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)

Aus diesem Substrat können schließlich in wenigen Reaktionen Kämpferol und Pterolon sowie die Edukte von Cyanidin und Delphinidin gewonnen werden, siehe Abbildung 2.15. Laut Literatur erfolgte die Aglykonbildung bevor Substituierungen mit beispielsweise Zucker auftreten [89].

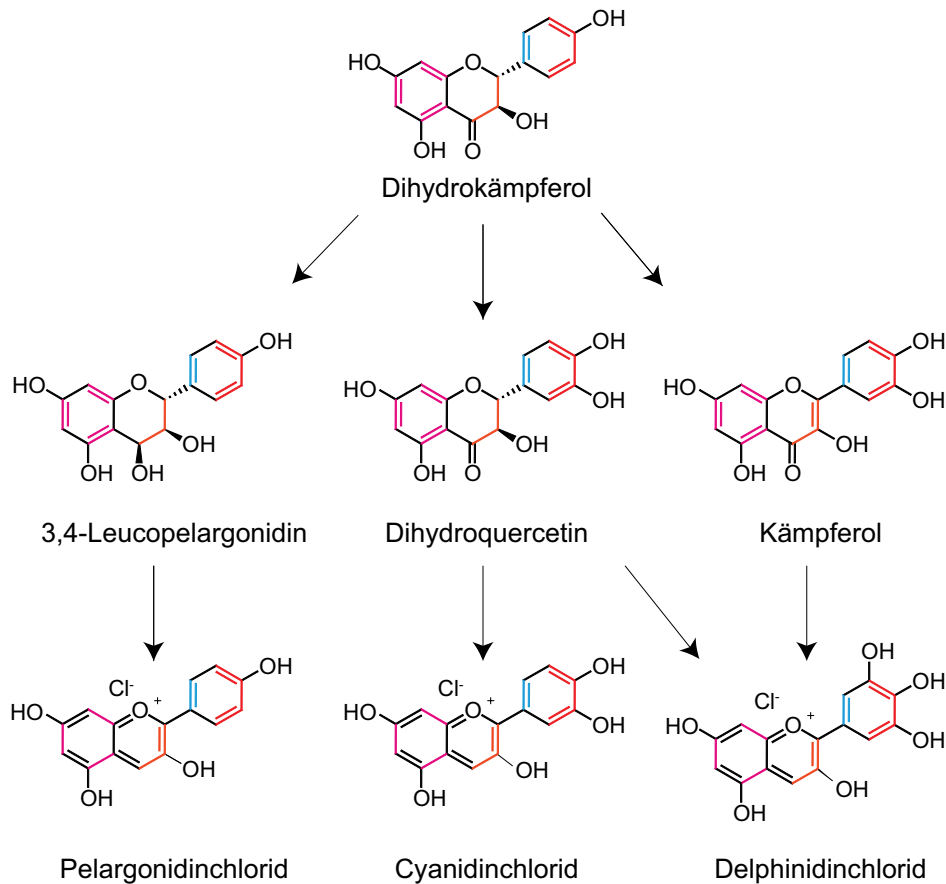


Abbildung 2.15: Biosynthese von Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin und Kämpferol aus Dihydrokämpferol nach [81] (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)

2.4.6 $^{13}\text{CO}_2$ -Studie zur Nudicaulinbiosynthese

Die erste Untersuchung der Nudicaulinbiosynthese erfolgte an ganzen *P. nudicaule* Pflanzen [14]. Dabei wurden die Pflanzen unter künstlicher $^{13}\text{CO}_2$ -Atmosphäre für vier Tage kultiviert, um ^{13}C -markierte Metabolite zu erhalten. Im Anschluss erfolgte der Vergleich des ^{13}C -Einbaus zwischen Nudicaulinen und Kämpferol-3-*O*- β -sophorosid-7-*O*-glucosid. Dieses Verfahren bot sich an, da die Biosynthese des Kämpferolderivates bereits aufgeklärt war. Durch diese Ergebnisse gelang der Nachweis, dass zwischen der Nudicaulinbildung und den Biosynthesen von Indol sowie Flavonoiden Gemeinsamkeiten bestehen. In Abbildung 2.16 wird der Zusammenhang zwischen dem Ursprung der einzelnen Kohlenstoffverbänden im Nudicaulinaglykon und den beiden Biosyntheserouten dargestellt. Daraus folgt, dass ein Intermediat der Indolbiosynthese mit einem des Flavonoidbiosyntheseweges zum Nudicaulin I und II kondensiert werden könnte.

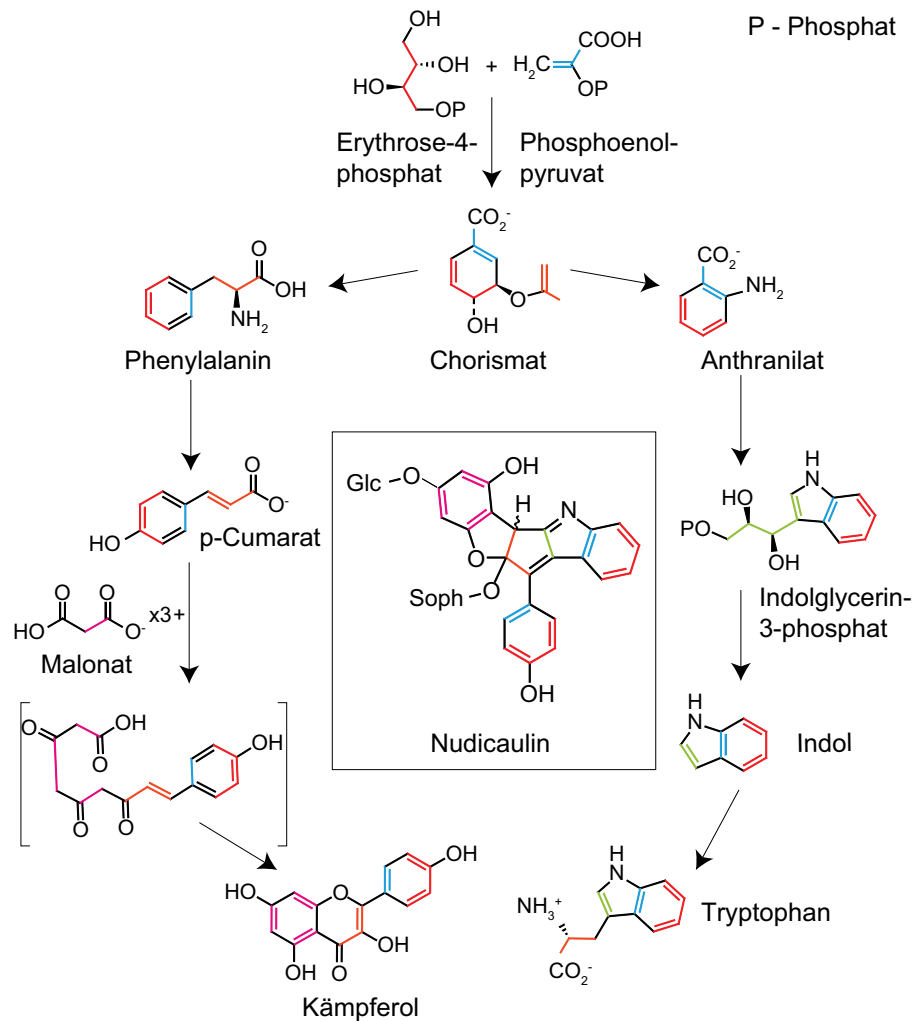


Abbildung 2.16: Zusammenhang zwischen dem Ursprung der einzelnen Kohlenstoffverbände (gleiche Farbmarkierung) im Nudicaulinaglykon sowie den Biosynthesewegen zur Bildung von Indol und Flavonoiden aus der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie in Anlehnung an [14]

Dies bildet den Ausgangspunkt zur weiteren Untersuchung der Nudicaulinbiosynthese im Zuge der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde analysiert, welche Metabolite der beiden beteiligten Biosynthesewege eine Rolle spielen. Es folgten Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen und die Untersuchung der Nudicaulinbildung während der Blütenentwicklung. Dazu war es nötig, mithilfe von multivariaten Methoden Entwicklungsstadien einzuteilen. Hiermit sollte ein Ausgangspunkt für die weiterführende Analyse der beteiligten Enzyme geschaffen werden, um die übrigen, zuvor beschriebenen Strategien für die Nudicaulinbiosynthese zugänglich zu machen.

Die Auswertung der Fütterungsexperimente wird im Anschluss an die Grundlagen der NMR-Spektroskopie (Abschnitt 2.5) und Massenspektrometrie (Abschnitt 2.6) erläu-

tert. Die beiden Analysemethoden dienen dazu, festzustellen, ob ^{13}C -Einbau im Zielmetaboliten stattgefunden hat und wo sich die Markierung befindet. Die theoretischen Grundzüge zu den gewählten Methoden der multivariaten Statistik werden im Abschnitt 2.8 erklärt. Die Details zur Durchführung aller Experimente sind im Kapitel 3 aufgeführt.

2.5 NMR-Spektroskopie

2.5.1 Grundlegende Aspekte

Die Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) beruht auf der Wechselwirkung von Kernen mit einem äußeren Magnetfeld [9]. Dabei spielt eine quantenmechanische Eigenschaft der Kerne, der Drehimpuls (Kernspin) eine entscheidende Rolle. Er wird durch die Kernspinzahlenzahl I charakterisiert, die je nach Anzahl der Protonen und Neutronen eines Korns halbzahlig, ganzzahlig oder null werden kann [90]. Bei ungerader Neutronen- und Protonenanzahl nimmt die Kernspinzahlenzahl I einen ganzzahligen Wert an. Für den Fall, dass nur eine der beiden Zahlen ungerade ist, entspricht I einem Vielfachen von $\frac{1}{2}$. Wenn jedoch sowohl die Anzahl der Protonen als auch der Neutronen gerade ist, wird die Kernspinzahlenzahl I null.

Der Wert von I nimmt Einfluss auf den Betrag des gequantelten Kernspins, wie Gl. 2.1 zeigt [91].

$$|I| = \sqrt{I(I+1)} \hbar \quad (2.1)$$

Seine Komponente $m_I \hbar$ um eine beliebige Achse ist von I abhängig (Gl. 2.2).

$$m_I = I, I-1, \dots, -I \quad (2.2)$$

Das magnetische Moment μ des Korns ist proportional zum Spindrehimpuls und lässt sich aus Gleichung 2.3 berechnen [92].

$$\mu = \gamma m_I \hbar = \gamma \sqrt{I(I+1)} \hbar \quad (2.3)$$

Es zeigt sich, dass der Wert der Kernspinquantenzahl I darüber entscheidet, ob ein Kern mit Hilfe der NMR-Spektroskopie detektiert werden kann [93]. Ausschließlich Kerne mit einer Kernspinquantenzahl I größer null sind für die Messung empfindlich, sonst würde das magnetische Moment μ den Wert null annehmen. Aus diesem Grund ist ^{13}C ($I = \frac{1}{2}$) im Gegensatz zu ^{12}C ($I = 0$) im NMR-Experiment detektierbar, obwohl es mit einer natürlichen Häufigkeit von nur 1,11 % viel seltener vorkommt.

Als Proportionalitätsfaktor zwischen Kernspin und magnetischem Moment μ dient das gyromagnetische Verhältnis γ [92]. Es ist spezifisch für jedes einzelne Isotop eines Elements und wurde experimentell bestimmt. Je größer γ ist, desto empfindlicher sind die Kerne in der NMR-Spektroskopie. Das Proton hat beispielsweise ein gyromagnetisches Verhältnis von $26,7522 \cdot 10^7 \text{ rad } T^{-1} s^{-1}$, während γ für ^{13}C nur $6,7283 \cdot 10^7 \text{ rad } T^{-1} s^{-1}$ beträgt.

Für $I > 0$ tritt also ein magnetisches Moment μ mit einem konstanten Betrag auf, dessen Ausrichtung von m abhängt [90]. Demnach existieren genau $2I + 1$ Orientierungsmöglichkeiten für das magnetische Moment μ entlang einer beliebigen Achse. Beispielsweise besitzen Kerne mit $I = \frac{1}{2}$, wie ^1H und ^{13}C , nur zwei Ausrichtungen:

$$\begin{aligned} \alpha\text{-Zustand: } m_I &= +\frac{1}{2}(\uparrow) \\ \beta\text{-Zustand: } m_I &= -\frac{1}{2}(\downarrow) \end{aligned} \tag{2.4}$$

Jeder dieser Zustände des Kernspins besitzt eine diskrete Energie im Magnetfeld B , die sich aus Gleichung 2.5 ergibt.

$$E_{m_I} = -\mu_z B = -\gamma m_I \hbar B \tag{2.5}$$

Der β -Zustand liegt für Kerne mit positivem gyromagnetischen Verhältnis energetisch höher als der α -Zustand. Daraus folgt, dass er im thermischen Gleichgewicht etwas geringer besetzt ist [93]. Der Energieunterschied zwischen zwei aufeinanderfolgenden Niveaus entspricht dem Produkt der Lamorfrequenz ν_L und dem reduzierten Planckschen Wirkungsquantum \hbar , wie durch Gleichung 2.6 und 2.7 ausgedrückt wird.

$$\nu_L = \frac{\gamma B}{2\pi} \tag{2.6}$$

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{1}{2} \gamma \hbar B - \left(-\frac{1}{2} \gamma \hbar B\right) = \gamma \hbar B = h \nu_L \quad (2.7)$$

2.5.2 Impuls-Experimente

Bei einem NMR-Impuls-Experiment wird die Probe in ein Magnetfeld B_O eingebracht, so dass sich die bisher energetisch ungeordneten Kerne auf die Energieniveaus verteilen und sich ein thermisches Gleichgewicht einstellt [93]. Im Anschluss daran wird die Probe mit einem kurzen (μs), hoch energetischen Radiofrequenzimpuls bestrahlt, der im Bereich der Lamorfrequenz der Kerne liegt. Dabei treten starke Kopplungen zwischen den Kernspins und dem elektromagnetischen Feld auf, wodurch Strahlung absorbiert wird [92]. Dies führt zu Übergängen der Kerne in höhere Energieniveaus. Die ebenfalls möglichen und gleich wahrscheinlichen Übergänge in niedrigere Energieniveaus verursachen Energieemission. Im Beispiel für Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ befinden sich dann mehr Kernspins im β -Zustand. Sie sind in Resonanz. In einer Probe lässt sich nur dann Resonanz erzeugen, wenn die eingestrahlte Frequenz (ν) der Lamorfrequenz entspricht (Gl. 2.8). Die Länge des Impulses wird außerdem an die gewünschte Spektrenbreite angepasst.

$$\text{Resonanzbedingung: } h \nu = \gamma \hbar B = h \nu_L \quad (2.8)$$

Nach Ende des Impulses beginnt die Relaxation. Das bedeutet, dass sich wieder das thermische Gleichgewicht einstellt, wobei beim Übergang vom angeregten in den energetisch niedrigeren Zustand Strahlung emittiert wird [92]. Diese wird als freier Induktionsabfall (engl. free induction decay, FID) detektiert. Der bis hierher beschriebene Prozess entspricht einem sogenannten Scan der NMR-Messung. Der FID ist eine Funktion der Zeit und kann mittels Fourier-Transformation in ein NMR-Spektrum umgerechnet werden [94]. Hierbei wird die Signalintensität gegen die Frequenz aufgetragen. Aufgrund dessen, dass ein einzelner FID nur eine geringe Intensität aufweist, werden viele Scans hintereinander ausgeführt und ihre Ergebnisse akkumuliert. Die Summe der FIDs wird dann schließlich der Fourier-Transformation unterzogen. Der Betrag der

Signale ist immer positiv, so dass er sich mit der Anzahl der Scans aufsummiert. Daraus folgt, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ($\frac{S}{N}$) durch die Erhöhung der Scanzahl verbessert werden kann (Gl. 2.9) [95].

$$\frac{S}{N} = \sqrt{\text{Anzahl Scans}} \quad (2.9)$$

Das setzt wiederum absolute Genauigkeit der Magnetfeld-Frequenzstabilisierung (zum Beispiel des Lock- oder Shimverfahrens) und exaktes Speichern der gewonnenen Daten voraus [92].

2.5.3 Chemische Verschiebung

Die angeregten Kerne besitzen voneinander leicht abweichende Larmorfrequenzen, da jeder durch die Elektronen in seiner unmittelbaren Umgebung vor dem äußeren Magnetfeld abgeschirmt wird [9]. Dabei entstehen im NMR-Spektrum Signale bei unterschiedlichen Resonanzfrequenzen. Die Differenz der Resonanzfrequenz der verschiedenen stark abgeschirmten Kerne zu einer gewählten Referenz wird als Verschiebung bezeichnet. Da diese jedoch vom äußeren Magnetfeld abhängt, wurde die chemische Verschiebung δ eingeführt (Gl. 2.10) [96].

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Resonanz}} - \nu_{\text{Referenz}} \text{ [Hz]}}{\nu_{\text{Referenz}} \text{ [MHz]}} \quad (2.10)$$

Als Referenz dient ein interner Standard, wie beispielsweise das chemisch recht stabile Tetramethylsilan. Sein Signal markiert auf der Frequenzachse des NMR-Spektrums eine chemische Verschiebung δ von null. Durch die Verwendung von δ ist es möglich, NMR-Spektren miteinander zu vergleichen, die nicht am selben Spektrometer und bei derselben Magnetfeldstärke aufgenommen worden sind [92]. Die Literatur bietet umfangreiche Übersichten zu den chemischen Verschiebungen von Kernen funktioneller Gruppe, Substituenten bzw. Substanzklassen [9, 92, 93, 97, 98].

2.5.4 Spin-Spin-Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum

Die Signale der chemisch-äquivalenten Kerne (gleiche Abschirmung), insbesondere von Protonen, können eine Feinstruktur aufweisen. Sie entsteht durch Kopplungen mit Kernen in der unmittelbaren Umgebung [92]. Die Multiplizität M entspricht der Anzahl der Aufspaltungen des Signals. Sie wird mit Hilfe von Gleichung 2.11 berechnet, wobei die Anzahl der äquivalenten Nachbarn durch n ausgedrückt wird [99].

$$M = 2nI + 1 \quad (2.11)$$

Für $I = \frac{1}{2}$ sind Intensitätsverhältnis und Multiplizität eines Signals durch Kopplung mit einer Kernsorte in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Signalhöhen ergeben sich aus den möglichen Spinorientierungen der äquivalenten Nachbarkerne [92]. Wenn zum Beispiel Kern A mit zwei äquivalenten Kernen X koppelt, können die Ausrichtungen der beiden X-Kerne einmal als α und α , zweimal als α und β und einmal als β und β vorliegen. Das entspricht dem Verhältnis 1:2:1, so dass das Signal von A in ein Triplett aufgespalten wird.

Tabelle 2.3: Intensitätsverhältnis und Multiplizität bei ^1H , ^1H -Kopplung mit einer Kernsorte in Anlehnung an [100]

Anzahl äquiv. Nachbarn	Intensitätsverhältnis	Multiplizität	Abk.
$n = 0$	1	Singulett	<i>s</i>
$n = 1$	1 1	Dublett	<i>d</i>
$n = 2$	1 2 1	Triplett	<i>t</i>
$n = 3$	1 3 3 1	Quartett	<i>q</i>

Wenn A zwei nicht äquivalente Nachbarn X und V besitzt, wird das Signal von A zunächst durch die Kopplung mit X in ein Dublett und dieses wiederum durch die Kopplung mit V in ein Dublett von Dubletts (Abk. *dd*) mit derselben Intensität aufgespalten.

Protonen können auch mit anderen Kernen, wie beispielsweise Fluor oder Phosphor, koppeln. Für sichtbare Kopplungen mit ^{13}C muss die Häufigkeit des Isotops erhöht werden. Dieser Sachverhalt wird in Abschnitt 2.7 genauer erläutert.

2.5.5 Kopplungskonstante J im ^1H -NMR-Spektrum

Der Abstand zwischen den eben beschriebenen Kopplungssignalen vom Ausgangssignal ist für die beteiligten Kernsignale gleich und wird als Kopplungskonstante bezeichnet [9]. Sie hängt nicht vom äußeren Magnetfeld ab und wird nur durch die Kernmomente verursacht, so dass ihr Wert eine Aussage zur chemischen Natur der koppelnden Kerne ermöglicht. Ihre Einheit ist Hertz. Zu den Werten der Kopplungskonstanten finden sich in der Grundlagenliteratur nützliche Tabellen [92, 93, 100].

2.5.6 Intensität der Signale im ^1H -NMR-Spektrum

Die Flächen unter den Signalen des ^1H -NMR-Spektrums wird als Intensität bezeichnet [92]. Durch Integration und Vergleich der gewonnenen Integrale kann die Protonenzahl pro Signal und damit im gesamten Molekül ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Integration der Multipletts vollständig erfolgt. Somit ist auch die quantitative Analyse von Gemischen mittels ^1H -NMR-Spektroskopie möglich.

2.5.7 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Aufgrund der geringeren natürlichen Häufigkeit des ^{13}C -Isotops und der daraus resultierenden niedrigeren Nachweisempfindlichkeit benötigen ^{13}C -NMR-Experimente mehr Messzeit und Probenmaterial im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie [92]. Außerdem ist zu beachten, dass Kohlenstoffkerne mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen nicht gleich stark angeregt werden und dass ihre Relaxationszeiten verschieden sein können. Bei der Messung von ^{13}C wird häufig die ^1H -Breitbandentkopplung eingesetzt [101]. Durch sie ist es möglich, jedes C-Atom-Signal als Singulett im NMR-Spektrum darzustellen, ohne dass Signalaufspaltungen durch Kopplung mit Protonen auftreten. Hierdurch entfällt jedoch der Informationsgehalt aus Multiplizität und Kopplungskonstanten [92]. Der verbleibende Parameter ist die chemische Verschiebung, die einen Bereich bis zu 230 ppm umfasst, wodurch selten Signalüberlagerungen auftreten. Hierfür bietet die bereits zitierte Literatur umfangreiche Tabellen [92, 98]. Die Besonderheiten des ^{13}C -Spektrums bei ^{13}C -Anreicherung in einer Probe wird im Abschnitt 2.7 erläutert.

2.5.8 Verfahren der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie

Bei den 2D-NMR-Messungen werden die Frequenzen von zwei Kernen auf den Achsen des NMR-Spektrums aufgetragen, wobei die Signalintensität die dritte Dimension darstellt. Dabei kann es sich um Homo- (z.B. ^1H , ^1H) bzw. Heterokorrelationen (z.B. ^1H , ^{13}C) handeln [92]. Die Bedingung für diese Experimente ist, dass skalare oder räumliche Kopplungen auftreten.

Es werden zwei Arten von zweidimensionalen NMR-Verfahren unterschieden, die entweder verschiebungskorreliert oder nach Kopplungskonstanten aufgelöst sind. Zur Strukturaufklärung kamen in dieser Arbeit ^1H , ^1H -COSY-, Long-Range-COSY-, HSQC-, ^1H , ^{13}C -HMBC-, ^1H , ^{15}N -HMBC- und das ROESY-Experiment zur Anwendung. Sie gehören zur zweidimensionalen verschiebungskorrelierten NMR-Spektroskopie. Jedes Verfahren umfasst eine Präparations-, Evolutions-, Misch- und Detektionsphase. Der zeitliche Ablauf und die Gestalt der Impulsfolgen sowie die Datenverarbeitung dieser Experimente sind sehr komplex, so dass an dieser Stelle auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet wird. Als weiterführende Literatur zur Theorie und zur Auswertung, auch für die nach Kopplungskonstanten aufgelösten Experimente, empfiehlt sich [92, 102]. Es folgt eine kurze Übersicht über die Informationen, die aus den einzelnen Verfahren gewonnen werden können.

Zur Detektion skalarer Kopplung zwischen Protonen dient das ^1H , ^1H -COSY-Experiment (engl. correlated spectroscopy). Für die Zuordnung von Protonen, deren Nachbarkerne vier bis fünf Bindungen voneinander entfernt sind, bietet sich das Long-Range-COSY-Verfahren an.

Zu den verwendeten Experimenten, die auf skalaren Korrelationen zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen beruhen, zählen HSQC (engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence) und HMBC (engl. Heteronuclear Multiple Bond Correlation) [103]. Im HSQC-Experiment werden die Kopplungen von Protonen mit dem Kohlenstoffatom aufgezeichnet, an das sie gebunden sind. Dies ermöglicht eine Zuordnung der Signale des ^1H -NMR-Spektrums zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen des ^{13}C -NMR-Spektrums. Außerdem ergibt sich daraus, welche ^{13}C -Signale zu quartären Kohlenstoffatomen gehören. Aus einem HSQC-Spektrum resultieren Strukturfragmente des untersuchten Moleküls. Die Signale im ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum entsprechen Kopplungen von Protonen mit

Kohlenstoffatomen, die in der Regel zwei oder drei Bindungen entfernt sind [92]. Diese Informationen ermöglichen meist das Zusammenfügen der einzelnen Fragmente und somit die Rekonstruktion der Molekülstruktur, da auch Kopplungssignale mit quartären Kohlenstoffatomen auftreten. Ein ähnliches Experiment kann unter anderem auch mit ^{15}N statt ^{13}C durchgeführt werden, wobei sich die Parameter der Messung unterscheiden.

Die Signale im Spektrum der Rotating-Frame-Overhauser-Enhancement-(Effect)-Spektroskopie (ROESY) gehen auf den Kern-Overhauser-Effekt (engl. Nuclear-Overhauser-Effect, NOE) zurück [92, 103]. Er spiegelt Dipol-Dipol-Wechselwirkungen durch den Raum wider. Außerdem werden die Signalintensitäten im Spektrum durch ihn beeinflusst. Allgemein herrscht Proportionalität zwischen Signalintensität und dem Besetzungsunterschied der Energieniveaus, zwischen denen der Kernresonanzübergang auftritt. Dabei sind nur Einquantenübergänge erlaubt und messbar. Im Fall eines NOE-Experiments erfolgt die kontinuierliche Sättigung der Übergänge eines Kerns, wodurch vom Gleichgewicht abweichende Besetzungsverhältnisse auftreten. Aus diesem Grund werden auch Null- und Doppelquantenübergänge bei der Relaxation wahrscheinlich, so dass sowohl eine Verstärkung als auch eine Verringerung der Signalintensität beobachtbar ist. Da der NOE-Effekt auch Einfluss auf benachbarte Kerne hat, kommt es bei deren Signalen ebenfalls zu Intensitätsänderungen. Daraus lassen sich die Abstände zwischen den Kernen ermitteln und räumliche Nachbarschaften rekonstruieren. Deshalb bieten die NOE-Experimente die Möglichkeit, Konstitution und Konformation eines Moleküls zu untersuchen.

2.6 Massenspektrometrie

Zu den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Massenspektrometrie (MS) gehören die Elementbestimmung, die Strukturaufklärung sowie die qualitative und quantitative Analyse von Stoffgemischen bis in den Ultraspurenbereich [104]. Zur Trennung von organischen Gemischen eignen sich besonders Kopplungen mit Gaschromatografie (GC), Flüssigchromatografie (LC), Kapillarelektrophorese (CE) oder Pyrolysesystemen.

Das Prinzip der MS als physikalisches Verfahren besteht in der Separation von va-

kuumstabilen Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). Die zu analysierenden Substanzen der Probe müssen demnach Ionen bilden können. Der Aufbau eines Massenspektrometers setzt sich schematisch aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Empfänger, an dem ein Computer angeschlossen ist, zusammen [105].

Zunächst wird die Probe verdampft, so dass aus den Molekülen Ionen beispielsweise mittels Elektronenstoß-, Feld- oder chemischer Ionisation generiert werden können. Je nach Höhe der aufgenommenen Ionisierungsenergie kommt es teilweise zum chemischen Zerfall der Ionen. Dieser Vorgang wird Fragmentierung genannt und verläuft über mehrere Schritte, wobei weitere Ionen, Neutralmoleküle sowie Radikale auftreten. Molekülionen mit wenig Überschussenergie fragmentieren dagegen nicht.

Alle auftretenden Ionen werden im Analysator über elektromagnetische Felder nach dem Verhältnis ihrer Masse zur Ladung (m/z) aufgetrennt bzw. fokussiert [93]. Die Spektrometer besitzen häufig Quadrupol-, Ionenfalle-, Flugzeit- oder Sektorfeldanalysatoren. Die Häufigkeit jedes Iones wird nach der Fokussierung detektiert. Dazu kommen beispielsweise Konversionsdynoden mit Sekundärelektronenvervielfacher oder Szintillationszähler zum Einsatz. Als Ergebnis wird ein Massenspektrum erhalten. Hierbei wird konzentrationsproportional die Intensität gegen das m/z Verhältnis aufgetragen [104]. Meist erfolgt die Skalierung anhand des Basispeaks.

Aus den unfragmentierten Molekülionen resultiert der sogenannte Mol- bzw. Molekülpeak [9]. Er entspricht der relativen Molekülmasse $[M]^+$ und setzt sich aus den leichtesten Isotopen zusammen. Auf ihn folgen im Abstand von $[M + 1]$, $[M + 2]$ usw. die Isotopenpeaks. Alle anderen detektierten Ionen entsprechen charakteristisch geladenen Fragmenten der Molekülstruktur, da die Fragmentierung nur entlang bestimmter, chemischer Bindungen auftritt. Einen Überblick über Fragmentierungsmechanismen und dem Vorgehen bei Strukturaufklärungen bietet beispielsweise folgende Literatur [9, 93].

2.7 Auswertung von ^{13}C -Fütterungsexperimenten

2.7.1 Bedeutung von ^{13}C im NMR- und MS-Spektrum

Fütterungsexperimente mit isotonenmarkierten Materialien dienen zur Aufklärung von Vorstufen-Produkt-Beziehungen in der Biochemie sowie in der Synthese, wie bereits in Abschnitt 2.3.2 erläutert wurde. Dabei kommt häufig das stabile ^{13}C -Isotop zum Einsatz. Seine natürliche Häufigkeit beträgt etwa 1,1 %. Eine organische Substanz besteht demnach aus Molekülen, die an verschiedenen Positionen in ihrer Struktur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1 % ^{13}C anstelle von ^{12}C aufweisen. Aus diesem Grund lassen sich organische Verbindungen mit der ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersuchen. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des ^{13}C -Isotops ist die Wahrscheinlichkeit für zwei benachbarte ^{13}C -Atome in einem Molekül jedoch sehr gering.

Bei der Beschreibung von Molekülen mit verschiedener Isotopenzusammensetzung treten zwei Begriffe auf. **Isotopomere** sind all jene, die die gleiche Anzahl an ^{12}C und ^{13}C aufweisen, wobei die Position der Isotope unberücksichtigt bleibt [106]. Demnach besitzen sie dieselbe Masse. Währenddessen werden unter dem Begriff **Isotopologe** alle Moleküle zusammengefasst, die unterschiedliche Isotopenzusammensetzungen besitzen [107].

Der natürliche Isotopologenpool einer Probe lässt sich im Massenspektrum anhand des Isotopenprofils des Molekülpeaks beobachten [108]. In Abbildung 2.17 ist ein Beispiel für drei benachbarte Kohlenstoffatome dargestellt, wobei die dunklen Kreise ^{13}C - und die hellen ^{12}C -Atome repräsentieren. Der intensivste Peak ist der Molekülpeak $[M]^+$, denn er entsteht durch das häufigste Isotopomer mit drei ^{12}C -Atomen. Der deutlich kleinere Peak $[M + 1]^+$ kommt durch alle Isotopomere zustande, die an einer der drei Positionen ^{13}C aufweisen. Im Vergleich dazu ist der Peak von $[M + 2]^+$ noch weniger intensiv. Er wird von allen Isotopomeren mit zwei ^{13}C -Atomen verursacht. Der Peak mit der geringsten Intensität entspricht einem Molekül mit drei benachbarten ^{13}C -Isotopen.

Die Isotopomere, die im MS-Spektrum durch den $[M + 1]^+$ -Peak repräsentiert werden, sind auch für die Signale der einzelnen Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum ver-

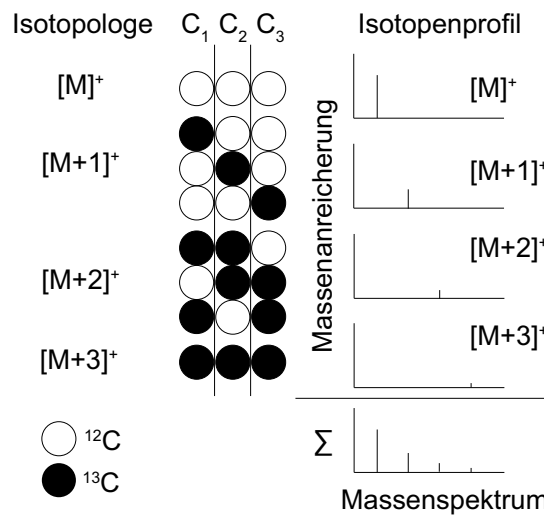


Abbildung 2.17: Beispiel für das Isotopenprofil im Massenspektrum einer C_3 -Einheit nach [108]

antwortlich, wie Abbildung 2.18 schematisch verdeutlicht. Im Gegensatz zur MS kann durch die ^{13}C -NMR-Spektroskopie die Position des ^{13}C im Molekül bestimmt werden.

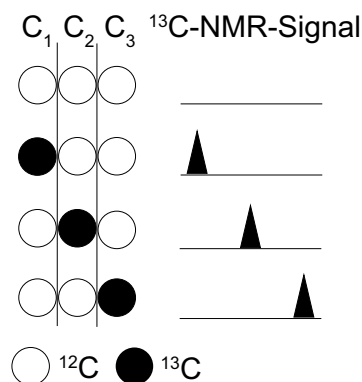


Abbildung 2.18: Signale der Isotopomere im NMR-Spektrum einer C_3 -Einheit nach [108]

Der Anteil des ^{13}C -Isotops eines oder mehrerer Kohlenstoffatome in einem Molekül kann durch Synthese oder Biosynthese mit einfach bzw. mehrfach ^{13}C -markiertem Ausgangsmaterial erhöht werden. Der biosynthetische Ansatz entspricht einem sogenannten Fütterungsexperiment. Dabei werden Pflanzen bzw. pflanzlichem Material, Pilzen oder Bakterien ^{13}C -markierte Substanzen zugeführt bzw. „gefüttert“. Die zu beobachtenden Zielmetaboliten werden nach einer Inkubationszeit von Stunden oder Tagen extrahiert und auf ^{13}C -Anreicherung untersucht. Im Wesentlichen wird durch ein erfolgreiches Fütterungsexperiment das zugeführte Isotop in einer oder mehreren Positionen angereichert, so dass Änderungen im NMR- und MS-Spektrum auftreten. Aus einem

erfolgten ^{13}C -Einbau lassen sich Rückschlüsse auf den biosynthetischen Ursprung des Zielmetaboliten ziehen. Denn wie bereits in Abschnitt 2.4 erläutert werden im Biosynthesenetzwerk größtenteils Kohlenstoffverbände desselben Ursprungs zur Bildung von Metaboliten eingesetzt.

2.7.2 Massenspektrometrie zur Analyse von ^{13}C -Anreicherung

Bei einem erfolgreichen Fütterungsexperiment erhöht sich die ^{13}C -Häufigkeit in den Molekülen des Zielmetaboliten. Je nach ^{13}C -Markierung der verwendeten Vorstufe können auch Änderungen in der Isotopologenzusammensetzung auftreten. Beide Phänomene spiegeln sich im Isotopenprofil der Molekülpeaks wider. Dabei kommt es zur Erhöhung der Peakintensitäten der Isotopomere im Vergleich zu denen einer natürlichen Referenzprobe. Wenn beispielsweise ein Fütterungsexperiment mit einer einfach ^{13}C -markierten Substanz durchgeführt wurde, erhöht sich die Intensität des $[M+1]^+$ -Peaks deutlich. Bei den darauffolgenden Peaks nimmt die Intensität im geringeren Maße zu. Dieser Sachverhalt wird beispielhaft in Abbildung 2.19 dargestellt.

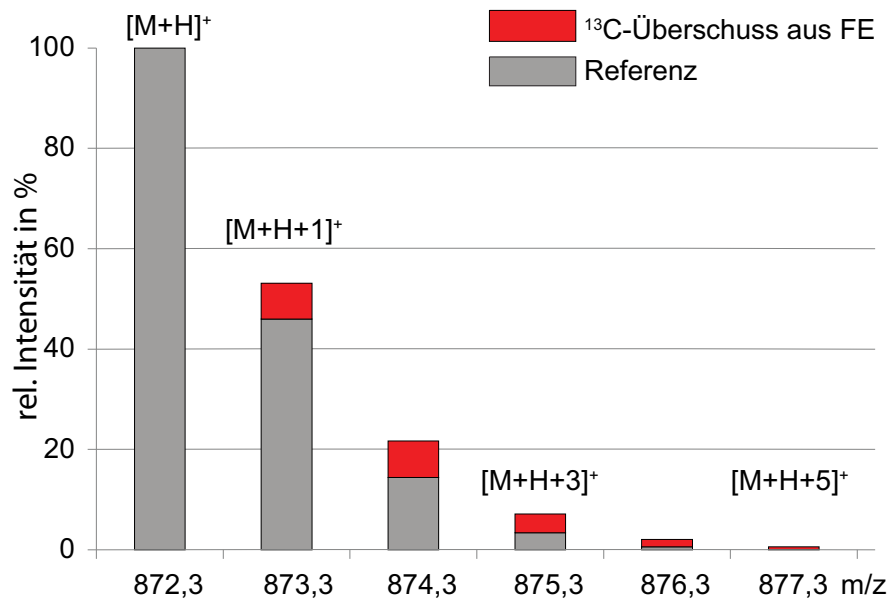


Abbildung 2.19: Vergleich der Isotopenprofile eines Metaboliten natürlichen Ursprungs (grau) und aus einem Fütterungsexperiment (FE, rot) in Anlehnung an [108]

Um die absolute ^{13}C -Anreicherung (Gl. 2.12, [109]) zu berechnen, erfolgt zunächst die Ermittlung und Gegenüberstellung der relativen Intensitäten aller Isotopomerenpeaks

der Referenz- und der Fütterungsexperimentprobe. Der Molekülpeak entspricht dabei einer Intensität von 100 %. Für jedes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aus der Referenz und dem Experiment wird die Differenz (ΔI_{m+n}) berechnet und mit der Anzahl der entsprechenden ^{13}C -Atome des Isotopomers multipliziert. Beispielsweise ist die Differenz aus den Intensitäten der $[M + 2]^+$ -Peaks (ΔI_{m+2}) zu verdoppeln. Im Anschluss wird die Summe dieser Produkte gebildet und durch die Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome im Zielmolekül dividiert. Durch Multiplikation mit 100 wird der ^{13}C -Überschuss gegenüber der Referenzprobe erhalten. Der gesamte ^{13}C -Anteil der Probe ergibt sich aus der Summe des ^{13}C -Überschusses und des natürlichen ^{13}C -Vorkommens.

$$\text{abs.}^{13}\text{C} = \frac{[\Delta I_{m+1} + \Delta I_{m+2} \cdot 2 + \Delta I_{m+3} \cdot 3 + \dots + \Delta I_{m+n} \cdot n]}{n} \cdot 100\% \quad (2.12)$$

2.7.3 NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der ^{13}C -Anreicherung

Der Vorteil der NMR-Spektroskopie besteht darin, dass festgestellt werden kann, an welcher Position bzw. an welchen Positionen im Zielmolekül ein ^{13}C -Einbau stattgefunden hat. Die Intensität des NMR-Signals eines Kohlenstoffatoms erhöht sich gegenüber dem einer Referenzprobe, wenn dort eine ^{13}C -Markierung vorliegt. Für den Fall, dass dieses Kohlenstoffatom ein oder mehrere benachbarte ^{13}C -markierte Kohlenstoffatome besitzt, treten zusätzlich Kopplungen auf, deren Kopplungskonstanten Aussagen über die chemische Natur des Nachbaratoms zulassen. Diese Kopplungssignale werden als ^{13}C -Satelliten bezeichnet. Pro ^{13}C -markiertem Nachbar tritt je ein Satellit links und rechts neben dem Zentralsignal auf [108]. Je mehr ^{13}C -markierte Nachbarn jedes Kohlenstoffatom hat, desto komplizierter wird das Satellitenmuster. Aus den oben genannten Fütterungsexperimenten mit Mehrfachmarkierung werden größtenteils verschiedene Isotopologen erhalten, deren Häufigkeit an der Intensität ihrer Satelliten abgeschätzt werden kann. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 2.20 dargestellt.

Des Weiteren lässt sich die absolute ^{13}C -Häufigkeit in einer Position und die gleichzeitige Anreicherung zweier benachbarter Positionen einer Probe berechnen. Dafür ist der Vergleich mit dem Spektrum einer natürlichen Referenzprobe derselben Konzen-

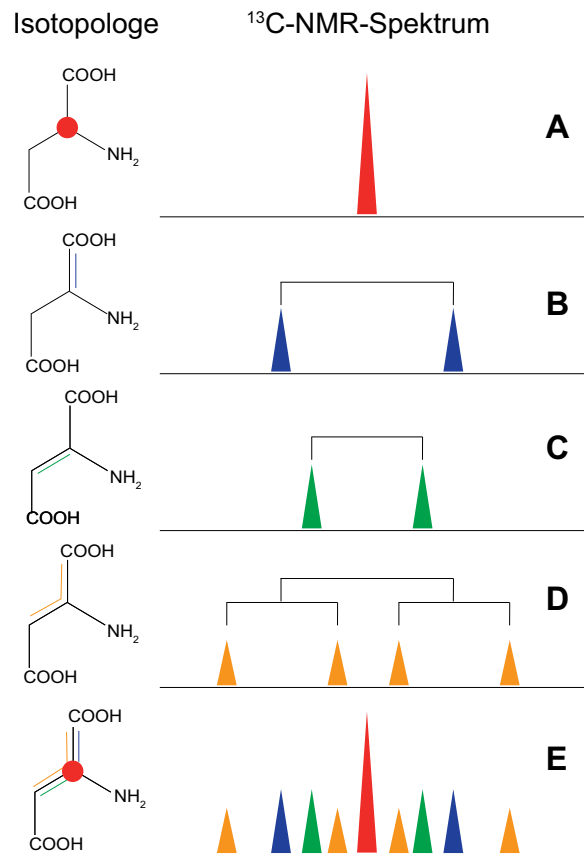


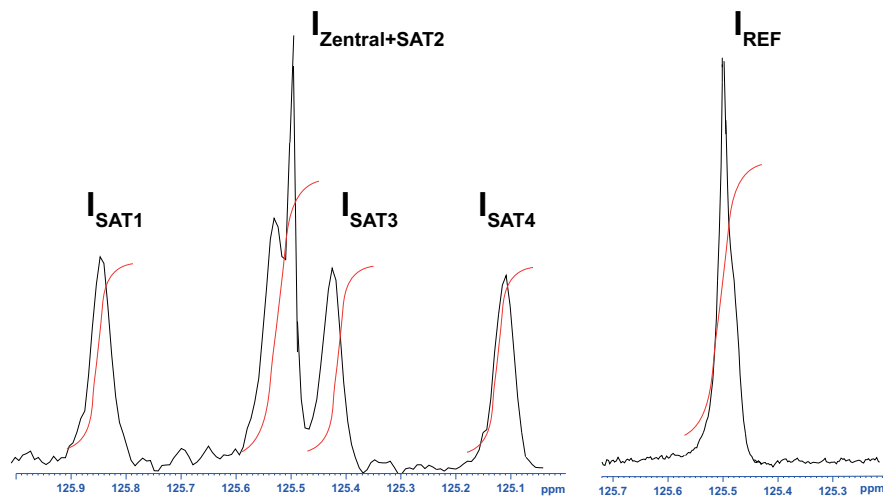
Abbildung 2.20: NMR-Signale aus den Isotopologen eines Fütterungsexperiments mit Mehrfachmarkierung in Anlehnung an [108]

tration bei gleichen Messbedingungen notwendig [14]. Die absolute ^{13}C -Häufigkeit wird ermittelt durch die Multiplikation von 0,011 mit dem Quotienten der Summe des Multipllettintegrals (I_{FE}) und dem Integral des Referenzsignals (I_{REF}) der gewünschten Position (Gl. 2.13).

$$abs.^{13}\text{C} = \frac{I_{FE}}{I_{REF}} \cdot 0,011\% \quad (2.13)$$

Die ^{13}C - ^{13}C -Anreicherung für benachbarte Kohlenstoffatome resultiert aus dem Quotienten aus der Summe der Satellitenintegrale (I_{SAT}) und dem gesamten Multipllettintegral (I_{FE}) multipliziert mit 100 %, wie Gleichung 2.14 zeigt. Eine grafische Darstellung zu beiden Berechnungen ist in Abbildung 2.21 gezeigt.

$$^{13}\text{C} - ^{13}\text{C} = \frac{I_{SAT}}{I_{FE}} \cdot 100\% \quad (2.14)$$



$$I_{FE} = I_{SAT1} + I_{SAT3} + I_{SAT4} + I_{Zentral+SAT2} \quad \text{abs. \% } ^{13}\text{C} = (I_{FE}/I_{REF}) \cdot 0,011$$

$$I_{SAT} = 4 \cdot (I_{SAT1} + I_{SAT3} + I_{SAT4}) / 3 \quad \% ^{13}\text{C-}^{13}\text{C} = (I_{SAT}/I_{FE}) \cdot 100$$

Abbildung 2.21: Berechnung der absoluten ^{13}C -Häufigkeit und der ^{13}C - ^{13}C -Anreicherung an einer Position des Zielmoleküls anhand der Signalintegrale im NMR-Spektrum des Fütterungsexperiments (links) und der Referenz (rechts)

2.8 Multivariat-statistische Auswertemethoden

Die multivariat-statistischen Verfahren kommen zum Einsatz, wenn die objektive Interpretation eines hochdimensionalen Datensatzes ermöglicht werden soll. Das kann beispielsweise auf Grund einer hohen Zahl von Objekten und Variablen oder großer Ähnlichkeit innerhalb der Daten nötig sein.

In dieser Arbeit erfolgte zum einen die Einteilung von Entwicklungsstadien der gelben *P. nudicaule* Blüten anhand ihres HPLC-DAD-Chromatogrammprofils bei 254 nm mit Hilfe einer Cluster- und Diskriminanzanalyse. Die beiden Verfahren ergänzen sich sehr gut, da mittels Clusteranalyse Gruppen gefunden und diese im Anschluss durch eine Diskriminanzanalyse analysiert werden können [110]. Zum anderen wurde die Hauptkomponentenanalyse verwendet, um die Duftprofile der verschiedenfarbigen *P. nudicaule* Blüten zu untersuchen. Im Folgenden werden die drei Auswertemethoden vorgestellt. Zusätzliche Informationen zur Durchführung und dem mathematischen Hintergrund der drei Verfahren sind der weiterführenden Literatur wie beispielsweise [110–116] zu entnehmen.

2.8.1 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse gehört zu den multivariat-explorativen Methoden [113]. Sie bietet die Möglichkeit, in einem Datensatz Objekte nach ihrer Lage im mehrdimensionalen Raum bzw. ihrer Ähnlichkeit in sogenannte Cluster zu gruppieren. Hierin zeigt sich der Unterschied zur Hauptkomponenten- und Faktorenanalyse, da bei ihnen meist die Strukturierung der Variablen im Vordergrund steht [114]. Nach einer Clusteranalyse soll die Ähnlichkeit innerhalb jedes Clusters möglichst groß und zwischen ihnen klein sein. Das Ergebnis ist ein Dendrogramm, aus dem die Anzahl der verschiedenen Cluster, ihre Distanzen zueinander und die enthaltenen Objekte abgelesen werden können. Ein großer Abstand spiegelt ein stabiles Cluster wider [113]. Der Datensatz wird zu Beginn der Analyse standardisiert (Gl. 2.15), um die Vergleichbarkeit von Daten mit unterschiedlichen Dimensionen zu gewährleisten.

$$z_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \text{ mit } s_j = \sqrt{\frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x}_j)^2} \quad (2.15)$$

Bei der hierarchischen Clusteranalyse steht die Anzahl der Cluster zu Beginn nicht fest [113]. Für jedes Objekt wird die Distanz zu allen anderen berechnet. Im Anschluss erfolgt die Zusammenfassung dieser Ergebnisse in einer Distanzmatrix. Aus den berechneten Distanzen leitet sich ab, welche beiden Objekte die geringste Distanz und damit die größte Ähnlichkeit aufweisen. Nach dem Ersetzen ihrer Werte in der Distanzmatrix durch die des neuen Clusters wiederholt sich der beschriebene Fusionierungsschritt solange, bis nur noch ein Cluster existiert [115].

Für die Fusionierung gibt es verschiedene Algorithmen wie beispielsweise die Ward-Methode [113]. Wenn diese mit dem quadriert-euklidischen Distanzmaß verwendet wird, resultieren daraus Cluster, durch die die Gesamtvarianz am geringsten zunimmt. Damit ist es möglich, die reale Struktur des Datensatzes widerzuspiegeln, solange die Cluster vergleichbare Besetzungszahlen aufweisen. Die Berücksichtigung der Gesamtvarianz anstelle der kleinsten Distanz zwischen den Gruppen unterscheidet die Ward-Methode von anderen häufig verwendeten Verfahren wie zum Beispiel Single-, Complete- und Average-Linkage [110].

2.8.2 Lineare Diskriminanzanalyse

Die Zuordnung von neuen Objekten in bestehende Gruppen (Klassifikation) und die Ermittlung der Variablen, die zur Diskrimination beitragen, sind zwei Anwendungsmöglichkeiten der linearen Diskriminanzanalyse [112]. Diese gehört zu den konfirmatorischen Verfahren, weil die Daten noch vor der Analyse mittels *a-priori*-Wissen gruppiert werden. Die Vorabinformation kann beispielsweise aus der Clusteranalyse des Datensatzes stammen.

Innerhalb der gegebenen Klassen wird zunächst für jede Variable der Mittelwert ermittelt. Für die Diskriminierung sind nur solche Variablen zu berücksichtigen, deren Mittelwerte zwischen den Klassen voneinander abweichen [110]. Die Variablen werden in einer Datenmatrix zusammengefasst und zur Bildung von Diskriminanzfunktionen aus ihren Linearkombinationen genutzt [111, 113]. Als Diskriminanzkriterium dient das Maximum aus dem Quotienten der Streuung zwischen und innerhalb der Klassen wie Gleichung 2.16 zeigt.

$$\frac{QS_{zwischen}}{QS_{innerhalb}} = max! \quad (2.16)$$

Die größtmögliche Zahl dieser Funktionen ist genau um eins kleiner als die der vorgegebenen Klassen. Die Diskriminanzfunktionen können je nach Datensatz Geraden, Flächen bzw. Hyperflächen entsprechen, so dass in manchen Fällen eine grafische Darstellung möglich ist [116]. Dabei ist zu beachten, dass es sich um einen n -dimensionalen Raum handelt, bei dem n für die Anzahl der Variablen steht.

Um zu überprüfen, ob sich mit Hilfe der Diskriminanzanalyse eine gute Trennung ergibt, existieren mehrere Möglichkeiten. Zum einen können die berechneten Diskriminanzfunktionen gegeneinander aufgetragen werden, um die Unterscheidung der vorgegebenen Klassen zu visualisieren. Jedoch trägt nicht jede Funktion zur Trennung aller Klassen bei. Eine zweite Bewertungsmöglichkeit bieten mathematische Maße wie die kanonischen Korrelationskoeffizienten (Gl. 2.17), das Wilks- Λ -Kriterium (Gl. 2.18) oder Hotellings Spurkriterium (Gl. 2.19), wobei λ dem Eigenwert, G der Kovarianzmatrix innerhalb der Klassen und H der Kovarianzmatrix zwischen den Klassen ent-

sprechen [112, 114]. Wenn die kanonischen Korrelationskoeffizienten nahe eins bzw. Wilks- Λ nahe null liegen, wird eine gute Trennung der Gruppen erreicht.

$$c = \sqrt{\frac{\lambda}{1 + \lambda}} \quad (2.17)$$

$$\Lambda = \frac{G}{G + H} = \prod_{i=1}^I \frac{1}{1 + \lambda_i} \quad (2.18)$$

$$T^2 = Sp\left(\frac{H}{G}\right) = \sum_{i=1}^I \lambda_i \quad (2.19)$$

2.8.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. principal components analysis, PCA) dient dazu, die Ursprungsvariablen durch eine geringe Zahl voneinander unabhängiger Hauptkomponenten darzustellen, wobei der anfängliche Informationsgehalt weitestgehend erhalten bleibt [113]. Daraus ergibt sich eine Dimensionsreduzierung und somit eine Vereinfachung, die oft die graphische Darstellung von hochdimensionalen Datensätzen in zwei oder drei Dimensionen ermöglicht. Dabei soll die Datenstruktur mit einer minimalen Anzahl an Hauptkomponenten möglichst genau reproduziert werden, obwohl keine Berücksichtigung der Einzelvarianz (spezielle Varianz und Messfehlervarianz) erfolgt und so Informationsverlust auftreten kann [110].

Eine Voraussetzung für die Durchführung der PCA ist, dass Zusammenhänge zwischen den Variablen bestehen, die in der Kovarianz- bzw. Korrelationsmatrix wiedergegeben werden [113]. Die Variablen können so als Linearkombinationen der orthogonalen Hauptkomponenten auftreten. Wenn keine Beziehung zwischen den Variablen besteht, entspricht ihre Anzahl der maximalen Zahl an Hauptkomponenten. Das Produkt aus der Scorematrix und der transformierten Matrix der Ladungen wird der zentrierten Datenmatrix gleichgesetzt. Die Spalten der Ladungsmatrix entsprechen den Eigenvektoren aus der Kovarianz- bzw. Korrelationsmatrix. Der Betrag der Eigenwerte jeder Hauptkomponenten ist ein direktes Maß für den Varianzanteil an der Gesamtvarianz.

Hauptkomponente 1 repräsentiert den maximalen Anteil der Gesamtvarianz und die von ihr unabhängige Hauptkomponente 2 entspricht dem maximalen Anteil der Restvarianz [116]. Dieses Prinzip wiederholt sich, bis nur noch Hauptkomponenten mit kleinen Eigenwerten auftreten. Die prozentualen Anteile der Hauptkomponenten an der Gesamtvarianz lassen sich am sogenannten Screeplot ablesen [113]. Hier werden die Eigenwerte in Abhängigkeit von der Anzahl der Hauptkomponenten dargestellt. Außerdem kann zur Identifizierung der relevanten Hauptkomponenten das Kaiser-Kriterium herangezogen werden. Es gibt vor, ausschließlich Hauptkomponenten mit einem Eigenwert größer eins zu berücksichtigen.

Im Scoreplot werden die gewählten Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen und die Objekte entsprechend ihrer Werte angeordnet. Aus dieser Darstellung lassen sich auch Gruppierungen ablesen. Für den Fall, dass stattdessen im Koordinatensystem der Hauptkomponenten die Ladungen aller Variablen dargestellt werden, kann gefolgert werden, welchen Einfluss die Variable an der Hauptkomponente hat. Beispielsweise nehmen Variablen nahe null kaum Einfluss auf die Hauptkomponente, während Variablen mit ähnlichen Ladungen einen vergleichbaren Beitrag leisten.

3 Experimentelles

3.1 Pflege der *P. nudicaule* Kultivare

Die Samen der *P. nudicaule* Kultivare *summer breeze yellow* und *summer breeze orange* wurden von der Jelitto Staudensamen GmbH und die von *wonderland white* und *matadore* (rot) vom Fachhändler Syringa bezogen. Die Aussaaten erfolgten im Abstand von fünf Wochen, wobei bis zur Knospenbildung zwischen acht bis zehn Wochen vergingen. Ab diesem Zeitpunkt standen in einem Zeitraum von ein bis drei Monaten Knospen und offene Blüten zur Verfügung. In unregelmäßigen Abständen trat jedoch bei älteren Pflanzen ein Pilzbefall (Mehltau) auf. Sie wurden entweder mit dem Fungizid Baymat (flüssig, 0,1 V%) behandelt oder entsorgt. Das Blütenmaterial diente nach einer chemischen Behandlung lediglich für die Isolation von Referenzsubstanzen. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden mit Proben gesunder Pflanzen durchgeführt.

Am Tag herrschten in der Gewächshauskabine 21 °C bis 23 °C und in der Nacht 19 °C bis 21 °C bei einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 % und 60 %. Die gleichmäßige Beleuchtung der Pflanzen wurde über bewegliche Lampen (Phillips Sun-T Agro 400 Na lights) sichergestellt, die bei unzureichenden äußeren Lichtverhältnissen von 7.00 bis 21.00 Uhr zugeschaltet waren. Außerdem erfolgte die tägliche Bewässerung automatisch für etwa zehn Minuten.

3.2 Synthesen

3.2.1 Hydrierung der Nudicauline

Alle während dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und ihre Bezugsquellen sind in Anhang C aufgeführt. Eine Übersicht zu den technischen Parametern der verwendeten Geräten sowie den Analysenmethoden befindet sich in Anhang D bzw. E.

Zu einer methanolischen Lösung von 5 mg Nudicaulin I bzw. II wurde 1 mg Palladium auf Aktivkohle als Katalysator zugesetzt. Im Anschluss erfolgte das Sekurieren des Reaktionsgefäßes und Anfügen eines Septums mit Spritze. An diese konnte nun ein mit Wasserstoff gefüllter Ballon befestigt werden, so dass nach und nach das Gas in die Reaktionslösung strömte. Nach zwölfstündigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung des Katalysators durch Filtration. Im Anschluss an analytische HPLC-DAD-Messungen (Methode 1, Anhang E) wurde die Isolation des hydrierten Nudicaulins mittels präparativer HPLC (Methode 5, Anhang E) durchgeführt. Die Ausbeute betrug für die beiden Dihydronudicauline jeweils 76 %. Daran schlossen sich umfassende NMR-Experimente am 500 MHz Spektrometer sowie HR-ESI-MS-Messungen (Methode 7, Anhang E) an.

3.2.2 Methylierung der Nudicauline

Zu einer Lösung aus 5 mg Nudicaulin I bzw. II in trockenem DMSO wurden nach und nach 30 mg Natriumhydroxidpulver unter kräftigem Rühren hinzugefügt. Nach vollständigem Lösen der Base erfolgte die Zugabe von 1 ml Methyljodid. Im Anschluss an das zweistündige Rühren wurde eine analytische HPLC-DAD-Messung (Methode 2, Anhang E) durchgeführt, bevor die Reaktionslösung mit wenig Chloroform extrahiert, zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich getrocknet wurde. Mit Hilfe der präparativen HPLC (Methode 6, Anhang E) erfolgte die Gewinnung des Reaktionsprodukts mit einer Ausbeute von 83 %. Daran schloss sich die Vorbereitung für die NMR-Messungen am 500 MHz Spektrometer sowie HR-ESI-MS-Messungen (Methode 7, Anhang E) an.

3.2.3 Enzymatische Hydrolyse der Nudicauline

Vorversuche mit zwei Cellulasen, zwei Pektinasen und einer β -Glucosidase ergaben, dass ausschließlich die Pektinase von *Aspergillus aculeatus* in der Lage war, die Nudicauline zu hydrolysieren. Einer Lösung aus 5 mg Nudicaulin I bzw. II in 10 ml Essigsäurepuffer (pH-Wert 5,0) wurden 1 ml Pektinase aus *Aspergillus aculeatus* hinzugefügt

und das Gemisch für zwei Stunden bei 55 °C gerührt. Die Überwachung der Reaktion erfolgte durch regelmäßige Probennahmen und Messungen mittels analytischer HPLC (Methode 1, Anhang E). Zur Beendigung der Reaktion dienten 5 ml Eisessig. Die partiell hydrolysierten Nudicauline wurden durch präparative HPLC (Methode 5, Anhang E) voneinander getrennt. Je nach Reaktionslaufzeit konnte einfach oder zweifach glukosyliertes Nudicaulin I bzw. II isoliert werden. Es folgten NMR-Experimente am 500 MHz Spektrometer und HR-ESI-MS-Messungen (Methode 7, Anhang E) mit je 4 mg Substanz.

3.2.4 Darstellung von [2-¹³C]-*p*-Cumarsäure

Zunächst wurde 1 g [2-¹³C]Malonsäure in 4 ml Pyridin vorgelegt [117]. Nachdem die schwach exotherme Reaktion abgeklungen war, folgte die Zugabe von 1 g 4-Hydroxybenzaldehyd und 200 µl Piperidin. Im Anschluss wurde das Gemisch unter Rückfluss für etwa zwanzig Minuten gerührt. Die Beobachtung der typischen Kohlenstoffdioxidentwicklung blieb jedoch aufgrund des kleinen Ansatzes aus. Zum Auskristallisieren der *p*-Cumarsäure dienten etwas Eis und konzentrierte Salzsäure. Die über Nacht entstandenen Kristalle wurden mittels Zentrifugation gewonnen und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Die NMR-Analyse zeigte, dass es sich um das reine Produkt handelte. Die Ausbeute betrug 90 %.

3.2.5 Herstellung von [¹³C₁₀]Tryptamin

[¹³C₁₁]Tryptophan (43 mg) wurden in 20 ml Cyclohexanol mit 200 µl Cyclohexanon gelöst [118] und für drei Stunden bei 160 °C unter leichtem Rückfluss gerührt. Nach zwölfstündiger Lagerung im Kühlschrank hatten sich einige gelbe Kristalle gebildet. Nun erfolgte die Zugabe von 3 ml Essigsäure (5 %), so dass sich die Kristalle auflösten. Dabei trat eine Trennung in eine gelbe und braune Phase auf. Die obere gelbe Phase wurde abgenommen und filtriert, während die braune Phase mit 3 ml Essigsäure gewaschen und der Überstand erneut abgetrennt wurde. Im Anschluss erfolgte die Vereinigung der beiden Filtrate und die Zugabe von 3 ml Chloroform. Danach wurde Natriumhydrogencarbonat unter starkem Rühren hinzugefügt bis das Schäumen

aufhörte. Nun folgte eine weitere Filtration der gelben, wässrigen Phase und deren Kühlung für einige Stunden. Natriumhydroxid diente dazu, den pH-Wert der Lösung ins Alkalische zu verschieben, so dass sich über Nacht im Reaktionsgefäß bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kristalle bildeten. Sie wurden filtriert und getrocknet. Laut einer Messung mittels analytischer HPLC (Methode 3, Anhang E) lag bei einer Ausbeute von 85 % eine Reinheit von mehr als 97 % vor.

3.3 Durchführung der Experimente

3.3.1 Fütterungsexperimente

Zunächst wurden die gewünschte Menge an ^{13}C -markierte Vorstufe (siehe Tabellen in Anhang B) und 200 mg Glucose in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und zur Sterilisation autoklaviert. Im Anschluss erfolgte die Ernte des Blütenmaterials. Dabei wurde darauf geachtet, ausschließlich größere Knospen zu beproben, die deutlich über den Blättern der Pflanzen standen. Mit einem Skalpell erfolgte die Zerkleinerung der Blüten (ca. 1 g), die dann zur Fütterungslösung gegeben wurden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler für durchschnittlich vier Tage, da bei längerer Experimentdauer mit bakteriellem bzw. fungalem Befall zu rechnen war. Schließlich wurde mit der Nudicaulinisolation begonnen wie im nächsten Abschnitt beschrieben. Eine schematische Übersicht über den Verlauf des Fütterungsexperiments gibt Abbildung 3.1.

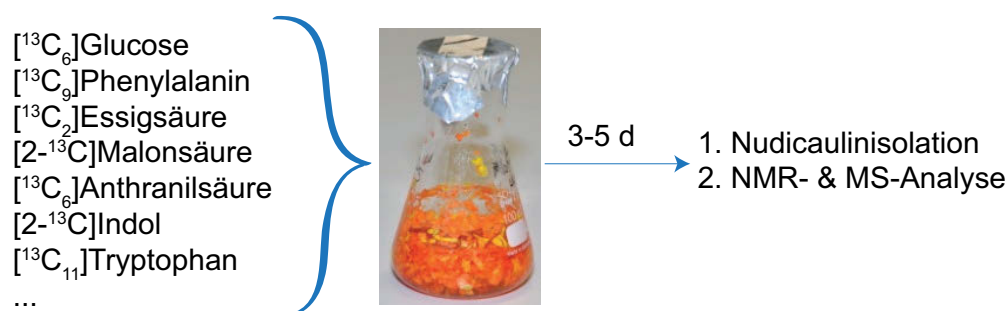


Abbildung 3.1: Schema Fütterungsexperimente

3.3.2 Trennungsgang und Nudicaulinisolation

In Schema 3.2 ist die Aufarbeitung von Blütenmaterial und Fütterungsexperimenten zur Isolation der Nudicauline dargestellt. Als Erstes wurde das Blütenmaterial mehrfach mit Methanol extrahiert, bis es farblos war. Danach erfolgte die Trocknung des Extrakts.

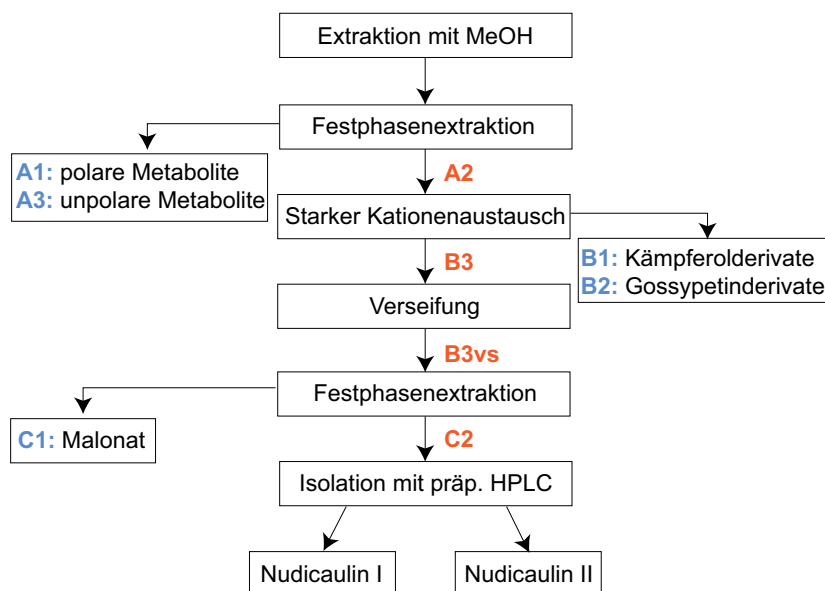


Abbildung 3.2: Trennungsgang zur Nudicaulinisolation modifiziert nach [15]

Der zweite Aufarbeitungsschritt bestand in einer Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE), um die polaren Verbindungen wie beispielsweise Zucker und Aminosäuren abzutrennen. Die SPE-RP18-Säule (Discovery[®] DSC-18 SPE, Sigma-Aldrich) wurde mit Methanol gespült und mit Wasser äquilibriert, bevor der in Wasser aufgenommene Extrakt aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte schließlich in drei Schritten. Die polaren Verbindungen konnten als Erstes mit Wasser gewonnen werden (Fraktion A1). Im zweiten Schritt wurden die weniger polaren Verbindungen, wie die Nudicauline und Kämpferole, mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1 Vol. %) vom Adsorbens eluiert (Fraktion A2). Danach erfolgte die Gewinnung der unpolaren Substanzen mit Methanol (Fraktion A3). Alle drei Fraktionen wurden im Anschluss getrocknet und zurückgestellt.

Im sauren Milieu weisen die Nudicauline durch Protonierung am Stickstoff eine positive Ladung auf, sodass sie sich von ungeladenen Verbindungen wie den Kämpferolen durch starken Kationenaustausch (engl. strong cation exchange, SCX) trennen lassen.

Dazu wurde die SCX-Säule (Discovery[®] DSC-SCX SPE Sigma-Aldrich) mit Methanol gespült und im Anschluss mit Natriumdihydrogenphosphat-/ Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH-Wert 5,8 [119]) äquilibriert. Währenddessen erfolgten das Lösen der Fraktion A2 in Puffer und das Auftragen auf die Säule. Die Elution der Verbindungen umfasste wieder drei Schritte. Fraktion B1 wurde mit dem Puffer und Fraktion B2 mit Methanol von der Säule gewaschen. Mit Hilfe von ammoniakalischem Methanol erfolgte die Elution der Fraktion B3. Anschließend wurden die Eluate getrocknet und aufbewahrt.

Die Glucosesubstituenten **A** und/oder **C** der Nudicauline III bis VIII liegen mit Malonsäure substituiert vor. Um die Analyse der beiden Diastereomere zu ermöglichen, war eine Verseifung im alkalischen Milieu erforderlich. Dazu wurde die Fraktion B3 in Wasser gelöst, mit 1 M Natriumhydroxidlösung versetzt und 30 Minuten gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch die Zugabe von Eisessig. Die daraus gewonnene Fraktion B3vs wurde getrocknet.

Um die Nebenprodukte der Verseifung und mögliche Pufferreste des Kationenaustauschs zu beseitigen, schloss sich an die Verseifung eine erneute Festphasenextraktion an. Ihr Ablauf entspricht dem der Festphasenextraktion im zweiten Aufarbeitungsschritt. Die Fraktionen C1 bis C3 wurden im Anschluss getrocknet. Das Eluat C2 enthielt die beiden Nudicaulindiastereomere, die nun mittels präparativer HPLC-DAD isoliert werden konnten (Methode 5, Anhang E). Im Anschluss folgten NMR-Experimente am 500 MHz Spektrometer bzw. 700 MHz Spektrometer (FE mit Indol und Tyrosin) sowie HR-ESI-MS-Messungen (Methode 7, Anhang E).

3.3.3 Einteilung Entwicklungsstadien

Für die Einteilung der Entwicklungsstadien in gelb blühenden *P. nudicaule* erfolgte zunächst die Ernte aller 23 Knospen von fünfzehn Pflanzen zum selben Tageszeitpunkt. Das gesamte Blütenmaterial einer Knospe wurde dabei als Probe verwendet. Nach zehnminütiger Extraktion mit Methanol im Ultraschallbad wurden die Proben zentrifugiert, filtriert (Filterporengröße 0,45 μm) und schließlich getrocknet. Daran schloss sich die HPLC-DAD-Analyse (Methode 3, Anhang E) an, wobei die Proben eine Konzentration von 3 mg/ml aufwiesen und je 10 μl zur Messung verwendet wurden. Die

Detektionswellenlängen waren 210, 254, 280, 350 und 460 nm. Im weiteren Verlauf wurden die Proben dem Protokoll der Nudicaulinisolation (siehe Abschnitt 3.3.2) unterzogen, wobei bei jedem Aufarbeitungsschritt für alle Fraktionen analytische HPLC-DAD-Messungen (Methode 3, Anhang E) erfolgten. In ausgewählten Fällen wurden ebenfalls LC-MS-Messungen (Methode 8, Anhang E) durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3 vorgestellt und sind Grundlage für die anschließende Proteom- und Transkriptomanalyse.

Des Weiteren erfolgte die Einteilung der Blütenentwicklung in Stadien für die weiß und orange blühenden *P. nudicaule* Kultivare im Rahmen eines Praktikums durch Bettina Dudek [120]. Die hier erhaltenen Ergebnisse wurden ebenfalls zur Probennahme für die Transkriptomanalyse herangezogen.

3.3.4 Duftsammlung

Zur Sammlung der flüchtigen Verbindungen diente ein am Institut bewährter Versuchsaufbau mit einem 2 l Glaszylinder und Pumpensystem. Jedes Experiment erfolgte an einzelnen frisch geöffneten Blüten. Eine zweiteilige Teflonscheibe separierte die Blüte im Glaszylinder von den übrigen Pflanzenteilen, so dass das System abgeschlossen war. Nun wurde von oben durch Aktivkohle gefilterte Luft (0,4 l/min) zugeführt und bei richtiger Platzierung des Materials direkt neben der Blüte mit 0,2 l/min wieder abgepumpt. Hier war außerdem ein Glasfilter mit Glaswolle sowie 20 mg Filtermaterial (Super-Q, Alltech Associates Inc.) zur Adsorption der flüchtigen Substanzen angebracht. Die Versuchsdauer betrug etwa sieben Stunden. Danach wurden die gesammelten Verbindungen mit 1 ml Dichlormethan vom Filtermaterial eluiert, auf 200 μ l unter Stickstoffstrom eingeeengt und je 1 μ l ohne Split mittels GC-MS (Methode 9, Anhang E) gemessen. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch Vergleich der Massenspektren und Kovats-Indizes mit denen von Referenzsubstanzen.

3.3.5 Probenvorbereitung Proteomanalyse

Durch Vorversuche mit verschiedenen Proteinextraktionsprotokollen wurde eine Probenmenge von 3 g pro Entwicklungsstadium ermittelt. Daraus resultierte, dass eine

einzigste Probennahme an den vorhandenen zwanzig Pflanzen nicht ausreichte, um diese Menge für jedes der fünf Stadien zu gewinnen. Aus diesem Grund erfolgten insgesamt fünf Probennahmen an diesen Pflanzen im Abstand von vier bis fünf Tagen.

Alle verfügbaren Knospen wurden geerntet und sofort mit Eis gekühlt. Im Anschluss erfolgten das Entfernen der Blütenblätter und die Einteilung in das jeweilige Entwicklungsstadium. Das zugeordnete Probenmaterial wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in 50 ml Kunststoffröhren zwischengelagert. Nach Beendigung der Einteilung erfolgte die Zerkleinerung der Proben in einem Mörser, wobei ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Schließlich erfolgte das Abfüllen der Proben in Kunststoffröhrchen und die Lagerung bis zur Proteinextraktion bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Proteine wurde mit Hilfe einer phenolischen Extraktionsmethode [121] gewonnen. Dazu erfolgten zunächst die Suspension der tief gefrorenen Proben in Extraktionspuffer (pH-Wert 8,0 aus 500 *mM* TRIS-HCl, 50 *mM* EDTA, 700 *mM* Sucrose und 100 *mM* KCl, 2 % β -Mercaptoethanol, 1 *mM* Phenylmethylsulfonylfluorid), Homogenisierung und Schütteln bei Eiskühlung für zehn Minuten. Danach wurde das gleiche Volumen TRIS-gesättigter Phenolpuffer hinzugefügt und für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Um die wässrige und phenolische Phase voneinander zu trennen, erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation (5500 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die obere, organische Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Tube überführt und noch einmal mit Extraktionspuffer für drei Minuten gewaschen, bevor sich eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten (5500 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) anschloss. Nun erfolgten die Überführung der phenolischen Phase in ein neues Tube und die Zugabe des vierfachen Volumens an Fällungsreagenz (0,1 *mM* Ammoniumacetat in Methanol). An das Homogenisieren des Gemisches schloss sich die Lagerung über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ an, um eine vollständige Fällung zu ermöglichen. Nach fünfminütiger Zentrifugation (5500 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das entstandene Proteinpellet dreimal mit Fällungsreagenz und schließlich mit Aceton gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 5500 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Pellet wurde danach unter Vakuum getrocknet. Erst dann erfolgte die Zugabe des Puffers für die isoelektrische Fokussierung (7 *M* Urea, 2 *M* Thiourea, 2 % CHAPS, 20 *mM* TRIS, 0,5 % Pharmalytes pH 3-11). Die Suspension wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgt mit Hilfe der Bradfordmethode [122].

Um einen direkten Vergleich der Proteinzusammensetzungen zwischen den Entwicklungsstadien zu ermöglichen, wurde die 2D-differentielle Gelelektrophorese (Abk. 2D-DIGE) nach dem Protokoll [123] mit Hilfe eines Kits (Refraction-2D Labeling Kit, NH DyeAGNOSTICS GmbH) eingesetzt. Auf jedem der fünfzehn Gele wurden insgesamt drei Proteinproben getrennt. Eine Probe entsprach dabei dem internen Standard aus allen fünf Entwicklungsstadienproben, die übrigen beiden Proben waren von je einem Entwicklungsstadium. Jede dieser Proben wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen, der kovalent an die Aminosäure Lysin binden kann. Die drei Fluoreszenzfarbstoffe unterschieden sich in ihren Anregungs- und Emissionwellenlängen, daher konnten die Proteine der einzelnen Proben getrennt voneinander detektiert werden. Die fünfzehn Gele setzten sich aus je drei technischen Replikaten von randomisierten Probenkombinationen zusammen, die mit der jeweiligen Farbstoffmarkierung der Proben in Tabelle 3.1 wiedergegeben ist.

Tabelle 3.1: Probenzusammensetzung und Farbstoffmarkierung der 2D-DIGE-Gele

	Farbstoff 1	Farbstoff 2
Gel 1	ES-1	ES-3
Gel 2	ES-2	ES-5
Gel 3	ES-3	ES-4
Gel 4	ES-5	ES-2
Gel 5	ES-4	ES-1

Die Gele wurden nach der Fluoreszenzmessung bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C in 3 % Essigsäure gelagert. Mit Hilfe der Software Delta2D (Decodon) erfolgte die Auswertung und der Vergleich der einzelnen Gelbilder. Der Vorteil dieser 2D-DIGE-Methode besteht darin, dass die interessanten Proteine direkt ausgeschnitten und nach kurzer Probenvorbereitung mittels Massenspektrometrie gemessen und durch Abgleich mit Datenbanken identifiziert werden können. Die Durchführung und Auswertung der beschriebenen Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Yvonne Hupfer, Dr. Natalie Wielsch und Dr. Aleš Svatoš der Massenspektrometrie- und Proteomicsgruppe des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie.

3.3.6 Probenvorbereitung Transkriptomanalyse

Im Gegensatz zur Proteinextraktion kommt die Extraktion der RNA mit sehr wenig Probenmaterial aus. Die Probennahme erfolgte an denselben Pflanzen, wie für die Proteomanalyse. Zur Analyse der weiß, gelb und orange blühenden *P. nudicaule* Pflanzen wurde pro Entwicklungsstadium eine Knospe ausgewählt und die Blütenblätter entfernt. Mit dem methanolischen Extrakt eines der vier bis fünf Blütenblätter erfolgte eine HPLC-DAD-Analyse zur Überprüfung des Entwicklungsstandes (Methode 3, Anhang E). Die übrigen wurden sofort in 0,45 ml Lysepuffer getaucht, der in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt war. Danach wurde die Probe direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Außerdem befanden sich in den Zentrifugenröhrchen je zwei Stahlkugeln (Durchmesser 3 mm), die später bei der Aufarbeitung zur Zerkleinerung und Homogenisierung dienten. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die RNA-Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur an einem sterilen RNA-Arbeitsplatz mit Hilfe des *innuPREP RNA Mini-Kits* (LifeScience unlimited - analytik jena Biometra) und dessen Protokoll 1 aus der zugehörigen Anleitung. Im Folgenden wurden die aufgetauten Proben bei 50 Hz mit einem TissueLyser LT (Qiagen) homogenisiert und für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert, nachdem die Stahlkugeln aus den Probengefäßen entfernt worden waren. Danach wurde über Festphasenextraktionssäulen des Kits die genomische DNA aus den Proben entfernt und die Filtrate für zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Nun erfolgte die Zugabe einer Lösung aus 70 % Ethanol und 30 % RNA-freiem Wasser, deren Volumen, dem der Proben entsprach. Im nächsten Schritt wurde über eine weitere Festphasenextraktion die RNA adsorbiert, zweimal gewaschen, danach getrocknet und mit 30 μ l RNA-freiem Wasser inkubiert, bevor sie schließlich unter Eiskühlung eluiert wurde. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Konzentration der extrahierten RNA erfolgten Messungen von je 1 μ l jeder Probe mit einem Spektrophotometer (ND-1000, Peqlab) im Wellenlängenbereich zwischen 220 nm und 350 nm. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht die Absorptionseinheit A_{260} 40 ng/ μ l m-RNA. Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280 nm für saubere RNA liegt bei 1,9 - 2,2. Er wurde für alle bearbeiteten

Proben eingehalten, wobei die RNA-Konzentrationen aus den fünf Entwicklungsstadien der gelb, weiß und orange blühenden *P. nudicaule* Pflanzen materialabhängig zwischen 80 ng/ μ l und 350 ng/ μ l lagen.

Um die Qualität der isolierten RNA zu bewerten, wurden 1 μ l der Proben mit dem Kit *RNA 6000 Nano* (Agilent) und dessen Anleitung aufgearbeitet und am Agilent 2100 Bioanalyzer gemessen. Auf dem Chip des Kits können insgesamt zwölf RNA-Proben mit einem Standard durch Kapillarelektrophorese parallel analysiert werden. Dazu erfolgt zunächst die Vorbereitung und das Auftragen des Matrixgels, des RNA-Anfärbemittels und des RNA-Markers auf den Chip, bevor die Proben in die für sie vorgesehenen Wells pipettiert werden. Die Trennung der RNA-Fragmente nach ihrer Größe und Laufzeit erfolgt im Anschluss durch das bei der Bioanalyzer-Messung angelegte elektrische Feld. Zur Detektion wird ihre Fluoreszenz genutzt. Aus der Intensität der Fluoreszenz und der Laufzeit ermittelte die Software Elektropherogramme und die Konzentration der RNA durch den Parametervergleich mit dem mitgeführten Standard. Da sowohl die Qualität als auch die Konzentration der RNA-Proben aus den Entwicklungsstadien der gelben, weißen und orangen Kultivare den Ansprüchen genügten, konnten Transkriptomanalysen durchgeführt werden.

Die Transkriptomsequenzierung wurde beim Max-Planck-Genome-Center-Köln in Auftrag gegeben. Die Aufarbeitung der Daten (Assemblierung, Genexpressionsanalysen, Annotierungen) erfolgte in Kooperation mit Dr. Heiko Vogel (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie).

3.3.7 Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Unter dem Begriff Qualitätssicherung werden alle Präventivmaßnahmen zusammengefasst, die darauf abzielen, alle Qualitätsanforderungen bzw. ihre Bestimmungen zu erfüllen [124]. Dies ist insbesondere für die Prozesse und Ergebnisse in der analytischen Chemie und ihren Anwendungsgebieten wie beispielsweise in Forschung und Entwicklung, Pharmazie sowie Lebensmittelproduktion relevant.

In der vorliegenden Arbeit standen qualitative Analysen im Vordergrund, dafür wurden viele verschiedene Maßnahmen zur Qualitätssicherung ergriffen. Sie werden im Folgen-

den vorgestellt und sind den jeweiligen Experimenten zugeordnet. Der Versuch der Quantifizierung der Nudicauline in Rohextrakten und Blütenblättern mittels HPLC-DAD-Analyse und Massenbilanz sowie die Quantifizierung der ebenfalls auftretenden Kämpferolderivate war Teil zweier Untersuchungen von Bettina Dudek [125, 126].

Pflanzen und Blütenmaterial

Die Samen des jeweiligen *P. nudicaule* Kultivars wurden stets vom selben Händler bezogen, so dass Unterschiede in der Biochemie aufgrund abweichender Herkunft ausgeschlossen werden können. Des Weiteren erfolgten Probennahmen des Blütenmaterials für alle beschriebenen Experimente ausschließlich an gesunden Pflanzen. Damit wurde sichergestellt, dass die gewonnenen Ergebnisse nicht durch eine verminderte Aktivität der Nudicaulinbiosynthese oder anderer biochemischer Vorgänge (z.B. Duftproduktion) zugunsten von Immunreaktionen beeinflusst wurden. Außerdem erfolgten die Probennahmen für vergleichende Analysen stets zum selben Tageszeitpunkt, so dass Unterschiede aufgrund von tagesperiodischen Änderungen im Metabolitenprofil ausgeschlossen werden können.

Synthesen

Für alle Synthesen wurden die Chemikalien mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad genutzt. Die Überprüfung der ^{13}C -Markierung der eingesetzten *p*-Cumar- und Malonsäure erfolgte mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Zur Feststellung der Reinheit der isolierten Nudicaulindiastereomere (Einsatz als Edukte) und der gewonnenen Reaktionsprodukte kamen sowohl HPLC-DAD-Messungen als auch NMR-Spektroskopie zum Einsatz. Die Qualität der Proben wurde im Fall der analytischen HPLC-DAD-Analyse anhand der auftretenden Signale, ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren im Vergleich zu denen von zuvor isoliertem Nudicaulin I bzw. II beurteilt. Bei den NMR-Messungen der Nudicaulindiastereomere und ihren Derivaten wurde Tetramethylsilan als interner Standard verwendet, wobei die Auswertung durch den Vergleich von Signalen und ihren chemischen Verschiebungen mit Referenzspektren erfolgte. Bei beide Analysenmethoden wurde darauf geachtet, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mindestens 3:1 betrug. Sowohl die Ausbeuten der einzelnen Synthesen als auch die Ergebnisse der analytischen Charakterisierung waren bei Wiederholung reproduzierbar.

Fütterungsexperimente

Die Fütterungslösungen wurden vor der Zugabe des zerkleinerten Blütenmaterials autoklaviert, um Kontamination mit Mikroorganismen auszuschließen, die Einfluss auf die Metaboliten nehmen könnten. Für alle NMR-Messungen der ^{13}C -markierten Nudicauline aus den verschiedenen Fütterungsexperimenten erfolgte jeweils eine weitere Vergleichsmessung von aus Blütenblättern isoliertem Nudicaulin I bzw. II unter den gleichen Messbedingungen (Probenmenge, Lösungsmittel, Volumen, Messparameter etc.) mit Tetramethylsilan als internen Standard. Außerdem wurde zur Maximierung der Spektrenqualität darauf geachtet, für jede Messung den bestmöglichen Shim zu erreichen. Die Dauer der NMR-Messung bzw. die Anzahl der Scans wurde so angepasst, dass ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 5:1 bestand. Die Gegenüberstellung beider NMR-Spektren (FE und Referenz) wurde zur Berechnung der absoluten ^{13}C -Häufigkeit und der ^{13}C - ^{13}C -Anreicherung herangezogen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Fütterungsexperimente zu gewährleisten. Dasselbe galt ebenfalls für die HR-MS-Messungen von ^{13}C -markierten und unmarkierten Nudicaulinen, die ebenfalls mehrfach gemessen wurden.

Einteilung Entwicklungsstadien

Die Probennahme des Blütenmaterials fand zum selben Tageszeitpunkt statt, damit mögliche tagesperiodische Veränderungen im Metabolitenprofil die Ergebnisse nicht beeinflussen konnten. Während der Aufarbeitung wurde eine Blindwertprobe mitgeführt, um etwaige Kontaminationen im Laufe des Trennungsgangs zu beurteilen. Es zeigte sich in der HPLC-DAD-Analyse, dass keine Verunreinigung auftrat. Bevor die eigentlichen HPLC-DAD-Messungen begannen, erfolgte die Bestätigung der Druckstabilität des Geräts durch einen Software gesteuerten Test und die Überprüfung der Richtigkeit der Fließgeschwindigkeit über ein aufgefangenes Volumen pro Zeit. Um möglichen gerätetechnischen Schwankungen entgegenzuwirken, wurden alle Proben bei einer hohen Konzentration (3 mg/ml) in randomisierter Reihenfolge und bei fünf verschiedenen Wellenlängen gemessen. Damit ein Signal in den Chromatogrammen dieser HPLC-DAD-Analyse bei der anschließenden Auswertung berücksichtigt werden konnte, musste ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1 vorliegen. Pro Probe erfolgte die Berechnung des relativen Flächenanteils jeder Substanz durch Normierung

der Gesamtfläche auf 100 %, um den Vergleich zu ermöglichen. Weiterhin wurden die UV-Spektren der einzelnen Peaks gleicher Retentionszeit miteinander verglichen, um Überlagerungen aufzudecken.

GC-MS-Analyse zur Duftzusammensetzung

Da zunächst die Identifizierung und nicht die Quantifizierung der Verbindungen in den Proben der Duftsammlungsexperimente im Vordergrund stand, wurde auf das Mitführen eines internen Standards verzichtet. In jedem Fall wurde dieselbe Messmethode herangezogen und ein Blindwertabgleich durchgeführt, um mögliche Kontaminationen der GC-Säule festzustellen. Mit Hilfe der Kovats-Indizes und der Massenspektren von Referenzsubstanzen gelang die Bestimmung der einzelnen Substanzen. Dabei wurden nur Peaks mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1 berücksichtigt. Für jede Probe erfolgte die Berechnung des relativen Flächenanteils aller Substanzen durch Datennormierung auf 100 %, um die Vergleichbarkeit von verschiedenen Proben zu ermöglichen. Die Daten zum Duftprofil der weiß und gelb blühenden Kultivare wurden auf Normalverteilung, Ausreißerfreiheit und Varianzenhomogenität getestet, um danach mittels t-Test auf signifikante und zufällige Unterschiede untersucht zu werden.

Proteomanalyse

Das Material für die Proteomanalyse stammt aufgrund der erforderlichen Menge aus verschiedenen Probennahmen, so dass keine Aussage über die biologische Variabilität des Proteoms der beprobten Pflanzen getroffen werden kann. Das ständige Kühlen der Proben mit Eis bzw. flüssigem Stickstoff diente dem Unterbinden jeglichen Proteinabbaus. Für die 2D-DIGE-Experimente wurde ein interner Standard aus allen Proteinen der ES hergestellt und in jedem der fünfzehn Gele mitgeführt, um die Vergleichbarkeit zwischen den Gelen zu gewährleisten. Weiterhin erfolgte die Verteilung der Proben aller fünf ES randomisiert auf die fünf Gele, wobei jede ES-Probe auf je zwei Gele aufgetragen und dabei einmal mit Farbstoff 1 und einmal mit Farbstoff 2 versehen wurde. Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit erfolgte die technische Replikation für jedes Gel dreimal.

Transkriptomanalyse

Um zu verifizieren, dass die jeweilige Blütenprobe dem per Auge zugeteilten ES entsprach, wurde ein Teil des Materials extrahiert und zur Überprüfung einer HPLC-DAD-Analyse unterworfen. Der Vergleich der Chromatogramme mit denen von Proben, bei denen das ES bereits definiert war, ermöglichte in jedem Fall die Bestätigung des zuvor zugeordneten Stadiums. Das sofortige Einfrieren der Proben mittels flüssigen Stickstoff verhinderte den Abbau der zu analysierenden RNA durch Enzyme und minimierte so Verluste während der Lagerung. Während der Probenvorbereitung wurden unterschiedliche Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, mögliche Kontaminationen zu vermeiden (steriler Arbeitsplatz, Chemikalien mit zertifizierter Reinheit, spezielle Handschuhe usw.). Den Messungen der RNA-Konzentration am Spektralphotometer gingen Blindwertmessungen (RNA-freies Wasser) voraus. Die Bestimmung der RNA-Qualität erfolgte durch das Mitführen eines internen Standards, auf den alle Messwerte der RNA-Proben bezogen wurden.

4 Auswertung der Ergebnisse

4.1 Strukturaufklärung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse diskutiert, die zur Revision der Nudicaulinstruktur führten [15]. Sie resultieren aus der Auswertung der NMR-Daten von Nudicaulin I und II sowie zuvor synthetisierten Derivaten. Die Bestimmung der relativen Konfiguration beider Diastereomere erfolgte aus den Befunden von NOE-NMR-Experimenten. Mit Hilfe der Auswertung von experimentellen und quantenchemisch berechneten UV- und CD-Spektren gelang die Aufklärung der absoluten Konfiguration. Dies wurde von Kooperationspartnern (Prof. Bringmann, A. Schaumlöffel, Universität Würzburg) durchgeführt.

Die 2006 veröffentlichte Studie zeigte, dass die gelben *P. nudicaule* Blüten acht Nudicauline als farbgebende Substanzen enthalten [13]. Durch basische Hydrolyse erfolgte die Entfernung aller Malonsäurereste an den Zuckereinheiten, so dass zwei Diastereomere mit je einer Glucose und einem Sophorosesubstituenten gewonnen wurden. Auf Grundlage von MS- und NMR-Daten folgte die Erarbeitung eines ersten Strukturvorschlags für Nudicaulin I und II, der erstmals auch die außergewöhnliche Molekülkombination aus Indolalkaloid und polyphenolartiger Teilstruktur berücksichtigte, siehe Abbildung 4.1 links. Dadurch wurde das wissenschaftliche Interesse auf die Biosynthese der Nudicauline gelenkt.

Dennoch zeigten die vorgeschlagenen Strukturen einige Nachteile. Beispielsweise würde der stickstoffhaltige Sechsring **e** das gesamte Aglykon unter hohe Spannung setzen. Des Weiteren passten die Absorptionseigenschaften der einzelnen konjugierten Systeme nicht mit dem Maximum bei 460 nm zusammen. Diese Befunde stellten die Richtigkeit der publizierten Vorschläge infrage, so dass im Rahmen dieser Arbeit zunächst das Strukturproblem detailliert untersucht wurde.

Die Abbildung 4.1 stellt den Vorschlag von 2006 und die Nudicaulinstrukturen gegenüber, die ein Ergebnis dieser Arbeit sind. Bei dem revidierten Aglykon handelt es sich um 12-(4-Hydroxyphenyl)-3,11-dihydrobenzoe-furo[2',3':1]-cyclopenta[1,2-*b*]indol-5,7,11-triol. Die Eigenschaften des konjugierten Systems der neuen Strukturen stimmen

mit den experimentellen UV-Spektren überein. Weiterhin stehen die Aglykone nicht unter Spannung.

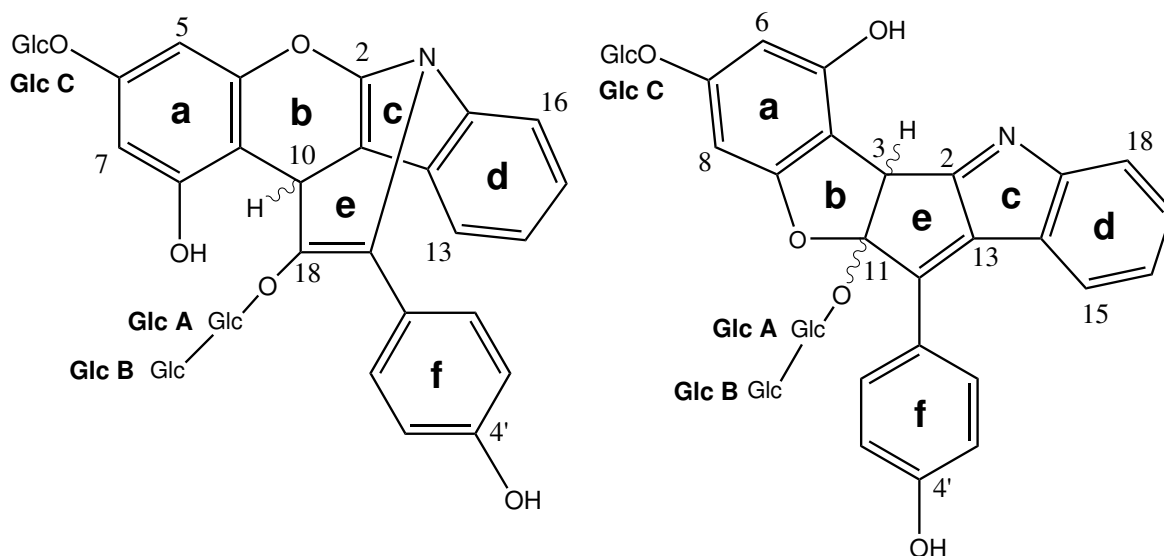


Abbildung 4.1: Strukturvorschlag 2006 (links) nach [13] und revidierte Struktur der Nudicauline (rechts) nach [15]

Um die Struktur der Nudicauline zu bestätigen, wurden Derivate durch Hydrierung, Methylierung und enzymatische Hydrolyse synthetisiert. Die entsprechenden Synthesevorschriften und die Details zu den genutzten Analysemethoden sowie die geräte-technischen Informationen sind im Kapitel 3 aufgeführt. Alle im Folgenden genannten NMR-Spektren bzw. ihre Ausschnitte können in der freizugänglichen „supporting information“ zu [15] eingesehen werden.

4.1.1 HSQC- und HMBC-Korrelationen im Nudicaulin I

Das Singulett des Protons H-3 (δ 5,63) und die folgenden Spinsysteme konnten mit Hilfe von HSQC- und HMBC-Korrelationen dem Aglykon zugeordnet werden:

- AX-System: H-6 und H-8 im Ring **a**
- Vierspinsystem: H-15 bis H-18 im Ring **d**
- AA'XX'-System: H-2'/6' und H-3'/5' im Ring **f**

Für H-3 traten HMBC-Korrelationen mit insgesamt neun Kohlenstoffatomen auf. Sie sind schematisch in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

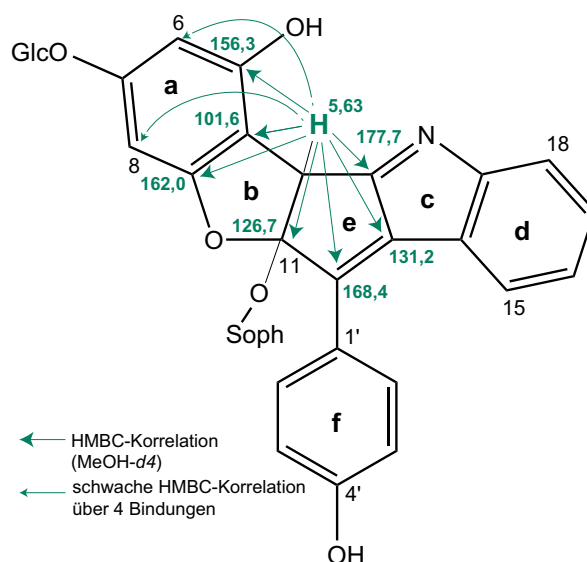


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der HMBC-Korrelationen von H-3 im Spektrum von Nudicaulin I (aufgenommen in MeOH- d_4)

Aus den Korrelationen mit C-4 (δ 101,6), C-5 (δ 156,3) und C-9 (δ 162,0) folgte, dass zwischen C-3 und C-4 an Ring **a** eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung besteht. Die Wechselwirkungen von H-3 mit C-2 (δ 177,7) und C-13 (δ 131,2) zeigten die Verbindung zum stickstoffhaltigen Ring **c**. Die direkte Nachbarschaft von C-2 zum Stickstoffatom ergab sich aus der Signalverschiebung zum tiefen Feld. Zusammen mit den zusätzlichen Korrelationen von H-3 mit C-12 (δ 168,4) und dem Acetalkohlenstoff C-11 (δ 126,7) bilden C-3, C-2, C-13, C-12 und C-11 den Ring **e**. Ring **a** und Ring **e** werden miteinander durch den Ring **b** aus C-3, C-4, C-11 und C-9 mit einem Sauerstoffatom zwischen den letztgenannten Kohlenstoffatomen verbunden. Aus der HMBC-Korrelation von H-2'/6' (δ 139,2) mit C-12 konnte geschlossen werden, dass sich an C-12 der 4'-Hydroxyphenylring **f** anschließt. Das H-1'' an Glucose **A** zeigte HMBC-Korrelationen mit C-11, wonach Glucose **A** über Sauerstoff an dieses Kohlenstoffatom gebunden ist. Weiterhin folgte aus dem Kreuzsignal H-1''' (δ 107,8) von Glucose **B** mit C-2'' (δ 85,4) der Glucose **A** die Bindung beider Zucker zu einer Sophoroseeinheit. Die Glucose **C** ist an C-7 im Ring **a** gebunden, da eine HMBC-Korrelation zwischen H-1'''' (δ 103,7) und C-7 (δ 162,5) auftritt. Die Position des Stickstoffatoms (δ 172,7) im Ring **c** konnte durch seine Korrelation mit H-3 und H-18 (δ 7,72) im $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum nachgewiesen werden. Zusätzlich traten ausgeprägte Signale im ROESY-Spektrum zwischen H-15 (δ 8,33) und H-2'/6' (δ 8,63) auf, so dass eine [2',3':1]-Anellierung der Indoleinheit zum Cyclopentenring **e** des Nudicaulinaglykons geschlossen werden konnte.

4.1.2 Hydrierung

Aus den Hydrierungsreaktionen mit Nudicaulin I bzw. II wurde je ein Derivat erhalten, das ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von m/z 874,27482 (berechnet m/z 874,27642) aufwies. Daher wurde auf zwei zusätzliche Protonen im Aglykon geschlossen. Des Weiteren fehlte im UV-Spektrum das Maximum bei 460 nm. Daraus folgte, dass das konjugierte System durch die Hydrierung unterbrochen worden war. Tatsächlich trat im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Dihydronudicaulin I ein neues Singulett bei δ 4,99 auf, während andere Signale im Vergleich zum Nudicaulin I eine Verschiebung zum höheren Feld zeigten. Das zusätzliche Proton wies ein HSQC-Signal mit C-12 (jetzt: δ 55,0) und HMBC-Korrelationen mit C-2 (jetzt: δ 140,5), C-13 (jetzt: δ 116,5), C-11 (jetzt: δ 126,8), C-1' (jetzt: δ 130,4) und C-2'/6' (jetzt: δ 132,4) auf. Die beschriebenen HMBC-Korrelationen sind in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

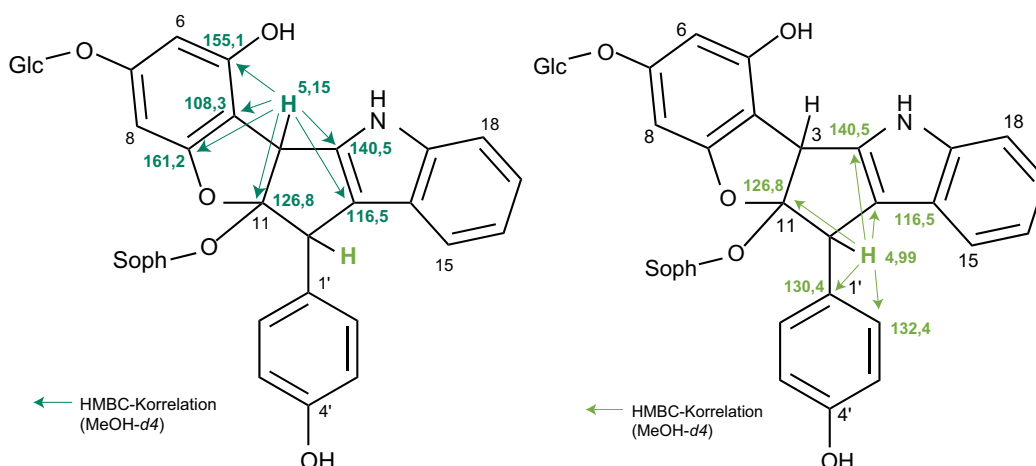


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Korrelationen von H-3 (links) in Anlehnung an [15] und H-12 (rechts) im HMBC-Spektrum von Dihydronudicaulin I (aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$)

Aus diesen Ergebnissen resultierte, dass C-12 durch die Reaktion protoniert worden war. Dies konnte weiterhin in einem speziellen COSY-Experiment bestätigt werden, das auf Kopplung über längere Distanzen ($^1\text{H-}^1\text{H-Long-Range-COSY}$) beruht. Hier traten Korrelationen zwischen H-12 (δ 4,99) und H-3 (δ 5,07) bzw. H-2'/6' (δ 7,10) auf.

Mit Hilfe der ROESY-Spektren beider Dihydronudicauline konnte gezeigt werden, dass zwischen H-1'' (δ 4,70) der Glucose **A** sowie H-2'/6' im Ring **f** Korrelationen mit H-3 und H-12 auftreten. Jedoch wurde keine Korrelation zwischen H-3 und H-12 beobachtet,

was auf eine entgegengesetzte Orientierung der beiden Protonen schließen lässt. Damit war der Verlauf der Hydrierung stark stereoselektiv.

4.1.3 Methylierung

Durch diese Synthese wurden drei Methylgruppen in das Nudicaulinaglykon eingeführt. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Methylierungsproduktes traten dadurch drei neue Singulettts bei δ 4,35, δ 4,05 und δ 4,01 auf. Die chemischen Verschiebungen im HSQC-Spektrum der Methylkohlenstoffatome bei δ 56,1 und δ 56,6 sowie der beiden Protonensignale bei δ 4,01 und δ 4,05 sind charakteristisch für *O*-Methylgruppen. Die einzige HMBC-Korrelation der Methylgruppe δ 4,01 mit C-5 (δ 157,9) zeigte, dass sie an das Sauerstoffatom *O*-5 gebunden sein musste. Für die andere Methylgruppe (δ 4,05) wurde ebenfalls nur eine HMBC-Korrelation beobachtet (C-4', δ 168,2). Sie befindet sich demnach an *O*-4'. Die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms der dritten Methylgruppe bei hohem Feld (δ 35,7), wies auf eine direkte Bindungen zum Stickstoffatom hin. Diese Vermutung wurde durch die HMBC-Korrelationen mit C-2 (δ 177,6) und C-19 (δ 149,6) bestätigt. Damit konnten sowohl die Positionen der freien OH-Substituenten und die Position des Stickstoffatoms verifiziert werden, wie in Abbildung 4.4 dargestellt.

4.1.4 Enzymatische Hydrolyse

Je nach Reaktionszeit bzw. Enzymanteil konnten aus den triglucosidischen Nudicaulinen entweder die Diglucoside (Verlust von Glucose **B** oder **C**) bzw. Monoglucoside (Verlust von Glucose **B** und **C**) des jeweiligen Nudicaulindiastereomers gewonnen werden. Das freie Aglykon wurde nie erhalten, da an C-11 eine Acetalstruktur vorliegt, so dass das Abspalten von Glucose **A** zur Ringöffnung und so zum Zerfall des Moleküls führt. Abgesehen davon, dass sich in den NMR-Spektren der Hydrolysate die Komplexität der Signale in der Zuckerregion vereinfachte, traten keine gravierenden Änderungen auf. Daraus folgte, dass die Aglykonstruktur erhalten blieb. Die Monoglucoside wurden zur Aufklärung der absoluten Aglykonkonfiguration herangezogen, da für die natürlich

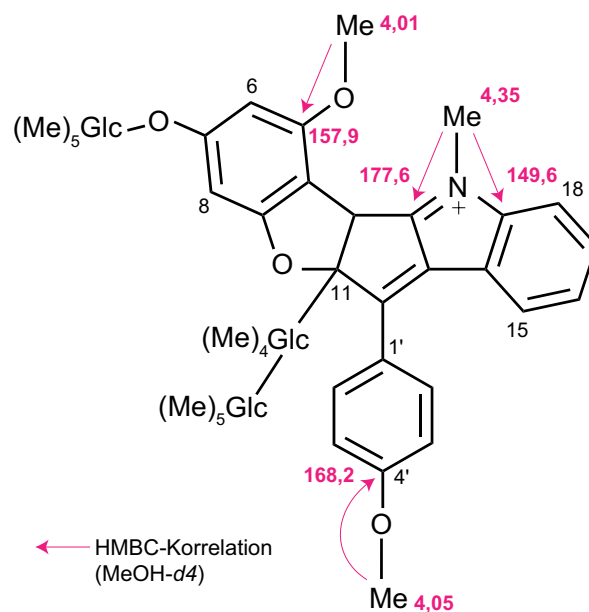


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der HMBC-Korrelationen der eingeführten Methylprotonen im Spektrum vom methylierten Nudicaulin I (aufgenommen in MeOH-*d*₄) nach [15]

vorkommenden Nudicauline aufgrund ihrer Glucosesubstituten in den experimentellen CD-Spektren starke Lösungsmittelleffekte auftraten und so der Vergleich mit den berechneten Spektren unmöglich wurde.

4.1.5 Relative und absolute Konfiguration

Bei Nudicaulin I handelt es sich um das (3*S*, 11*R*)- und bei Nudicaulin II um das (3*R*, 11*S*)-Diastereomer. Dieses Ergebnis resultierte aus den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

NMR-Daten

Nudicaulin I und II unterscheiden sich durch die Stellung der Substituenten an den Stereozentren in Position C-3 und C-11. Um ihre Aglykonstrukturen zu unterscheiden, war zunächst die Bestimmung der relativen Konfiguration angezeigt. Im ROESY-Spektrum von Nudicaulin I trat ein ausgeprägtes Signal zwischen H-3 und dem Proton am anomeren Zentrum von Glucose **A** auf. Daraus ergab sich, dass die beiden Protonen auf derselben Seite des Aglykons stehen, also *cis*-Orientierung aufweisen. Ein ähnliches,

wenn auch schwächeres Signal zeigte sich im ROESY-Spektrum vom Nudicaulin II, so dass auch hier ein *cis*-Isomer vermutet wurde. Ausgewählte Korrelationen in den ROESY-Spektren von Nudicaulin I und II sind in Abbildung 4.5 schematisch dargestellt.

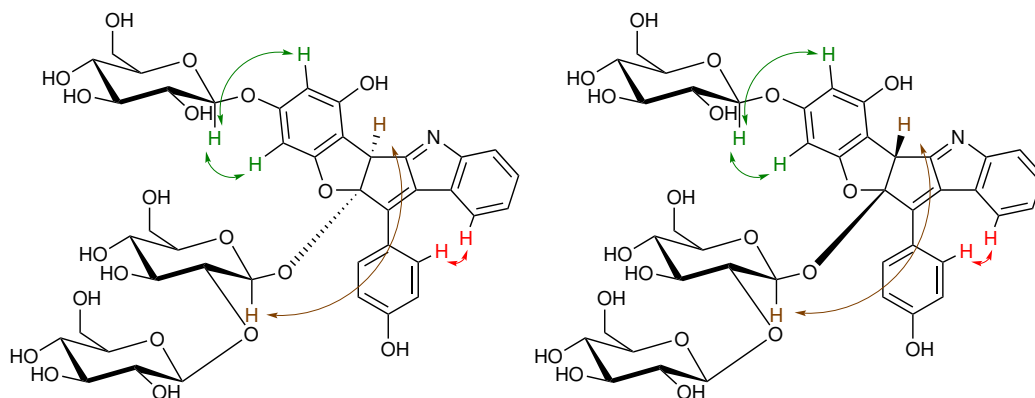


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der ROESY-Korrelationen im Spektrum von Nudicaulin I (links) und II (rechts) (aufgenommen in MeOH- d_4) nach [15]

Quantenmechanische Berechnungen

Kooperationsarbeit von Prof. Bringmann, A.Schaumlöffel, Universität Würzburg

Für die Berechnung der Distanz zwischen δ (H-3, H-1'') in den energetisch niedrigsten Konformeren der Aglykone ergab sich für das (3*S*, 11*S*)-Diastereomer 2,4 Å und für das (3*R*, 11*R*)-Diastereomer 3,8 Å. Diese Werte stimmten mit den starken bzw. schwächeren ROESY-Signalen in Nudicaulin I bzw. II überein. Damit stand fest, dass es sich in beiden Fällen um *cis*-Isomere handelte. Für das ebenfalls mögliche *trans*-Isomer (3*R*, 11*S*) ergab sich eine δ (H-3, H-1'')-Distanz von 4,5 Å, wofür jedoch kein ROESY-Signal zu erwarten war. Ausführliche quantenchemische Berechnungen von CD-Spektren für die beiden Aglykone und der Vergleich mit den experimentellen Spektren der Monoglucoside führten zu sehr guten Übereinstimmungen, wie in Abbildung 4.6 dargestellt ist. Daraus folgte die Aufklärung der absoluten Konfiguration von Nudicaulin I und II, die in Abbildung 4.7 angegeben sind. Es ist zu beachten, dass durch die Sophorosesubstitution an C-11 gegenüber dem Nudicaulinaglykon eine formale Änderung der Prioritäten nach der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention auftritt, woraus für die

Glucoside im Fall von Nudicaulin I die $(3S, 11R)$ -Konfiguration und im Fall von Nudicaulin II die $(3R, 11S)$ -Konfiguration resultieren. Alle methodischen Details können [15] entnommen werden.

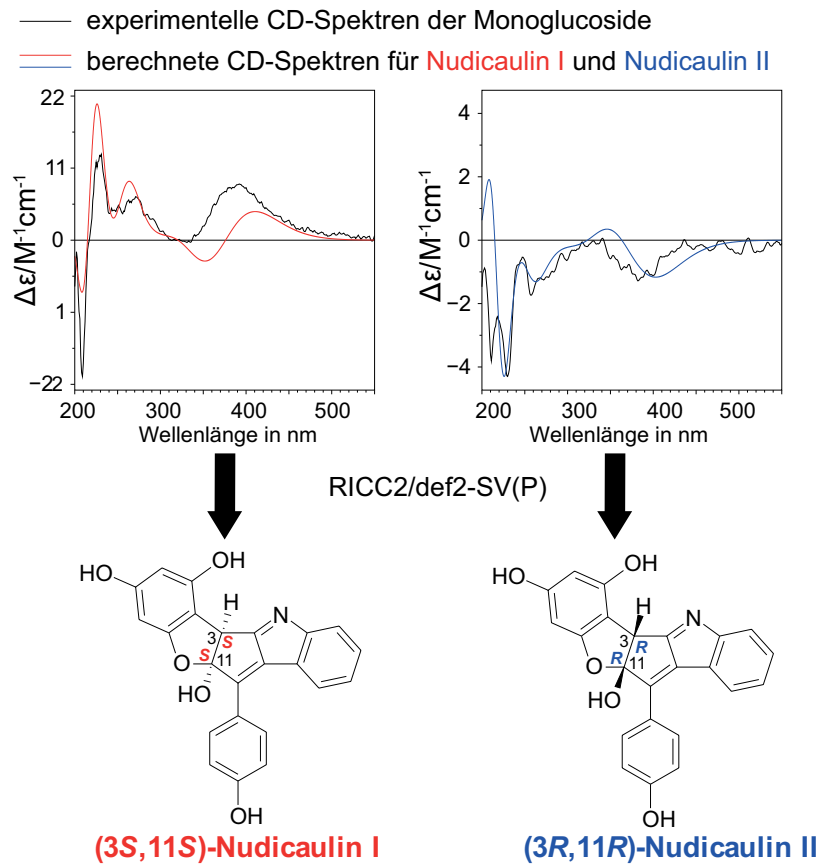


Abbildung 4.6: Experimentell ermittelte CD-Spektren der Monoglucoside von Nudicaulin I und II im Vergleich zu den berechneten CD-Spektren der Aglykone von Nudicaulin I und II sowie die Zuordnungen der absoluten Konfiguration in den Aglykonen nach [15]

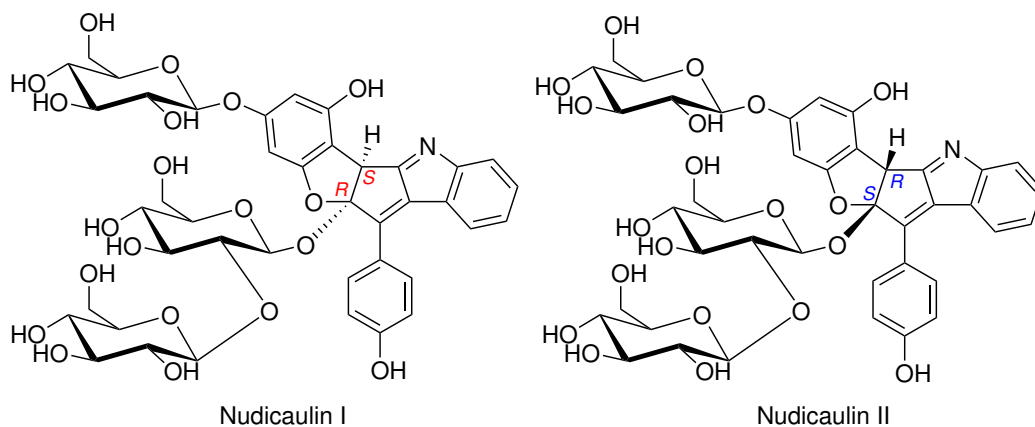


Abbildung 4.7: Absolute Konfiguration von Nudicaulin I und II nach [15]

4.1.6 Fazit zur Strukturaufklärung

Erklärung zum Eigenanteil: Die Synthese und Isolation der Nudicaulinderivate wurden eigenständig durchgeführt. Während die Messung, Auswertung, Interpretation und graphische Aufarbeitung ihrer NMR-Spektren unter der Supervision von Dr. Evangelos C. Tatsis und Dr. Bernd Schneider erfolgten. Die Materialien zur experimentellen Bestimmung der CD-Spektren wurden unseren Kooperationspartnern Prof. Gerhard Bringmann und Dr. Anu Schaumlöffel zur Verfügung gestellt, die die quantenchemischen Berechnungen und die entsprechenden CD-Experimente sowie ihre Interpretation vornahmen.

Aus den gewonnenen Ergebnissen der Strukturaufklärung und der Untersuchung der absoluten Konfiguration folgte die Revision des Strukturvorschlags von 2006 und zusätzlich die Bestimmung der relativen und absoluten Konfiguration der Nudicauline [15]. Dabei blieb der Befund erhalten, dass die Zusammensetzung des Aglykons aus einer Indoleinheit und einem polyphenolähnlichen Teil besteht. Da diese Molekülkombination einzigartig in der Literatur ist, bezog sich eine weitere, im Folgenden bearbeitete Fragestellung dieser Arbeit auf den Verlauf und die beteiligten Vorstufen und Enzyme der Nudicaulinbiosynthese. Dazu wurden zunächst Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Metaboliten des Indol- und des Polyphenolweges durchgeführt, um die Hypothese aus der vorangegangenen $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] zu prüfen und nach Möglichkeit die tatsächlichen direkten Vorstufen der Nudicaulinbiosynthese zu bestimmen. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und diskutiert.

4.2 Auswertung der Fütterungsexperimente

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der ^{13}C -Fütterungsexperimente vorgestellt und diskutiert. Ihre Durchführung erfolgte nach dem bereits in Abschnitt 3.3.1 vorgestellten Protokoll. Zunächst wurde [$^{13}\text{C}_6$]Glucose als universale Vorstufe eingesetzt, um zu überprüfen, inwiefern sich das resultierende Isotopologenprofil von dem aus der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] unterscheidet. Da sich das Nudicaulinaglykon aus einer Indol- und einer flavonoidähnlichen Einheit zusammensetzt, wurden potenzielle Intermediate der beiden Biosyntheserouten auf ihre Rolle in der Nudicaulinbildung hin untersucht. Die

ausgewählten Vorstufen des Flavonoidbiosyntheseweges waren [$^{13}\text{C}_9$]-, [ring- $^{13}\text{C}_6$]-, [1- ^{13}C]-, [2- ^{13}C]- und [3- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]Tyrosin, [2- ^{13}C]-*p*-Cumarsäure, [1- ^{13}C]-, [$^{13}\text{C}_2$]Essigsäure sowie [2- ^{13}C]Malonsäure. Aus der Indolbiosynthese wurden [ring- $^{13}\text{C}_6$]- sowie [^{15}N]Anthranilsäure, [2- ^{13}C]Indol, [$^{13}\text{C}_{11}$]Tryptophan und [$^{13}\text{C}_{10}$]Tryptamin getestet. Abgesehen von [2- ^{13}C]-*p*-Cumarsäure und [$^{13}\text{C}_{10}$]Tryptamin konnten alle genannten, isotopenmarkierten Substanzen aus dem Handel bezogen werden, siehe dazu Anhang C. Für die beiden übrigen Verbindungen erfolgte jeweils eine Synthese. Die Vorschriften sind in Abschnitt 3.2.4 bzw. 3.2.5 beschrieben.

4.2.1 Universal markierte Glucose

Zunächst wurde [$^{13}\text{C}_6$]Glucose als universale Vorstufe eingesetzt. Wie bereits in Abschnitt 2.4 dargelegt, wird Glucose für die verschiedenen Biosyntheserouten des primären Kohlenstoffwechsels in Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat gespalten. Die beiden Primärmetaboliten besitzen charakteristische Markierungsmuster und werden im Verlauf des Stoffwechsels zur Bildung von Sekundärmetaboliten verwendet.

Bei den Experimenten mit [$^{13}\text{C}_6$]-markierter Glucose wurden Isotopologenprofile der Nudicauline erhalten, die in Übereinstimmung mit dem der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] sind. In Abbildung 4.8 sind die beiden Profile für Nudicaulin I einander gegenüber gestellt. Abgesehen von C-3 und C-11 wurde für jedes Kohlenstoffatom im Nudicaulinaglykon mindestens ein Satellitenpaar detektiert. Anhand ihrer Kopplungskonstanten konnten die jeweiligen ^{13}C -markierten Nachbarn identifiziert und der revidierte Aglykonaufbau nochmals bestätigt werden. Im Fall der Kohlenstoffatome C-4 bis C-11 traten je zwei Satellitenpaare auf. Dieser Befund kommt dadurch zustande, dass im Verlauf des Polyketidbiosynthesewegs zwei Möglichkeiten zur Ringschließung existieren. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4.8 durch die zwei verschiedenen Orangetöne gekennzeichnet. Für die Kohlenstoffatome C-15 bis C-17 bzw. C-16 bis C-18 sowie C2' bis C4' bzw. C3' bis C5' wurden ebenfalls je zwei Satellitenpaare beobachtet. Sie zeigen, dass ein Kohlenstoffgerüst aus vier zusammenhängen ^{13}C -markierten Atomen in das Nudicaulinaglykon eingebaut wurde. Diese vier Atome stammen aus Erythrose-4-phosphat, was wiederum die vorausgegangene Hypothese unterstützt. Alle detektierten

Kopplungskonstanten der Satelliten jedes ^{13}C -markierten Kohlenstoffatoms im Nudicaulinaglykon aus dem Fütterungsexperiment mit $[^{13}\text{C}_6]$ -markierter Glucose sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

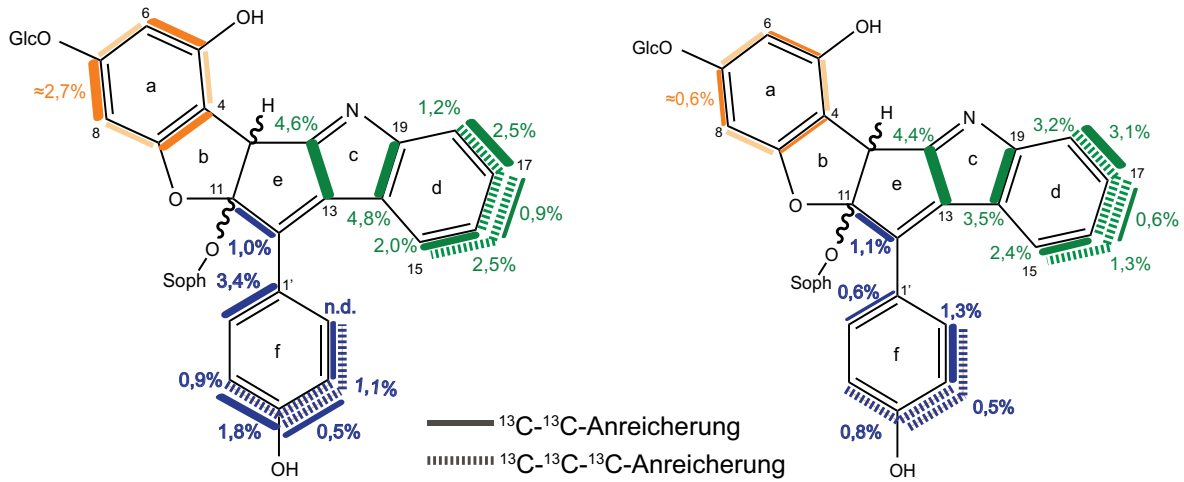


Abbildung 4.8: Isotopologenprofile und berechnete prozentuale ^{13}C -Anreicherungen für Nudicaulin I der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie (links, vereinfacht nach [14]) und aus dem FE mit $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glucose (rechts) (gleichfarbige Balken symbolisieren denselben biosynthetischen Ursprung)

Aus den Ergebnissen dieses Fütterungsexperiments folgt, dass die gewählte Versuchsdurchführung zur Untersuchung der Nudicaulinbiosynthese geeignet ist. Außerdem resultierte daraus, dass es sich um eine *de novo* Biosynthese handelt, die *in situ* in den Blütenblättern stattfindet. Demnach sind alle an der Nudicaulinbildung beteiligten Vorstufen, Intermediate und aktiven Enzyme in den Kronblättern vorhanden.

Tabelle 4.1: Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit $[^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$

# C	δ	J_{cc} (Hz) [koppelnde C-Atome]
C2	177,5	48 [13]
C3	49,9	41 [11]
C4	101,8	77 [5]; 63 [9]
C5	156,4	77 [4]; 66 [6]
C6	99,3	66 [5]; 71 [7]
C7	162,6	71 [6]; 71 [8]
C8	92,4	71 [7]; 71 [9]
C9	161,1	63 [4]; 71 [8]
C11	126,9	41 [3]; 53 [12]
C12	168,5	53 [11]
C13	131,2	48 [2]
C14	122,7	59 [19]
C15	125,6	58 [16]
C16	128,5	58 [15]; 56 [17]
C17	131,4	56 [16]; 56 [18]
C18	117,2	56 [17]
C19	148,4	59 [14]
C1'	123,0	59 [2']
C2'/C6'	139,3	59 [1']; 59 [5']
C3'/C5'	118,3	61 [4']; 59 [6']
C4'	168,3	61 [3'/5']; 9 [6']

4.2.2 Universal markiertes Phenylalanin

Die Fütterungsexperimente mit universal ^{13}C -markiertem Phenylalanin zeigen, dass alle Kohlenstoffatome der Vorstufe zusammenhängend in die Positionen C-3, C-11, C-12 sowie den Ring **f** (C-1' bis C-6') des Nudicaulinaglykons eingebaut werden. Dies geht sowohl aus dem Massen- als auch aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum hervor. Ein Ausschnitt des letzteren sowie ein Säulendiagramm aus dem Vergleich des erhaltenen Isotopenprofils mit dem des unmarkierten Nudicaulins I sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

Das Massenspektrum von Nudicaulin I aus dem FE enthält zusätzlich zum unmarkierten Isotopenprofil den Peak bei m/z 881,29, der dem Molekülpeak plus neun ^{13}C -

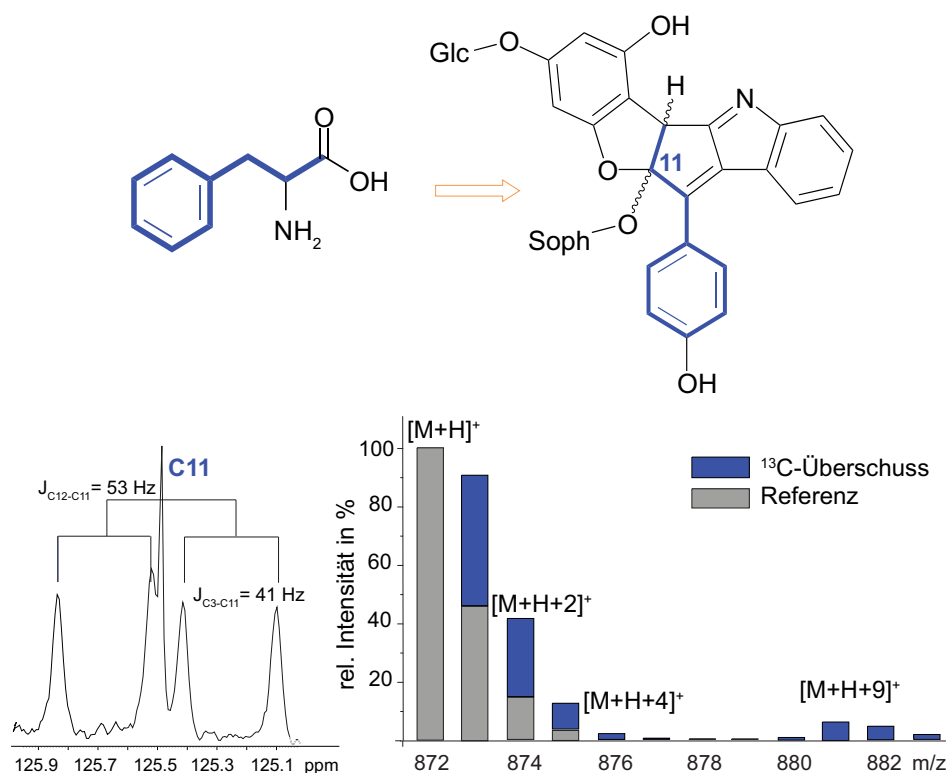


Abbildung 4.9: FE mit universal ^{13}C -markiertem Phenylalanin: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-11) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (blau)

Atomen entspricht. Diese stammen aus dem universal markierten Phenylalanin. Des Weiteren sind auch die relativen Intensitäten der übrigen Isotopenpeaks höher als im natürlich vorkommenden Nudicaulin. Daraus ist zu schlussfolgern, dass das Phenylalanin auch von anderen Enzymen verstoffwechselt werden kann, so dass durch Abbau (Katabolismus) kleinere ^{13}C -Einheiten zum Einbau in das Zielglykon entstanden. Dass dennoch größtenteils das komplette Phenylalaningerüst eingebaut wurde, lässt sich aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum ablesen. Die Signale der Kohlenstoffatome C-11, C-12 sowie des gesamten Rings **f** (C-1' bis C-6') weisen jeweils zwei Satellitensignalaare auf, die die direkte Nachbarschaft von zwei ^{13}C -Atomen anzeigen. Die auftretenden Kopplungskonstanten der Satelliten sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Daraus resultierte, dass Phenylalanin eine Vorstufe ist, die über vermutliche Zwischenstufen wie Zimtsäure bzw. Tyrosin und *p*-Cumarsäure in die Nudicauline eingebaut wird. Für diese Vermutung spricht, dass sich an Position C-4' des Nudicaulinaglykons eine Hydroxylgruppe befindet. Tyrosin wird aus Phenylalanin mittels Hydro-

Tabelle 4.2: Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit $[^{13}\text{C}_9]$ Phenylalanin

# C	δ	J_{cc} (Hz) [koppelnde C-Atome]
C-3	49,9	41 [11]; 3 [12]
C-11	126,9	41 [3]; 53 [12]
C-12	168,5	53 [11]; 54 [1']
C-1'	123,0	59 [2'/6']; 54 [12]
C-2'/6'	139,3	59 [1']; 59 [3'/5']
C-3'/5'	118,3	59 [2'/6']; 61 [4']
C-4'	168,3	61 [3'/5']; 9 [2'/6']

xylierung an Ringposition 4 durch das Enzym Phenylalanin-4-monooxygenase (bzw. Phenylalanin-4-hydroxylase, PAH, EC 1.1416.1) gewonnen. Im weiteren Verlauf der Biosynthese kann Tyrosin durch Phenylalanin/Tyrosin-Ammoniak-Lyase (Bifunktional PAL, PTAL, EC 4.3.1.25) zur *p*-Cumarsäure desaminiert werden.

Die Ergebnisse aus den übrigen Experimenten mit unterschiedlich ^{13}C -markiertem Phenylalanin bestätigten den oben vorgestellten Befund, so dass an dieser Stelle auf die Darstellung verzichtet wird.

4.2.3 [2- ^{13}C]Tyrosin und [2- ^{13}C]-*p*-Cumarsäure

Für das Fütterungsexperiment mit [2- ^{13}C]Tyrosin konnte im Massenspektrum der ^{13}C -Einbau in die Nudicaulinmoleküle nachgewiesen werden. In Abbildung 4.10 ist ein Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im markierten Nudicaulin I (blau) dargestellt.

Wie zuvor beschrieben, erfolgt die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin, so dass das Ergebnis die Vermutung bestärkt, dass die Hydroxylgruppe an C-4' von Tyrosin stammt. Wiederholte Fütterungsexperimente mit [2- ^{13}C]-*p*-Cumarsäure blieben jedoch ohne positives Ergebnis. Gründe für diesen Befund könnten sein, dass das beteiligte Enzym das Substrat direkt an die folgende 4-Cumarat-CoA-ligase (EC 6.2.1.12) weitergibt, ohne Cumarsäure freizusetzen. Somit würde Channeling für dieses Substrat auftreten, wie es bereits in der Literatur für Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs be-

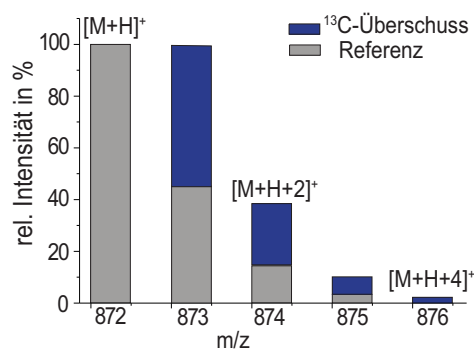


Abbildung 4.10: FE mit [2-¹³C]Tyrosin: Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ¹³C-Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (blau)

schrieben wurde [86–88]. Andererseits könnte durch konkurrierende Biosynthesen eine Verteilung der Markierung im gesamten System auftreten. Auszuschließen ist außerdem nicht, dass die gewählten Bedingungen des Fütterungsexperiments nicht jenen entsprechen, die die beteiligten Enzyme benötigen.

4.2.4 [¹³C₂]Acetat

Bei der Verwendung von [¹³C₂]Acetat als Vorstufe wurden Nudicaulinisotopologe erhalten, deren ¹³C-NMR-Spektren Signale von paarweise koppelnden ¹³C-Atomen in Ring **a** aufweisen. Die auftretenden Kopplungskonstanten der Satelliten sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Kopplungskonstanten für die Satelliten der ¹³C-markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit [¹³C₂]Acetat

# C	δ	J_{cc} (Hz) [koppelnde C-Atome]
C-4	101,8	77 [5]; 63 [9]
C-5	156,4	77 [4]; 66 [6]; 5 [9]
C-6	99,3	66 [5]; 71 [7]
C-7	162,6	71 [6]; 71 [8]
C-8	92,4	71 [7]; 71 [9]
C-9	161,1	71 [8]; 63 [4]; 5 [5]

Diese ¹³C-Kopplungen entstehen aufgrund von „Bond-labelling“, dem Einbau der ¹³C₂-Einheiten aus Acetat. Dieses Ergebnis steht in direkter Übereinstimmung mit der

Ringbildung über den Polyketidbiosyntheseweg. Somit bestätigt sich dieser Teil der Ausgangshypothese, dass Ring **a** über den Polyketidbiosyntheseweg gebildet wird. Das Acetat ist wahrscheinlich auch der Ursprung der Sauerstoffatome an den Kohlenstoffen C-5, C-7 und C-9. Je nachdem, wie der Ring geschlossen wird, tritt das „Bond-labelling“ entweder paarweise für C-4/5, C-6/7, C-8/9 bzw. C-4/9, C-5/6, C-7/8 auf. Beide Fälle sind gleich wahrscheinlich, wobei zur Vereinfachung in Abbildung 4.11 nur ein Fall zusammen mit dem Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im markierten Nudicaulin I (orange) dargestellt ist. Es ist davon auszugehen, dass aus der verwendeten Vorstufe zunächst Acetyl-CoA durch Acetate-CoA-ligase (EC 6.2.1.1) gebildet wird. Im Anschluss sollte daraus die Synthese von Malonyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2) erfolgen. Fütterungsexperimente mit $[2-^{13}\text{C}]$ Malonsäure resultierten nicht in ^{13}C -Einbau, dafür könnten beispielsweise die Bedingungen des Experiments verantwortlich sein.

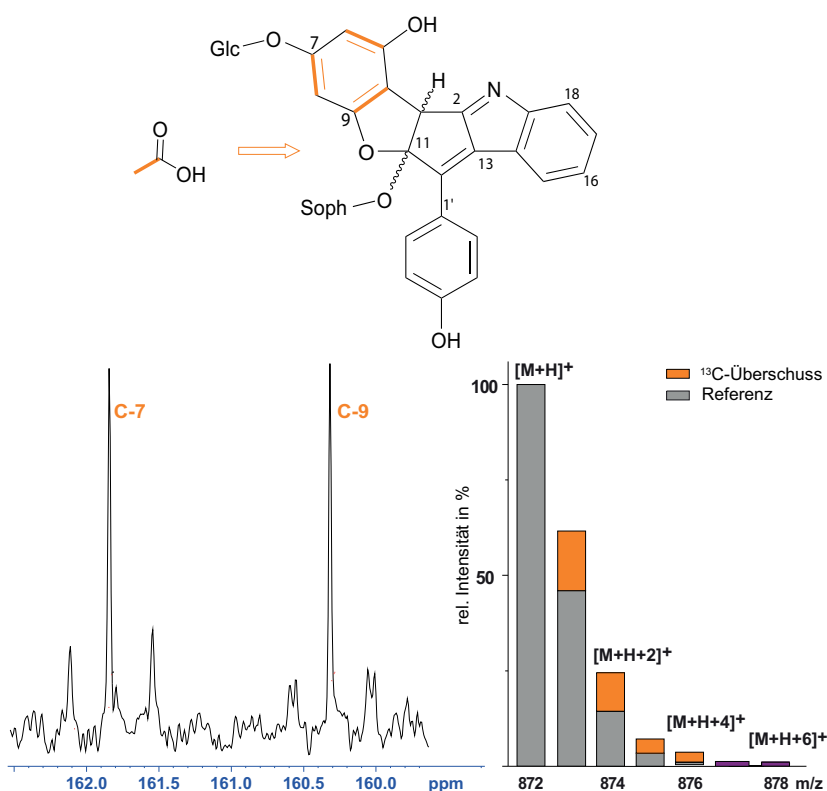


Abbildung 4.11: FE mit universal markiertem Acetat: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-7 & C-9) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (orange)

4.2.5 [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure

Aus der Gruppe der Indolbiosyntheseintermediate wurde zunächst [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure als Vorstufe der Nudicauline getestet. Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass der Ring **d** vollständig von dieser Vorstufe stammt. Sowohl das ^{13}C -NMR-Spektrum als auch das Massenspektrum spiegeln den Einbau von sechs zusammenhängenden ^{13}C -Atomen wider, wie in Abbildung 4.12 dargestellt.

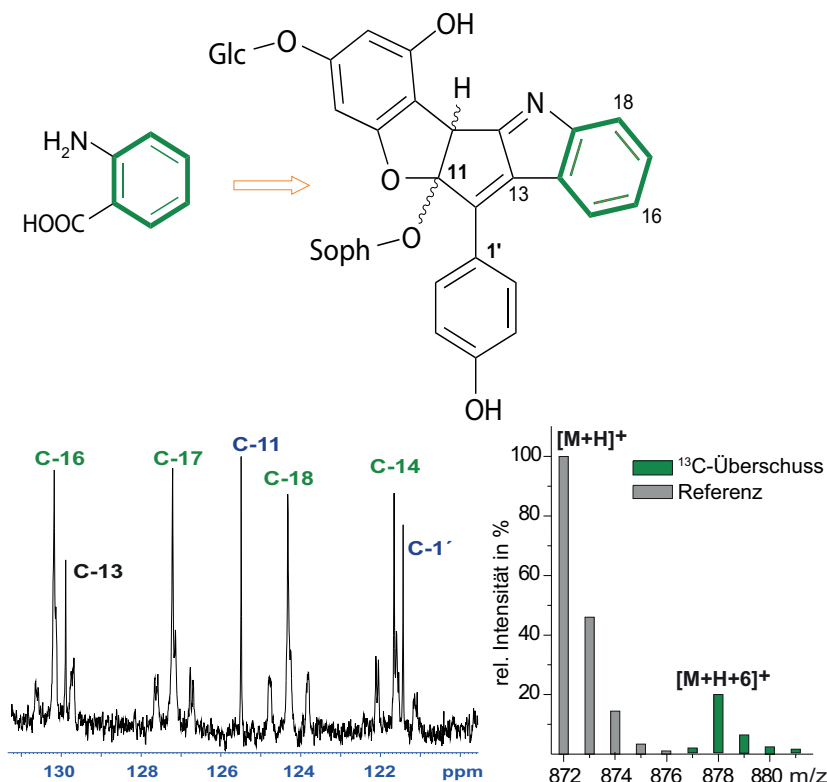


Abbildung 4.12: FE mit [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-14, C-16 bis C-18) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (grün)

Im Massenspektrum findet sich zusätzlich zum Isotopenprofil des Nudicaulins I (grau) ein Peak bei m/z 878, der $[\text{M}+\text{H}+6]^+$ entspricht (grün) sowie weitere Peaks in Abständen von +1. Im ^{13}C -NMR-Spektrum weisen die Satelliten von C-14 bis C-19 eine Feinstruktur auf. Die auftretenden Kopplungskonstanten der Satelliten sind in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Daraus ist zu schlussfolgern, dass jedes dieser ^{13}C -Atome jeweils zwei ^{13}C -Atome als Nachbarn besitzt. Das bedeutet, dass von der [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure zumindest der

Tabelle 4.4: Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure

# C	δ	J_{cc} (Hz) [koppelnde C-Atome]
C-14	122,7	59 [19]; 56 [15]
C-15	125,6	58 [14]; 58 [16]
C-16	128,5	58 [15]; 56 [17]
C-17	131,4	56 [16]; 56 [18]
C-18	117,2	56 [15]; 56 [19]
C-19	148,4	59 [14]; 56 [18]

gesamte ^{13}C -markierte Sechsring in das Nudicaulinaglykon eingebaut wird. Zudem könnte diese Vorstufe auch die Quelle des Stickstoffatoms sein. Fütterungsexperimente mit [^{15}N]Anthranilsäure resultierten jedoch laut Massenspektrum nicht in einem Isotopeneinbau.

4.2.6 Universal markiertes Tryptophan und Tryptamin

Universal ^{13}C -markiertes Tryptophan, ein entscheidender Ausgangspunkt bei der Bildung von Indolalkaloiden, wurde mehrfach ohne Erfolg in Fütterungsexperimenten eingesetzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tryptamin, das Decarboxylierungsprodukt von Tryptophan, als Vorstufe für beispielsweise Monoterpenindolalkaloide dient [127]. Dennoch führten die Fütterungsversuche mit [$^{13}\text{C}_{10}$]Tryptamin nicht zur Detektion von ^{13}C -Einbau in das Nudicaulinaglykon. In beiden Fällen könnten die Bedingungen des Experiments störend sein oder die beiden Substanzen sind generell nicht an der Nudicaulinbildung beteiligt.

4.2.7 [2- ^{13}C]Indol

Im Anschluss an diese Versuche wurde [2- ^{13}C]Indol als Vorstufe der Nudicauline getestet. Zunächst konnte im Massenspektrum ein Einbau von einem ^{13}C -Atom nachgewiesen werden, da die Intensität des Peaks m/z 873 im Vergleich zum unmarkierten Nudicaulin um 55 % höher ist. In Abbildung 4.13 sind die Isotopenprofile von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und von ^{13}C -markiertem Nudicaulin I (grün) aus dem

[2- ^{13}C]Indol experiment als Säulendiagramme dargestellt. Im ^{13}C -NMR-Spektrum ist das Signal von C-2 (δ 176,7) intensiver als die anderen Signale. Daraus ergibt sich, dass in Position 2 ein ^{13}C -Einbau stattgefunden hat. Zusammen mit dem Befund, dass C-2 und C-13 laut dem Experiment mit [$^{13}\text{C}_6$]Glucose den selben biosynthetischen Ursprung aufweisen, lässt dies den Schluss zu, dass die Kohlenstoffatome von Position C-2 und C-13 aus dem Indol bzw. einer indolartigen Vorstufe stammen. Aus diesem Grund sind Substitutionen an einer hypothetischen flavonoidähnlichen Vorstufe auszuschließen, die als Ursprung von C-2 und C-13 möglich gewesen wären.

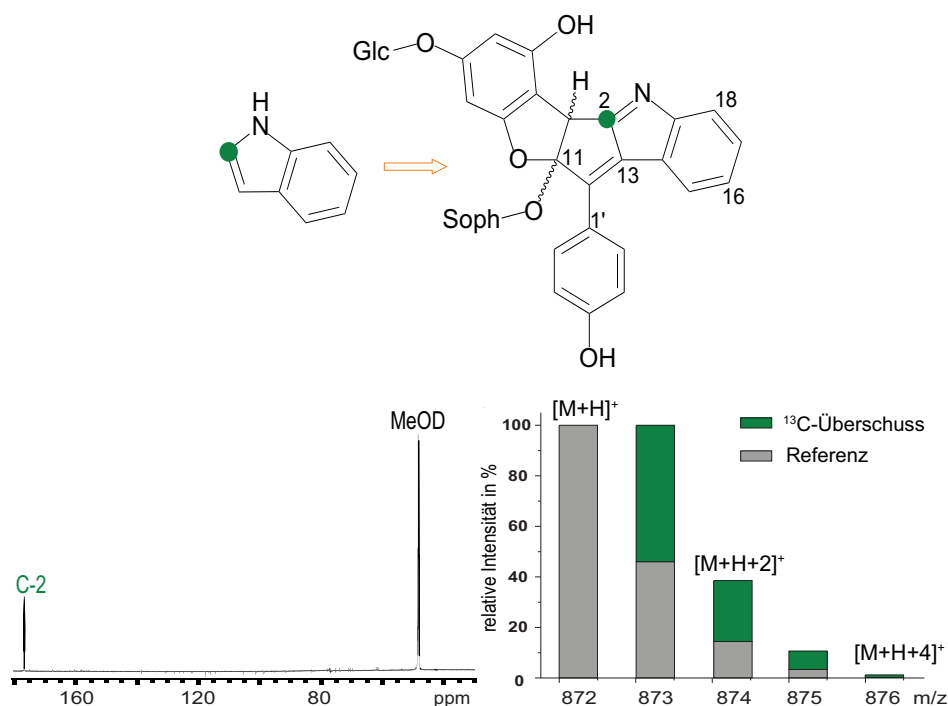


Abbildung 4.13: FE mit [2- ^{13}C]Indol: ^{13}C -NMR-Spektrum (^{13}C -Markierung in C-2) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkierten Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (grün)

4.2.8 Fazit zu den Fütterungsexperimenten

Erklärung zum Eigenanteil: Die Durchführung aller hier beschriebenen Fütterungsexperimente, die NMR-Messungen der aus ihnen stammenden Nudicauline und die Auswertung der NMR-Spektren erfolgten eigenständig nach der in [14] vorgestellten Vorgehensweise. Die Auswertung der von Dr. Marco Kai mittels HR-MS gewonnenen Massenspektren wurden ebenfalls selbstständig vorgenommen.

Mit Hilfe der Fütterungsexperimente von ^{13}C -markierten, potentiellen Vorstufen konnte untersucht werden, ob und wo eine Vorstufe in das Zielmolekül eingebaut wurde. Als Analysemethoden eignen sich besonders die Massenspektrometrie zur Bestimmung der totalen ^{13}C -Anreicherung und die NMR-Spektroskopie zur Bestimmung der Position des ^{13}C -Einbaus. Durch die Fütterungsexperimente mit universal markierter Glucose wurde gezeigt, dass die Ergebnisse mit denen der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] vergleichbar sind. Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Phenylalanin, Essigsäure und der Sechsring der Anthranilsäure als vollständige Moleküleinheiten für die Bildung des Nudicaulinaglykons genutzt werden. Beim Fütterungsexperiment mit Tyrosin konnte ^{13}C -Einbau nachgewiesen werden. Dies könnte den Ursprung der Hydroxylgruppe an Position C-4' des Nudicaulins erklären. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese der Nudicaulinbiosynthese in Übereinstimmung (siehe Abbildung 2.16 im Abschnitt 2.4).

Dennoch konnte bei den Fütterungsexperimenten mit Malonsäure und der *p*-Cumaronsäure keine ^{13}C -Anreicherung festgestellt werden, obwohl sie theoretisch eine essentielle Rolle spielen sollten. Dafür könnten die Rahmenbedingungen der Experimente und der Entwicklungsstand des Blütenmaterials verantwortlich sein oder diese Vorstufen liegen zu keinem Zeitpunkt frei vor. Der fehlende ^{13}C -Einbau der universal markierten Verbindungen Tryptophan und Tryptamin könnte außerdem daraus resultieren, dass diese beiden Substanzen keine Vorstufen für das Nudicaulinaglykon sind. Durch den ^{13}C -Einbau im Experiment mit markiertem Indol konnte bewiesen werden, dass die Kohlenstoffatome in Position C-2 und C-13 gemeinsam mit dem aromatischen Sechsring **d** aus dem Indolbiosyntheseweg stammen.

Leider lässt sich mit dem Ansatz der Fütterungsexperimente nicht feststellen, ob die zugeführte ^{13}C -markierte Vorstufe ohne weitere Verstoffwechslung in das Zielmolekül eingebaut wird. Die Verteilung des Substrats in konkurrierende Biosynthesewege könnte dazu führen, dass kein ^{13}C -Einbau in das Zielmolekül beobachtet wird. Außerdem könnten in diesen Fällen die einheitlichen Reaktionsbedingungen für jedes Fütterungsexperiment die Aktivität der beteiligten Enzyme beeinträchtigt haben. Dabei wäre der Einfluss des Entwicklungsstands der verwendeten Blütenblätter zu beachten, wobei beispielsweise Enzyme oder Enzymkomplexe nicht mehr bzw. noch nicht aktiviert vorliegen könnten.

Aus diesen Gründen wurde die Nudicaulinbiosynthese auch während des zeitlichen Verlaufs der Blütenentwicklung analysiert. Damit standen die natürlichen Abläufe der Nudicaulinbildung in den Kronblättern im Vordergrund. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden im folgenden Abschnitt vorgestellt. Daran schließen sich die Vorstellung und Auswertung der Ergebnisse zur Duftzusammensetzung der vier *P. nudicaule* Kultivare und ihrer ökologischen Beziehung zu Honigbienen an (siehe Abschnitt 4.4).

4.3 Einteilung der Blütenentwicklung in Stadien

4.3.1 Ansätze zur Einteilung der Entwicklungsstadien

Um die Analyse der Nudicaulinbiosynthese in den Knospen zu erleichtern und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte zunächst eine Untersuchung, ob die Blütenentwicklung in Stadien eingeteilt werden kann. Damit sollte zusätzlich sichergestellt werden, dass voneinander unabhängige Probennahmen für die geplanten Analysen mit eindeutig kategorisiertem Material durchgeführt werden konnten, um die Vergleichbarkeit zu wahren.

Um die Entwicklung zu charakterisieren, wurden an einigen Knospen die Sepalen der Blüte entfernt, ohne die Pflanze weiter zu beeinträchtigen. Dadurch war es möglich, die Blütenentwicklung an intakten Pflanzen zu beobachten. Es zeigte sich, dass die Blütenblätter ihre Farbe während ihrer Ausbildung ändern. Zu Beginn sind sie weiß, dann rötlich bis rot, orange und schließlich gelb (siehe Abbildung 4.14). Dieser Befund bestärkte die Hypothese, dass eine Unterteilung in Entwicklungsstadien möglich ist.

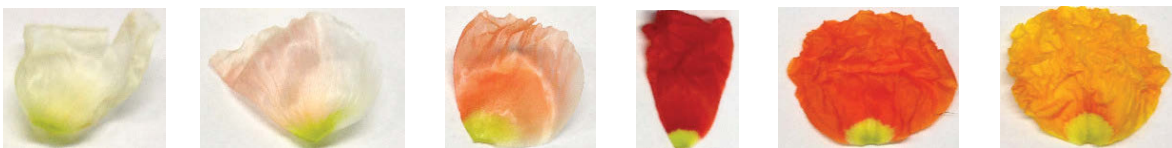


Abbildung 4.14: Die unterschiedlichen Farben der Blütenblätter während ihrer Entwicklung in den geschlossenen Knospen von gelb blühenden *P. nudicaule*

Da die Einteilung nach Farbe mit bloßem Auge zu stark vom subjektiven Empfinden abhängig war, wurde die Fragestellung letztlich mit Hilfe von multivariat-statistischen

Methoden bearbeitet. Die Probennahmestrategie und das experimentelle Vorgehen sind im Abschnitt 3.3.3 beschrieben. In der HPLC-DAD-Analyse der Rohextrakte aller 23 Proben wurden die meisten Peaks bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Aus diesem Grund erfolgte die Erstellung des Datensatzes für die multivariat-statistische Auswertung anhand der Chromatogramme bei dieser Wellenlänge. Im Folgenden wurden allen auftretenden Peaks, ihre Retentionszeiten (RT) sowie die zugehörigen relativen Flächen (bezogen auf die Gesamtflächen) pro Probe tabellarisch zusammengefasst. Signale mit derselben bzw. sehr ähnlicher Retentionszeit wurden mithilfe ihrer UV-Spektren verglichen. Die Auswertung ergab insgesamt 19 Peaks. Dieser Datensatz wurde im Anschluss standardisiert und einer Cluster- sowie einer Diskriminanzanalyse unterworfen, deren Ergebnisse in den folgenden beiden Abschnitten vorgestellt werden.

4.3.2 Clusteranalyse

Die Durchführung der Clusteranalyse erfolgte mithilfe der Ward-Methode und dem quadriert-euklidischen Distanzmaß. Das resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

Es zeigt, dass die Proben anhand der Chromatogramme ihrer Rohextrakte bei 254 nm in insgesamt fünf Entwicklungsstadien eingeteilt werden können. Das Cluster, das sich am meisten von den anderen unterscheidet, enthält ausschließlich Proben der jungen, weißen Blütenblätter (ES-1). Mit einer Distanz von 18 % werden die Proben aus weißen und blassroten Blüten (ES-2) von den blassroten bis rotorangen Blüten aus ES-3 unterschieden. Die übrigen Proben lassen sich in zwei Cluster unterscheiden, wobei eines ausschließlich orange Blütenblätter (ES-4) und das andere die einzige gelborange Blüte (ES-5) umfasst. Die hier erhaltenen Entwicklungsstadien konnten problemlos in die Probennahmestrategie übernommen werden, ohne zwangsläufig LC-Analysen zur Verifizierung des geernteten ES-Materials durchzuführen. Um herauszufinden, welche Peaks bzw. Verbindungen zur Einteilung der Entwicklungsstadien nötig waren, schloss sich eine Diskriminanzanalyse an.

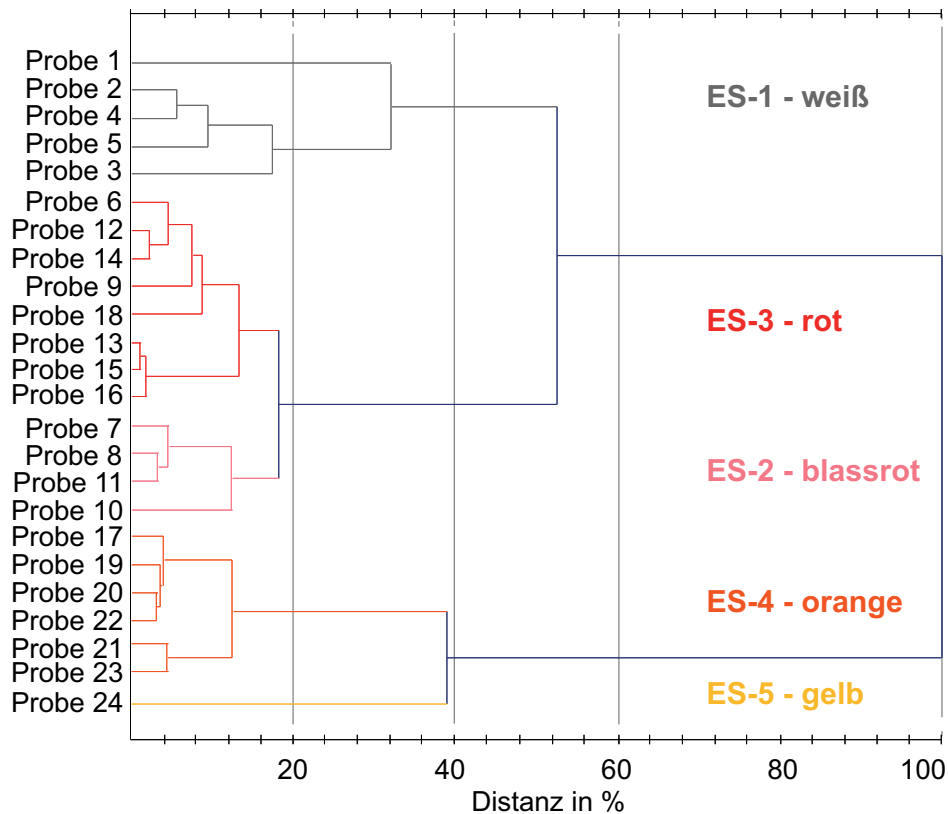


Abbildung 4.15: Dendrogramm der Clusteranalyse zur Einteilung von Entwicklungsstadien für verschieden farbiges Blütenmaterial aus noch geschlossenen Knospen von gelb blühenden *P. nudicaule*

4.3.3 Lineare Diskriminanzanalyse

Die aus der Clusteranalyse erhaltenen Entwicklungsstadien wurden für die Durchführung der Diskriminanzanalyse verwendet, wobei das fünfte Stadium mit nur einer zugeordneten Probe ausgeschlossen werden musste. Nachdem die Zuordnung der vier Gruppen zu den einzelnen Proben erfolgt war, wurde die Diskriminanzanalyse nach der Standardmethode und einer Toleranz von 0,01 durchgeführt. In Abbildung 4.16 ist Diskriminanzfunktion 1 einmal gegen Diskriminanzfunktion 2 und gegen Diskriminanzfunktion 3 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass Diskriminanzfunktion 1 die Proben aus ES-1 von den übrigen trennt. Mithilfe von Diskriminanzfunktion 2 werden die Proben aus ES-4 von denen aus ES-2 und ES-3 unterschieden. Durch Diskriminanzfunktion 3 erfolgt die Trennung der Proben aus ES-2 von denen aus ES-1 und ES-3. Doch erst das Auftragen aller drei Diskriminanzfunktionen (siehe Abbildung 4.17) veranschaulicht die vollständige Trennung der vier Gruppen. Dabei scheint eine Probe des ES-4 etwas abseits zu liegen, so dass es sich um ein Stadium zwischen ES-4 und ES-5 handeln

könnte. Diese Vermutung bestätigte sich beim Vergleich der Daten, da sowohl Gemeinsamkeiten der Probe mit denen aus ES-4 und der aus ES-5 bestehen. Daraus ergibt sich ebenfalls, dass Übergangsformen zwischen den aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien auftreten können. Dies ist bei Betrachtung eines biologischen Systems, wie den Blütenblättern, jedoch hinzunehmen. Aus diesem Grund könnten auch Fehler bei der Zuordnung unbekannter Proben auftreten. Zur Überprüfung des Klassifikationsmodells wurden wiederholt zufällig 20 % der Fälle des vorliegenden Datensatzes von der Berechnung der Klassifikationsfunktionen ausgeschlossen und im Anschluss als Testdatensatz herangezogen. Dabei erfolgte in jedem Test die richtige Zuordnung von mindestens 80 %, womit die Güte der Klassifikation bestätigt wurde. Aufgrund des geringen Umfangs des Datensatzes wurde von der Anwendung der Kreuzvalidierung abgesehen.

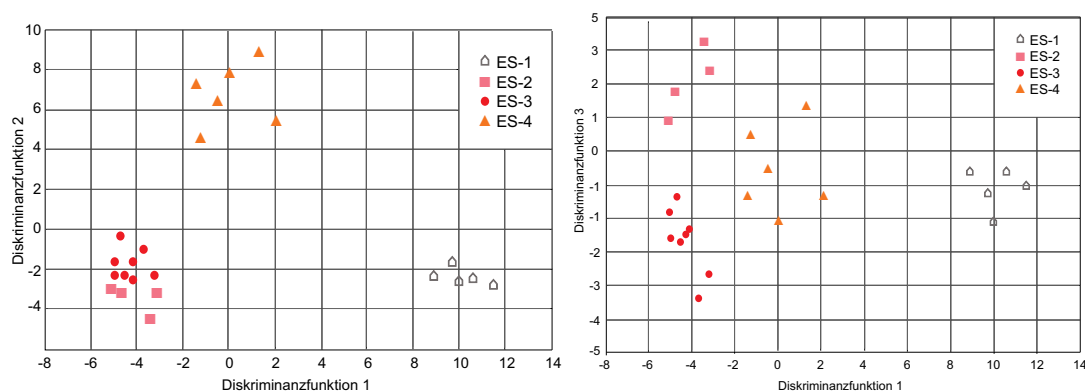


Abbildung 4.16: Darstellung von Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 2 (links) und Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 3 (rechts)

Es zeigte sich, dass nur sechs der insgesamt 19 Variablen (Verbindungen) zur Unterscheidung der vier vorgegebenen Gruppen nötig sind. Diese Trennvariablen konnten anhand ihrer UV-Spektren aus der HPLC-DAD-Analyse identifiziert werden. Es handelt sich um zwei Gossypetinderivate (RT 12,8 min, 14,9 min), ein Nudicaulinderivat (RT 13,4 min) und drei Verbindungen, von denen zwei (RT 7,7 min, 10,0 min) mit Kämpferolderivaten überlagert sind. Die drei weiteren Substanzen weisen ein nahezu identisches UV-Spektrum auf, das dem der Anthocyane ähnelt. Weiterhin zeichneten sich die drei Metabolite dadurch aus, dass ihre relative Intensität in den Chromatogrammen gegenüber den anderen Signalen bis zum ES-3 zunimmt und danach rapide abnimmt, wie in Abbildung 4.18 dargestellt. In den Chromatogrammen von ES-5 und in den offenen Blüten werden sie hingegen nicht detektiert. Aufgrund dieses interessan-

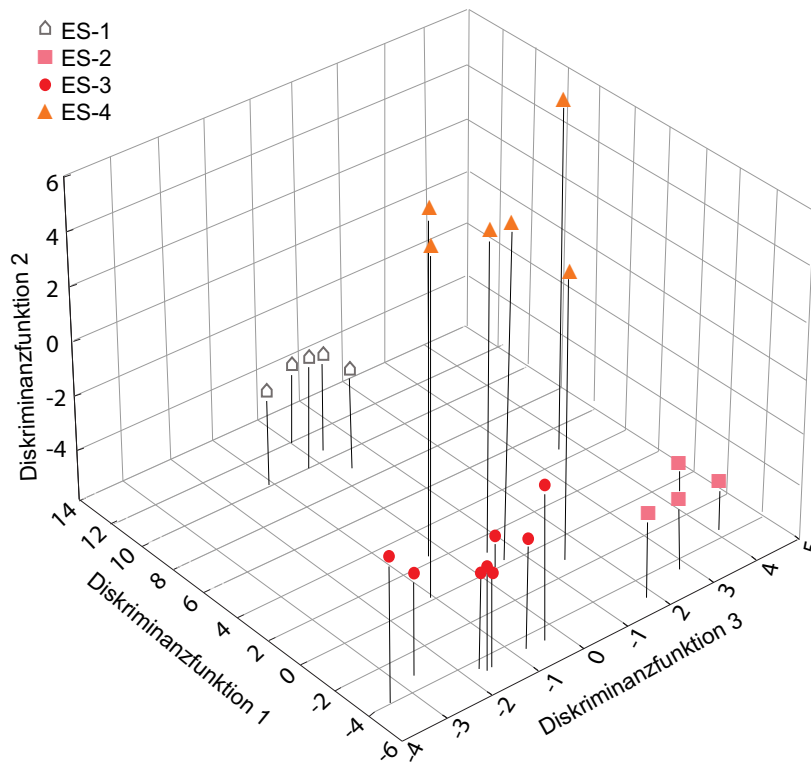


Abbildung 4.17: Darstellung von Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 2 und Diskriminanzfunktion 3

ten Sachverhaltes wurde eine LC-MS-Analyse (Methode 8, Anhang E) durchgeführt. In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Molekülpeak und prominenteste Fragmente der drei Anthocyane in ES-3 und ES-4 aus der LC-MS-Analyse und mögliche Zuordnung (Mal - Malonylrest, Glc - Glucose)

	Massefragmente und Zuordnung
Anthocyan 1	929 [M], 757 [M-2Mal], 433 [M-2Mal-2Glc], 271 [M-2Mal-3Glc]
Anthocyan 2	843 [M], 681 [M-Glc], 433 [M-1Mal-2Glc], 271 [M-1Mal-3Glc]
Anthocyan 3	757 [M], 595 [M-Glc], 433 [M-2Glc], 271 [M-3Glc]

Insbesondere das Massenfragment m/z 271 wies darauf hin, dass es sich um Derivate von Pelargonidin (Aglykon $[M]^+$) handelt. Dafür sprach auch der Vergleich der UV-Spektren mit einer Pelargonidinreferenz, wie in Abbildung 4.19 dargestellt. Dieses Anthocyanidin wurde bereits 1939 in geschlossenen Knospen von gelb blühenden *P. nudicaule* beschrieben [11]. Des Weiteren bestehen Gemeinsamkeiten im Chromatogrammprofil der ES-3 mit dem ES-4 des orange blühenden Kultivars [120]. In einer vorangegangenen Untersuchung wurde nachgewiesen, dass in der orangen Blüte Pe-

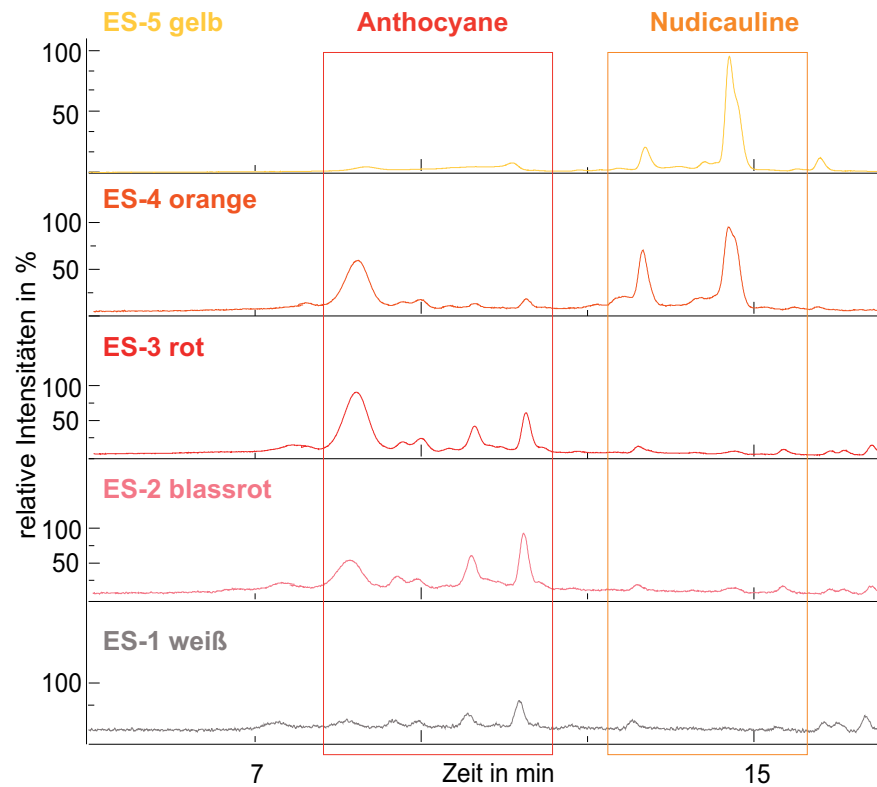


Abbildung 4.18: Rohextraktchromatogramme aus der HPLC-DAD-Analyse von ES-1 bis ES-5 des gelb blühenden *P. nudicaule* bei einer Wellenlänge von 460 nm

largonidinderivate und Nudicauline nebeneinander auftreten [57]. Ein Vergleich der Retentionszeiten der Pelargonidinderivate aus orangen Blüten und denen der ES-3 bis ES-4 des gelb blühenden Kultivars ergab eine vollständige Übereinstimmung. Daraus folgt, dass während der Entwicklung der gelben Kronblätter die gleichen Pelargonidinderivate auftreten. Dies gibt außerdem den Hinweis darauf, dass die orangen Blüten dem ES-4 von gelb blühendem *P. nudicaule* entsprechen. Somit wäre im orange blühenden Kultivar die Ausbildung der gelben Farbe, d.h. die Produktion der Nudicauline, gehemmt bzw. limitiert.

In der Tabelle 4.6 sind die Retentionszeiten, die berechneten Wilks- Λ -Werte, die relativen Signalintensitäten im Chromatogramm der HPLC-DAD-Analyse im Verlauf der Entwicklungsstadien sowie die Identität ihrer Aglykone zusammengefasst. Da die Wilks- Λ -Werte nahe null liegen, wurde eine sehr gute Trennung der ES-Proben erreicht.

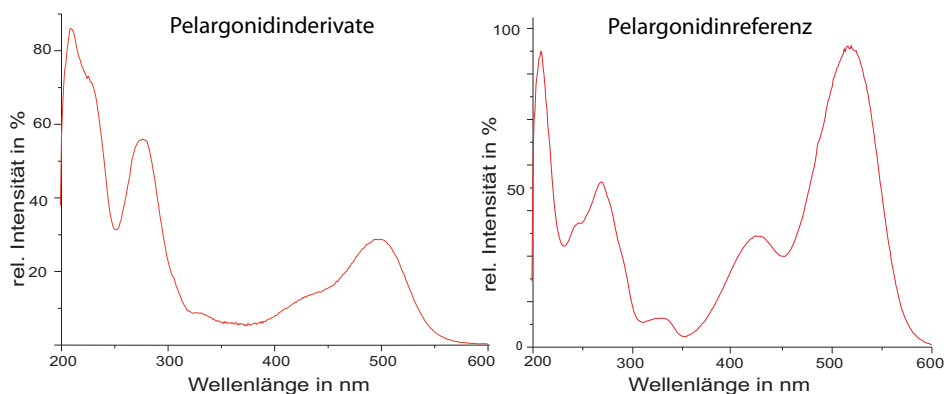


Abbildung 4.19: Vergleich der UV-Spektren aus der HPLC-DAD-Analyse von den Pelargonidinderivaten in ES-3 der gelben *P. nudicaule* Blüten (links) und dem unsubstituierten Pelargonidin (Referenz, rechts)

Tabelle 4.6: Diskriminanzvariablen für die ES-1 bis ES-4 des gelben *P. nudicaule* geordnet nach den zugehörigen Retentionszeiten, Wilks- Λ und der Verteilung ihrer relativen Intensitäten im Chromatogramm der HPLC-DAD-Analyse sowie ihrer Aglykonstruktur

RT (min)	Wilks- Λ	Verteilung	Aglykon
7,7	$5 \cdot 10^{-3}$	Zunahme bis ES-4	Kämpferol & Pelargonidin
9,1	$9 \cdot 10^{-3}$	Zunahme bis ES-3 Abnahme in ES-4	Pelargonidin
10,0	$4 \cdot 10^{-3}$	Zunahme bis ES-3 Abnahme in ES-4	Kämpferol & Pelargonidin
12,8	$7 \cdot 10^{-3}$	Zunahme bis ES-4	Gossypetin
13,4	$16 \cdot 10^{-3}$	Auftreten ab ES-4	Nudicaulin
14,9	$1 \cdot 10^{-2}$	Zunahme bis ES-4	Gossypetin

4.3.4 Nudicauline in den Entwicklungsstadien

Im nächsten Schritt wurden die Nudicaulinfraktionen aus den 23 Proben (siehe Abschnitt 4.3.1) mit Hilfe des in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Protokolls isoliert und mittels analytischer HPLC gemessen. In den resultierenden Chromatogrammen bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm fiel auf, dass die beiden Nudicaulindiastereomere ausschließlich in den Entwicklungsstadien ES-4 und ES-5 detektiert werden, wie in Abbildung 4.20 gezeigt wird. Damit beginnt erst hier die Reaktion der beiden Intermediate aus dem Flavonoid- und dem Indolbiosyntheseweg zu den Nudicaulinen. Weiterhin ist die Intensität der Nudicaulinsignale im ES-5 deutlich höher als im ES-4. Damit bestätigt sich, dass eine Unterteilung der nudicaulinhaltigen Entwicklungsstadi-

en in orange und gelb sinnvoll und die gesamte Entwicklungsstadieneinteilung aus der Clusteranalyse sehr nützlich ist.

Hinzu kommt, dass die Anteile der Pelargonidinderivate mit der Zunahme der Nudicauline geringer werden. Dieser Befund lässt die Vermutung zu, dass sie Vorstufen der beiden Nudicaulindiastereomere sein könnten. Außerdem werden Pelargonidinderivate ebenfalls über den Flavonoidbiosyntheseweg gebildet, so dass ihre Verwendung in der Nudicaulinbildung vorstellbar ist. Wenn sie nicht Teil der Nudicaulinbiosynthese sind, wäre es sehr interessant, ihre Funktion und Bedeutung in den sich entwickelnden Kronblättern der gelb blühenden *P. nudicaule* Pflanzen zu untersuchen, da sie eindeutig nicht der Farbgebung in den ausgebildeten gelben Blüten dienen.

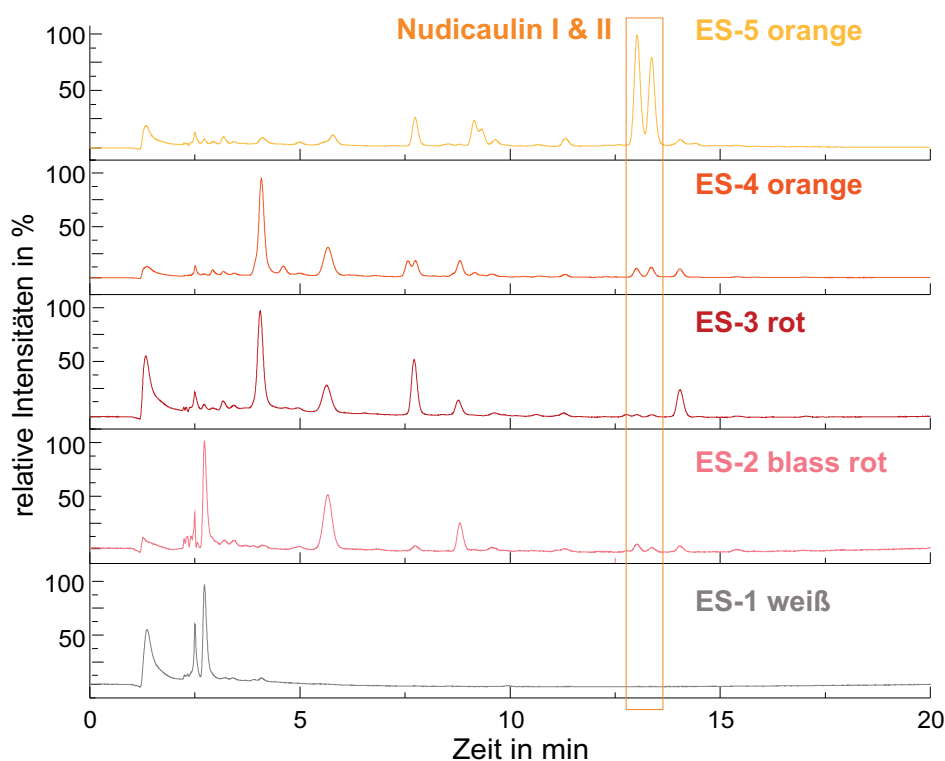


Abbildung 4.20: Chromatogramme bei 254 nm aus der HPLC-DAD-Analyse der Nudicaulinfraktionen von ES-1 bis ES-5

4.3.5 Fazit zur Einteilung der Entwicklungsstadien

Erklärung zum Eigenanteil: Alle Voruntersuchungen zur Einteilung der ES wurden selbstständig vorgenommen. Die Probenvorbereitung zur HPLC-DAD-Analyse und der Trennungsgang zur Nudicaulinisolation der 23 Einzelblütenproben erfolgten in Zusammenarbeit mit Bettina Dudek, während die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme

me sowie die Durchführung der multivariat-statistischen Auswertemethoden und die Interpretation ihrer Ergebnisse eigenständig bearbeitet wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Blütenentwicklung mittels Clusteranalyse anhand der HPLC-DAD-Analyse der Rohextrakte von gelb blühenden *P. nudicaule* Pflanzen in fünf Stadien einteilen lässt. Aufgrund dieses Ergebnisses besteht die Möglichkeit, das Material aus unabhängigen Probennahmen reproduzierbar zuzuordnen und so die Vergleichbarkeit der Resultate verschiedener Experimente zu den Entwicklungsstadien zu gewährleisten. Dieser Sachverhalt ist vor allem für die Durchführung und Auswertung der Proteom- und Genexpressionsanalysen aus Proben der einzelnen Entwicklungsstadien von Bedeutung.

Aus der Analyse der C2-Fractionen der Entwicklungsstadien resultierte, dass erst das ES-4 die beiden Nudicaulindiastereomere enthält, wobei ihr relativer Anteil im ES-5 weiter zunimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass erst im ES-4 die Bildung der beiden Nudicauline beginnt, also die Reaktion des flavonoidähnlichen Moleküls mit Indol bzw. einem Indolderivat zum Nudicaulin I bzw. II erfolgt. Dementsprechend sind alle an diesem Reaktionsschritt beteiligten Enzyme und Metaboliten im ES-4 zu suchen, während ihre eigenen Vorstufen in den vorangegangenen Entwicklungsstadien zu finden sein sollten.

Die Auswertung zur Verteilung der prominentesten Metabolite in den Rohextrakten der Entwicklungsstadien und die Identifizierung weiterer unbekannter Substanzen ist Teil der Masterarbeit von Bettina Dudek [126].

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Duftanalysen aller vier untersuchten *P. nudicaule* Kultivare sowie ihre ökologische Beziehung zu Honigbienen vorgestellt.

4.4 Zusammenhang von Duft und Blütenfarbe in *P. nudicaule*

4.4.1 Analyse und Vergleich der Duftprofile

Unter Berücksichtigung der außergewöhnlichen Biosynthese der Nudicauline könnte auch bei *P. nudicaule* ein Zusammenhang in der Bildung der Duftkomponenten und Blütenfarbstoffe vorliegen. Im Zug dieser Arbeit wurden die flüchtigen Verbindungen des Dufts aller vier Kultivare gesammelt und identifiziert. Im Anschluss kamen multivariat-statistische Auswertemethoden für die Datenanalyse zum Einsatz. Dabei lag ein Schwerpunkt darauf, herauszufinden, ob in *P. nudicaule* zwischen Blütenfarbe und Duft eine gemeinsame Biochemie besteht.

Da *P. nudicaule* seit dem 18. Jahrhundert als Zierpflanze in Europa und Nordamerika angebaut wird [21], ist es wahrscheinlich, dass Bienen als universale Bestäuber auch am Fortpflanzungserfolg dieser Mohnart beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die spektralen Reflexionsprofile der vier Blütenfarben aufgenommen und mit der Wahrnehmung von Honigbienen verglichen. Zuletzt erfolgten Experimente mit nachgebildeten Duftkompositionen der vier Kultivare und freifliegenden Honigbienen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob die Pollinatoren in der Lage sind, die verschiedenen Düfte voneinander zu unterscheiden, wenn sie zuvor auf einen Duft trainiert wurden.

Zunächst erfolgte eine Analyse der Zusammensetzung der Duftbouquets der vier untersuchten *P. nudicaule* Kultivare. Die Durchführung der Duftsammlung von intakten Blüten ist in Abschnitt 3.3.4 erläutert. Anhand der GC-MS-Daten konnte geschlossen werden, dass jede Blütenfarbe ein eigenes Duftprofil besitzt, wobei nur wenige Unterschiede in der Duftzusammensetzung bestehen. Die detektierten Verbindungen sind 1,2-Dimethoxy- und 1,4-Dimethoxybenzen, Indol, 2,6,10-Trimethyldodecan (Farnesan) und Heptadecanon. In Abbildung 4.21 sind die Totalionenchromatogrammprofile für die Duftkompositionen der vier Blütenfarben aus der GC-MS-Analyse einander gegenüber gestellt.

Die relative Intensität von 1,2-Dimethoxybenzen ist im Duft der roten, gelben und orangen Blüten gegenüber dem Anteil an 1,4-Dimethoxybenzen höher. Im Gegensatz

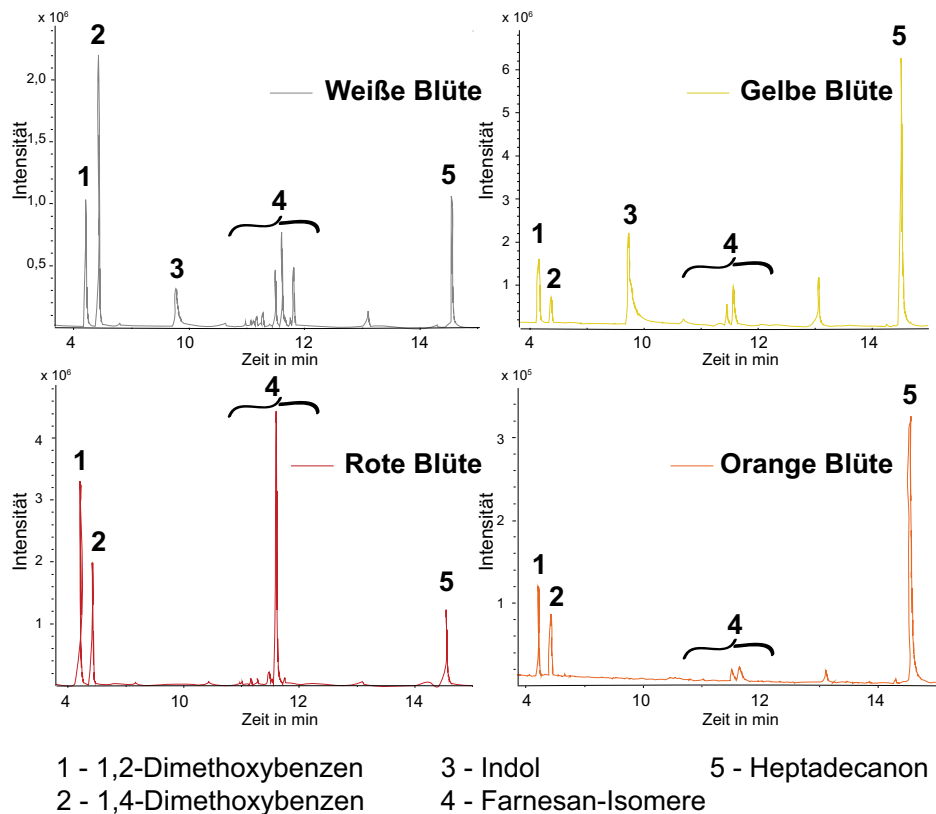


Abbildung 4.21: Totalionenchromatogramme aus der GC-MS-Analyse der Duftprofile für die vier *P. nudicaule* Kultivare im blühenden Stadium

dazu ist 1,4-Dimethoxybenzen die dominanteste Verbindung im Bouquet der weißen Blüten. Im Duft der weißen und roten Blüten treten mehr Farnesanisomere auf, als im Profil der orangen und gelben Blüten. Die Intensität des Heptadecanonpeaks ist im Duft der gelben und orangen Blüten besonders dominant.

Es fällt auf, dass das Duftprofil der gelben Blüten im Gegensatz zu den anderen einen sehr markanten Indolpeak aufweist. Im Duft des weißen Kultivars ist sein Anteil deutlich geringer, in dem der roten und orangen fehlt er völlig. Dieser Befund steht im direkten Zusammenhang zur Nudicaulinbiosynthese, da Indol eine Vorstufe der Nudicauline ist, wie bereits in Abschnitt 4.2 gezeigt wurde.

Während in gelben Blüten (ab ES-5) keine bzw. kaum Pelargonidinderivate mehr nachgewiesen werden, sind diese an der Ausbildung der orangen Blütenfarbe beteiligt. Dies unterstützt die Hypothese, dass die orange, offene Blüte dem ES-4 der gelb blühenden *P. nudicaule* Pflanzen entspricht. Damit wäre hier die Nudicaulinbiosynthese durch die verminderte Verfügbarkeit von Indol limitiert, wodurch sich die roten Pelargonidinderivate in den Petalen akkumulieren und mit der geringeren Konzentration an gelben

Nudicaulinen die orange Farbe erzeugen. Für die gelben Kultivare ergäbe sich so im Umkehrschluss, dass die Verfügbarkeit der Pelargonidinderivate der limitierende Faktor für die Nudicaulinbildung ist, wodurch letztlich überschüssiges Indol emittiert wird.

4.4.2 Hauptkomponentenanalyse zur Duftzusammensetzung

Aus allen Chromatogrammen der GC-Analyse wurden die Peakflächen der fünf genannten Verbindungen (1,2-Dimethoxy-, 1,4-Dimethoxybenzen, Indol, Farnesan, Heptadecanon) integriert und ihr prozentualer Anteil in jeder Probe berechnet. Nach der Standardisierung des Datensatzes wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Von den insgesamt fünf errechneten Hauptkomponenten erfüllen nur die ersten beiden das Kaiser-Kriterium, denn ihre Eigenwerte sind größer eins. Bei der Darstellung von Hauptkomponente 1 (Eigenwert 2,2) gegen Hauptkomponente 2 (Eigenwert 1,1) ergab sich, dass durch Hauptkomponente 1 die Unterscheidung der Duftproben aus gelben und weißen Blüten erfolgt, wie in Abbildung 4.22 gezeigt. Dabei wurden zwei Proben von gelben und drei von weißen Blüten entgegengesetzt zugeordnet. Interessanterweise treten bis auf zwei alle Duftproben des orangenen Kultivars zusammen mit denen gelber Blüten auf, obwohl die Intensitäten der fünf Verbindungen in den Chromatogrammen der beiden Farben voneinander verschieden sind. Des Weiteren werden mit einer Ausnahme alle Proben der roten Blüten durch die Hauptkomponente 1 von denen der gelben und orangenen Blüten getrennt. Die Hauptkomponente 1 erklärt insgesamt 44,0 % und Hauptkomponente 2 insgesamt 22,3 % der Varianz des Datensatzes.

In Tabelle 4.7 sind die Ladungen der einzelnen Variablen für die beiden Hauptkomponenten aufgeführt. Im Fall von Hauptkomponente 1 laden die beiden Dimethoxybenzene mit 0,69 bzw. 0,83 besonders hoch. Ihr Vorzeichen ist weiterhin denen der anderen drei Variablen entgegengesetzt, wobei die Ladung des Heptadecanons (-0,82) einen ähnlich hohen Beitrag zur Trennung leistet. Im Gegensatz dazu ergibt sich für die zweite Hauptkomponente, dass die beiden übrigen Verbindungen Indol (0,58) und Farnesan (-0,74) auf sie den größten Einfluss nehmen.

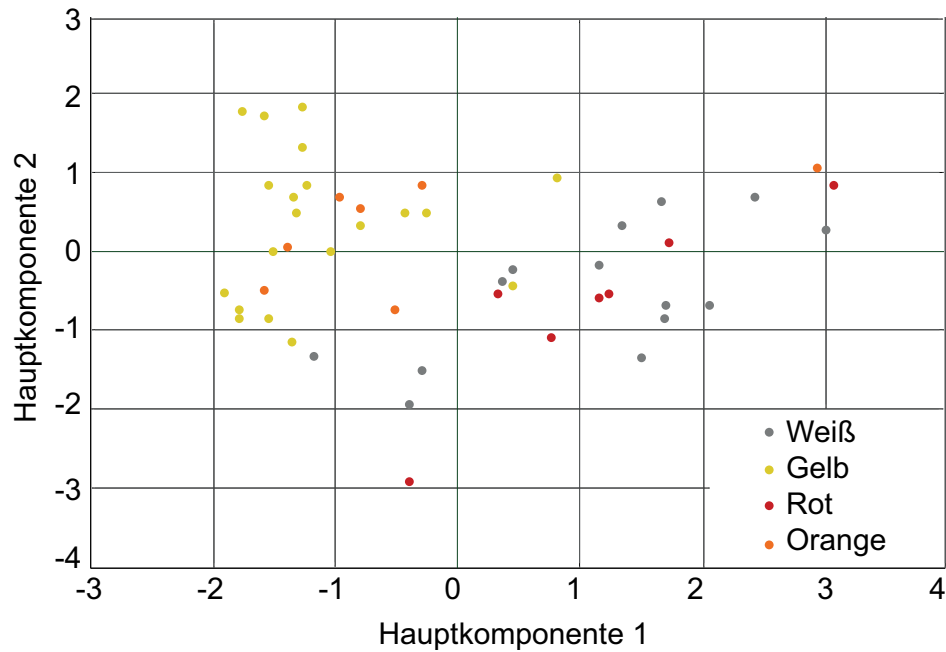


Abbildung 4.22: Darstellung der Hauptkomponente 1 gegen 2 für die Duftprobennahmen der vier *P. nudicaule* Blütenfarben

Tabelle 4.7: Faktorladungen der Variablen in der Hauptkomponentenanalyse

	Hauptkomponente 1	Hauptkomponente 2
1,2-Dimethoxybenzen	0,69	0,35
1,4-Dimethoxybenzen	0,83	-0,23
Indol	-0,37	0,59
Farnesan	-0,46	-0,74
Heptadecanon	-0,82	0,20

4.4.3 Vergleich der Bouquets der weißen und gelben Blüten

Um zu untersuchen, ob zwischen den Daten der weiß und gelb blühenden Kultivare für die fünf flüchtigen Verbindungen ein signifikanter oder zufälliger Unterschied besteht, wurde zuerst auf Normalverteilung, Ausreißer und Varianzenhomogenität geprüft. In Tabelle 4.8 sind die Mittelwerte der Flächen und die dazugehörigen Standardabweichungen für die flüchtigen Verbindungen in diesen Proben zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass für Indol und Heptadecanon ein signifikanter Unterschied zwischen den Duftprofilen der beiden Blütenfarben besteht. Bei den Daten des 1,2-Dimethoxybenzens ist er hingegen zufällig. Bei der Datenanalyse für Farnesan und 1,4-Dimethoxybenzen konnte keine Varianzenhomogenität nachgewiesen werden, wes-

wegen der t-Test nach Welch zur Anwendung kam. Aus den Ergebnissen folgte, dass der Unterschied in den beiden Duftzusammensetzungen für Farnesan zufällig, jedoch für 1,4-Dimethoxybenzen signifikant ist. Damit stellt sich die Frage, worin sich die Biochemie (Biosynthese und biologische Funktion) der beiden Dimethoxybenzene im weiß blühenden Kultivar unterscheidet, da von einem gemeinsamen biosynthetischen Ursprung ausgegangen werden kann. Außerdem bleibt zu untersuchen, warum die relative Intensität von 1,4-Dimethoxybenzen im Duft der gelben Blüten um mehr als das Zehnfache geringer ist und welche Bedeutung es als flüchtige Verbindung für Pollinatoren hat.

Tabelle 4.8: Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Flächenanteile für die flüchtigen Verbindungen im Duftprofil weißer und gelber *P. nudicaule* Blüten

	weiß	gelb
1,2-Dimethoxybenzen	12,4 ± 11,7 %	11,6 ± 7,3 %
1,4-Dimethoxybenzen	41,6 ± 20,6 %	3,5 ± 3,1 %
Indol	2,5 ± 1,9 %	24,5 ± 5,4 %
Farnesan	9,5 ± 7,6 %	7,2 ± 2,6 %
Heptadecanon	15,9 ± 12,7 %	36,8 ± 4,8 %

4.4.4 Bedeutung der spektralen Reflexion der vier Blütenfarben

Die ursprünglich natürlich auftretenden *P. nudicaule* Pflanzen besaßen weiße bzw. gelbe Blüten, die in ihrem gemeinsamen Habitat um Bestäuber, wie beispielsweise Honigbienen, konkurrierten. Da diese Pollinatoren die Fähigkeit besitzen, die spektrale Reflexion ihrer Umgebung wahrzunehmen, können sie Blütenfarben anhand ihres Reflexionsprofils unterscheiden. Der Vergleich der Farbwahrnehmung der Honigbienen mit den Reflexionsprofilen der vier verschieden farbigen Blüten in Abbildung 4.23 ergab, dass die Pollinatoren in der Lage sind, die Blütenfarben weiß, gelb und rot voneinander zu unterscheiden. Die roten und orangen Blüten werden jedoch als eine Blütenfarbe wahrgenommen, da ihre Reflexionsprofile zu ähnlich sind.

Aus diesem Ergebnis folgt, dass Honigbienen lernen können, zumindest drei der Blütenfarben zu unterscheiden. Des Weiteren sind sie in der Lage zu entscheiden, welche

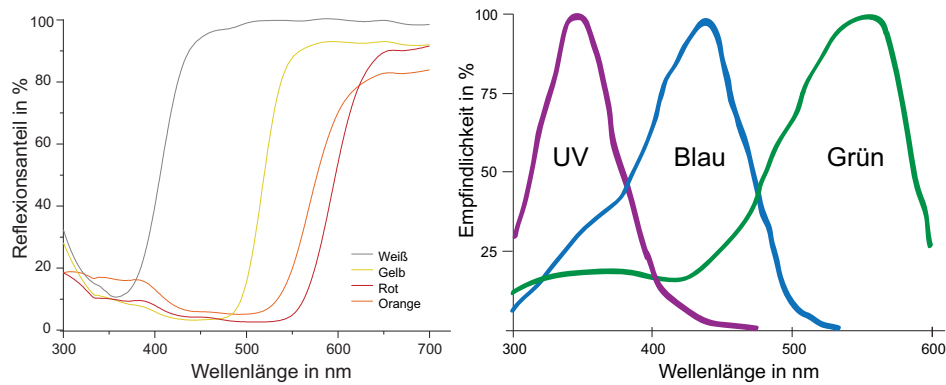


Abbildung 4.23: Vergleich der spektralen Reflexionen (links) der vier *P. nudicaule* Blütenfarben (aufgenommen von Kooperationspartner Dr. Jaime Martinez-Harms, MPI für chemische Ökologie) und Farbwahrnehmung von Honigbienen nach [128] (rechts)

Blütenfarbe sie anfliegen. Damit würde sich für den Kultivar, dessen Blütenfarbe zuerst erlernt wurde, ein ökologischer Vorteil gegenüber den übrigen ergeben.

4.4.5 Freilandversuche mit künstlichen Düften und Honigbienen

Um die Frage zu beantworten, ob die chemische Zusammensetzung des Dufts der *P. nudicaule* Blüten ebenfalls von Honigbienen unterschieden bzw. erlernt werden kann, wurden Freilandversuche durchgeführt. Die Versuchsarena war auf dem Gelände des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie aufgebaut, worin freifliegende Honigbienen einzeln zunächst auf einen Duft konditioniert wurden, in dem sie Glucoselösung als Belohnung erhielten. Nachdem jede Versuchsbiene mindesten 30 Mal die Konditionierung durchlaufen hatte, wurde in der Arena ein weiterer Duft hinzugeschaltet und der Bienenflug dreißig Sekunden lang aufgezeichnet. Daran schloss sich die Auswertung des Filmmaterials mit der Fragestellung an, wie oft welche Duftquelle angefliegen wurde. Pro Tag erfolgten diese Tests mit zwei Honigbienen, die danach eingefangen und eliminiert wurden. Für die Untersuchung wurden die nachgebildeten Bouquets der gelb, weiß und rot blühenden *P. nudicaule* Pflanzen herangezogen. Mit sechs Honigbienen erfolgte die Konditionierung auf einen Duft und der Test gegenüber einem anderen Bouquet. Stellvertretend für die Ergebnisse der Duftkombinationen für gelb-weiß, weiß-gelb, gelb-rot, rot-gelb, weiß-rot und rot-weiß ist in Abbildung 4.24 eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse für die Konditionierung auf das Bouquet der gelben Blüten dargestellt.

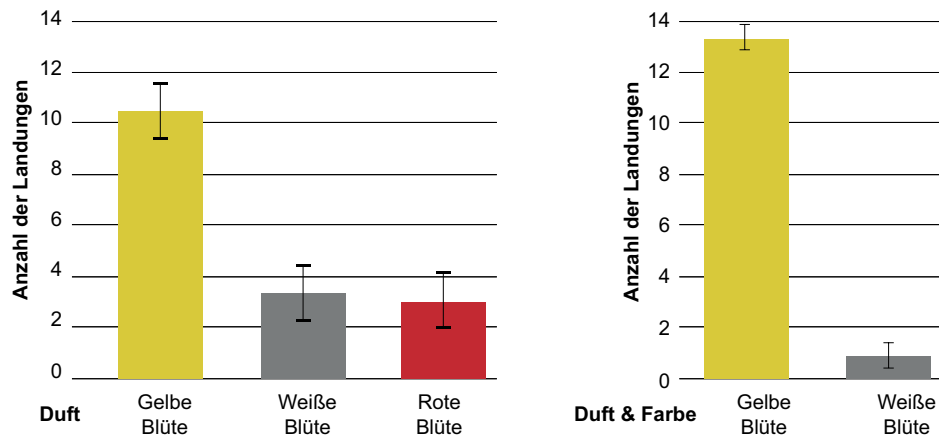


Abbildung 4.24: Vergleich der Landungszahlen der Honigbienen auf den Emissionsquellen des konditionierten Dufts des gelben Kultivars und der im Test hinzugefügten Bouquets von roten bzw. weißen Blüten (links) und Vergleich der Landungszahlen der Honigbienen bei Konditionierung auf Duft und Farbe der gelben Blüten im Test gegen Duft und Farbe der weißen Blüte (rechts)

Die erlernte Duftzusammensetzung der gelben Blüten wurde von den Honigbienen in jedem Test bis zu dreimal häufiger angefliegen als der neue Duft. Dabei wurde sowohl beim Vergleich des Bouquets der gelb blühenden mit dem Duftprofil der roten bzw. weißen Blüten kein Unterschied beobachtet. Dieser Befund bestätigte sich auch bei der Konditionierung auf den roten sowie weißen Duft und dem sich anschließenden Vergleich der beiden übrigen Bouquets. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Konditionierung bzw. das Erlernen eines Dufts einen Einfluss auf die Zielfindung der Honigbiene hat, so dass ein ökologischer Vorteil im natürlichen Habitat für die zuerst erlernte Duftkombination bestehen könnte.

In einem weiteren Experiment wurde auf Duft und Blütenfarbe konditioniert, wobei der Bereich um die Emissionsquelle mit einem farbigen Papier mit denselben spektralen Eigenschaften wie die der Blütenblätter beklebt worden war. Daraus resultierte, dass die zuvor erlernte Kombination bis zu zehnmal häufiger angefliegen wurde als die neue. Damit konnte gezeigt werden, dass Blütenfarbe und Duft gemeinsam Einfluss auf das Pollinatorverhalten nehmen und zusammen den Lerneffekt verstärken, wobei dies den ökologischen Vorteil der zuerst angefliegenen Varietät im natürlichen Habitat weiter begünstigen würde.

4.4.6 Fazit zur Duftanalyse der Blütenfarben in *P. nudicaule*

Erklärung zum Eigenanteil: Die Duftsammlung wurde zusammen mit Dr. Jaime Martinez-Harms und Bettina Dudek durchgeführt. Die Auswertung der von Dr. Jaime Martinez-Harms gewonnen GC-MS-Daten sowie die anschließende Hauptkomponentenanalyse und die statistischen Berechnungen erfolgten eigenständig, ebenso wie die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Die Freilandversuche und die Auswertung ihrer Resultate wurden wiederum zusammen mit Dr. Jaime Martinez-Harms, Bettina Dudek und Olga Ihssen durchgeführt. Die Aufnahme der spektralen Reflexionsprofile aller vier Blütenfarben erfolgte durch Dr. Jaime Martinez-Harms.

Aus den gewonnenen Ergebnissen folgt, dass Indol ein Hauptbestandteil des Dufts der gelben *P. nudicaule* Blüten ist und in denen der anderen drei Kultivare keinen oder nur einen geringen prozentualen Teil einnimmt. Dabei besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem Indolanteil im Duft der beiden natürlichen *P. nudicaule* Blütenfarben, weiß und gelb. Dieser Befund lässt sich in direkten Zusammenhang mit der Nudicaulinbiosynthese in gelben Blüten bringen, worin Indol Ursprung der Ringe **c** und **d** im Aglykon ist. In ES-3 und ES-4 können noch Pelargonidinderivate detektiert werden, die im ES-5 fehlen, wenn die Petalen die finale Gelbfärbung annehmen. Das Fehlen des Indols im Duft der orangen Blüten unterstützt die Vermutung, dass es sich um einen limitierenden Faktor der Nudicaulinbildung handelt und dass die orange Blüte dem ES-4 der gelben Kronblätter entspricht. Denn hier sind noch Pelargonidinderivate vorhanden, deren Rottöne gemeinsam mit den gelben Nudicaulinen die beobachtete Orangefärbung der Kronblätter generieren. Damit wird die aktuell diskutierte Theorie über eine enge Assoziation zwischen der Biochemie bzw. der Biosynthesen von Farbstoffen und Duftbestandteilen in den Blüten unterstützt. Da die hier erbrachten Resultate an Wildtyppflanzen bzw. Kultivaren und nicht an genmanipulierten Pflanzen entstanden sind, unterscheiden sie sich gravierend vom Großteil der vorausgegangenen Studien an anderen Pflanzen in der Literatur [35, 47, 49].

Worin die molekularen und biochemischen Unterschiede der Biosynthesen der Duftmetabolite und Farbstoffe der weiß, gelb und orange blühenden *P. nudicaule* Pflanzen bestehen und ob die Verfügbarkeit der Pelargonidinderivate bzw. des Indols in gelben bzw. orangen Blüten tatsächlich limitierende Faktoren der Nudicaulinbildung

sind, werden die aktuell durchgeführten Analysen des Proteoms und Transkriptoms der Entwicklungsstadien aller drei Kultivare zeigen.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Duft sowie die Kombination aus Blütenfarbe und Duft der *P. nudicaule* Blüten Einfluss auf das Verhalten von Pollinatoren, wie Honigbienen, nehmen können. Je nachdem, welche Kombination von Duft und Farbe der Bestäuber im Freiland zuerst erlernt hat, könnte der Fortpflanzungserfolg der anderen Kultivare im selben Habitat negativ beeinflussen. Insbesondere weil die Anthese von *P. nudicaule* im selben Zeitraum auftritt. Dabei werden pro Pflanze bis zu 15 Blüten produziert, die sich nacheinander öffnen und drei bis vier Tage blühen. Die Honigbienen würden damit bevorzugt die Blüten der zuvor gelernten Duft-Blütenfarbkombination anfliegen bzw. bestäuben, bevor sie sich den Blüten der anderen Kultivare zuwenden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Struktur, die Biosynthese und die ökologische Bedeutung der farbgebenden Nudicauline aus gelben *P. nudicaule* Blüten untersucht. Es handelt sich dabei um Indolalkaloide, die eine außergewöhnliche polyphenolartige Teilstruktur und drei Glucosesubstituenten aufweisen. Die Nudicauline wurden erstmals 1939 isoliert [11], wobei erst 2006 ein erster Strukturvorschlag publiziert wurde [13]. Offene Fragestellungen in Bezug auf die Aglykonstruktur und das Interesse an der unbekanntem Biosynthese dieser einzigartigen Indolalkaloide bildeten den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Es erfolgte zunächst die Synthese von Nudicaulinderivaten durch Hydrierung, Methylierung und enzymatische Hydrolyse. Die anschließende Auswertung der erhaltenen NMR- und MS-Daten sowie der, in einer Kooperationsarbeit entstandenen, experimentell bestimmten und quantenmechanisch berechneten UV- und CD-Spektren, resultierte in der Revision des Strukturvorschlags und erstmals in der Bestimmung der absoluten Konfiguration der beiden Diastereomere [15]. Dabei bestätigte sich die außergewöhnliche Zusammensetzung der Nudicauline aus einer Indol- und einer polyphenolartigen Untereinheit, so dass die Frage nach dem Verlauf der bisher unbekanntem Biosynthese in den Mittelpunkt der Untersuchung rückte.

Es wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Nudicaulinbildung über eine Kombination des Indol- und Polyphenolbiosyntheseweges verläuft. Mittels einer vorausgegangenen ^{13}C -Studie gelang die erste Bestätigung dieses Sachverhalts [14]. Es wurde nachgewiesen, dass Intermediate des Indolmetabolismus zur Bildung der Ringe **c** und **d** verwendet werden, während Metabolite des Phenylpropanoid- und des Polyketidbiosyntheseweges für die Formierung der Ringe **f** bzw. **a** verantwortlich sind. In dieser retrobiosynthetischen Studie wurden eine naringeninartige Verbindung und Tryptophan bzw. Tryptamin als potentielle Vorstufen zur Ausbildung der Ringe **b** und **e** im Nudicaulinaglykon vorgeschlagen [14].

Da weder Daten zum Transkriptom noch zu den Enzymen in den Kronblättern von *P. nudicaule* für molekularbiologische Analysen existierten, wurden Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Substanzen aus den beiden beteiligten Biosyntheserouten

durchgeführt. Es zeigte sich, dass zerkleinertes Blütenmaterial aus den Knospen für Fütterungsexperimente geeignet ist. Dabei war das Ziel herauszufinden, welche Vorstufen in die Aglykone eingebaut werden und an welcher Stelle Unterschiede zu den bekannten Biosynthesewegen auftreten, die zur Nudicaulinbildung führen.

Die Versuche mit universal markierter Glucose ergaben, dass die Nudicaulinbiosynthese *de novo* und *in situ* in den Blütenblättern stattfindet. Demnach sind alle beteiligten Metabolite und Enzyme in den sich entwickelnden Kronblättern zu finden. Des Weiteren bestätigte die Übereinstimmung der gewonnenen Ergebnisse mit denen der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14], dass sich die Fütterungsexperimente dazu eignen, die Vorgänge im Biosynthesenetzwerk der Blütenblätter als biologisches System zu untersuchen.

Mit Hilfe der Fütterungsexperimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Ring **a** aus drei Acetateinheiten gebildet wird. Dieser Befund korrespondiert mit dem Verlauf des Polyketidbiosyntheseweges [129] und unterstützt somit das Ergebnis der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14]. Außerdem leiten sich die Kohlenstoffatome C-3, C-11, C-12 und der gesamte Ring **f** aus dem intakten Phenylpropankohlenstoffskelett ab, wie das Experiment mit universal markiertem Phenylalanin bewies. Als Ursprung der Hydroxylgruppe an C-4' im Ring **f** kommt besonders Tyrosin als ein Folgemetabolit von Phenylalanin in Frage, da ^{13}C -Einbau in das Nudicaulinaglykon aus dem Versuch mit [2- ^{13}C]Tyrosin nachgewiesen wurde. Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierter *p*-Cumarsäure, die über wenige Schritte aus Phenylalanin bzw. Tyrosin gebildet wird [80], resultierten jedoch nicht in ^{13}C -Einbau. Der wahrscheinlichste Grund für diese Beobachtung ist das Channeling des Substrates in einem makromolekularen Enzymkomplex, dessen Auftreten in der Flavonoidbiosynthese bereits in der Literatur beschrieben wurde [86, 88]. Der ^{13}C -Einbau von markiertem Phenylalanin und Tyrosin als Vorstufen der Phenylpropanoidbiosyntheseroute steht in Einklang mit den Ergebnissen der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] und der vorausgegangenen Hypothese zur Nudicaulinbildung.

Die untersuchten Metabolite des Indolbiosyntheseweges waren [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure, [2- ^{13}C]Indol, [$^{13}\text{C}_{11}$]Tryptophan sowie [$^{13}\text{C}_{10}$]Tryptamin. Zunächst erfolgte der Beweis, dass Anthranilsäure das Kohlenstoffgerüst für den Ring **d** darstellt, wodurch sich die Beteiligung von Intermediaten des Indolweges an der Nudicaulinbiosynthese bestätigte. Jedoch konnte in Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markiertem Tryptophan

keine ^{13}C -Markierung in den Zielmolekülen detektiert werden. Dieser Befund war aus der Literatur für Alkaloide bereits bekannt [127], wobei anstelle von Tryptophan das strukturverwandte Tryptamin die Vorstufe bildete. Entgegen allen Erwartungen ergab sich im Versuch mit ^{13}C -markiertem Tryptamin kein positives Ergebnis, wodurch zum ersten Mal ein Widerspruch zur vorausgegangenen Hypothese bestand. Letztlich konnte im Fütterungsexperiment mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Indol}$ der positionsspezifische ^{13}C -Einbau in Position C-2 des Nudicaulinaglykons nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist der Ursprung der Kohlenstoffatome C-2 und C-13 tatsächlich Indol bzw. ein strukturell nahverwandter Metabolit. Dies untermauert den Befund der Bindungsmarkierung (bond labeling) zwischen diesen Positionen in der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie [14] und im Versuch mit universal markierter Glucose. In Abbildung 5.1 sind die wichtigsten Ergebnisse der Fütterungsexperimente schematisch zusammengefasst.

Da die Nudicaulinbiosynthese *de novo* und *in situ* in den unreifen Petalen stattfindet, eröffnete sich eine weitere Perspektive, diese während der Kronblätterentwicklung zu untersuchen. Dafür sprach auch, dass die Blüten in den Knospen des gelben *P. nudicaule* Kultivars einen Farbwechsel von weiß über blass rot und rot zu orange bis schließlich gelb durchlaufen.

Zunächst wurde eine Einteilung der Blütenentwicklung in Stadien mittels HPLC-DAD-Analyse und multivariat-statistischer Auswertemethoden durchgeführt. Aus der Clusteranalyse resultierte eine Unterscheidung in fünf Entwicklungsstadien. Aufgrund dessen, dass diese mit bloßem Auge unterschieden werden konnten, war eine problemlose Adaption der Stadien in die Probennahmestrategie möglich. Dies schuf die Voraussetzung für reproduzierbare und vergleichbare Analysenergebnisse aus verschiedenen Probennahmen. Gleichzeitig wurden diese Kenntnisse genutzt, um erstmals das Proteom und Transkriptom in den Entwicklungsstadien von *P. nudicaule* zu analysieren. Es ergab sich weiterhin die Aussicht, molekularbiologische Experimente und schlussendlich Enzymassays zur Analyse der Produkte einer hypothetischen Nudicaulinsynthese zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen.

Die Diskriminanzanalyse zeigte, dass sechs Variablen zur Unterscheidung der Stadien notwendig sind. Dazu zählen ein Nudicaulin- und zwei Gossypetinderivate sowie drei weitere Verbindungen, von denen zwei mit Kämpferolderivaten überlagert waren.

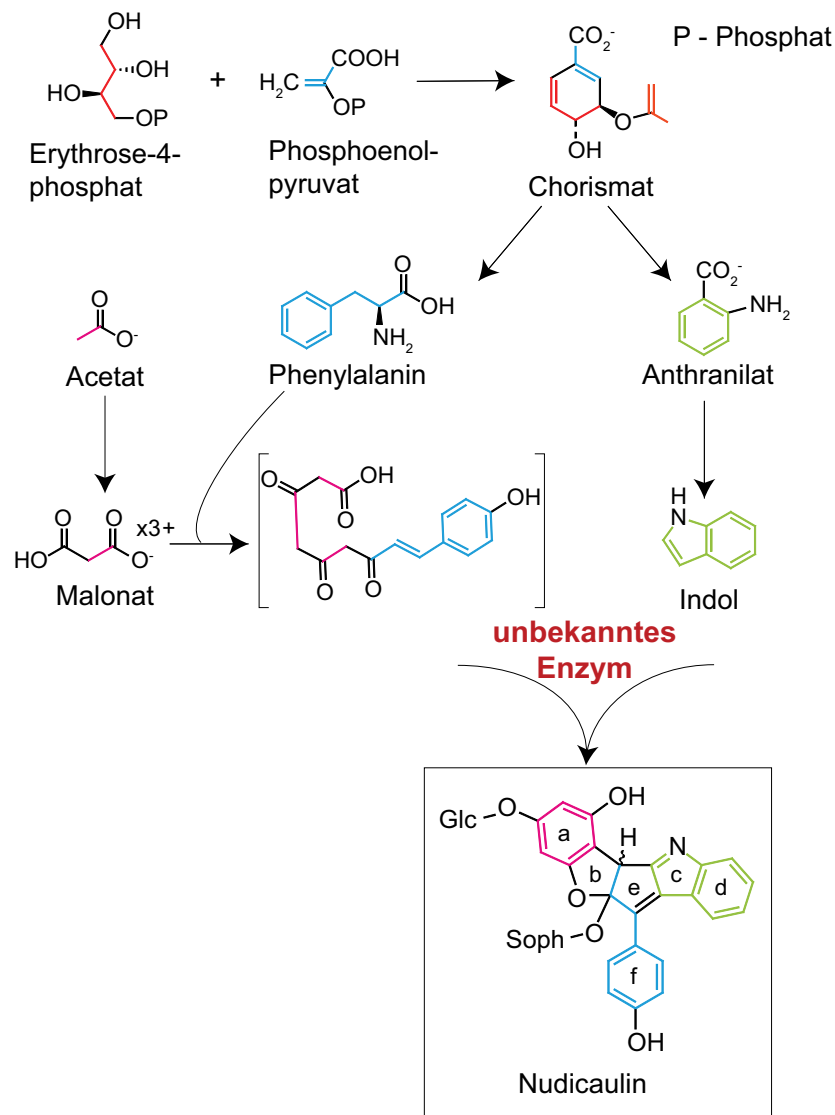


Abbildung 5.1: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markierten Intermediaten des Polyketid-, Phenylpropanoid- und Indolbiosyntheseweges (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)

Die unbekannt Metabolite besaßen das gleiche UV-Spektrum. Demnach war davon auszugehen, dass es sich um strukturell verwandte Verbindungen handelte. Mittels MS konnte gezeigt werden, dass die Massenspektren aller drei Verbindungen m/z 271 aufweisen, was dem Aglykon des Pelargonidins entspricht. Dieses Anthocyanidin war bereits 1939 im unreifen Blütenmaterial von gelb blühenden *P. nudicaule* nachgewiesen worden [11]. In den orangen Blüten von *P. nudicaule* tritt es neben den Nudicaulinen mit folgenden Substitutionen auf [57]:

- Pelargonidin-3-*O*- β -sophorosid-7-*O*- β -glucosid

- Pelargonidin-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -glucosid
- Pelargonidin-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob in gelben die gleichen Pelargonidinderivate vorkommen wie in orangen Blüten, erfolgte eine HPLC-DAD-Analyse mit Rohextrakten oranger Kronblätter und Proben von ES-3 sowie ES-4 der gelben Blüten. Anhand der übereinstimmenden Retentionszeiten und den zugehörigen UV-Spektren konnte geschlossen werden, dass tatsächlich die gleichen Anthocyane in beiden Kultivaren auftreten. Weiterhin fiel bei der Auswertung der LC-Profile der Entwicklungsstadien auf, dass die relative Intensität der Pelargonidinsignale bis ES-3 zunimmt, danach abfällt und im blühenden Stadium gänzlich fehlt. Damit ist das Auftreten dieser Verbindungen konträr zu dem der Nudicauline, die erst ab ES-4 detektiert werden. Es handelt sich also wahrscheinlich bei den Pelargonidinderivaten um die Vorstufen aus dem Flavonoidbiosyntheseweg, wie es in ähnlicher Weise in [14] vorgeschlagen wurde. Weiterhin zeigte sich, dass der letzte Schritt der Nudicaulinbildung zwischen ES-3 und ES-4 stattfindet. Es ist davon auszugehen, dass das Enzym bzw. die Enzyme, die diese Synthese katalysieren, in ES-4 exprimiert vorliegen. Entsprechende Experimente zur Proteom- und Transkriptomanalyse aller fünf Entwicklungsstadien wurden während dieser Arbeit begonnen, so dass nach ihrem Abschluss im Folgenden die gewonnenen Rohdaten für umfassende Auswertungen zur Verfügung stehen. Dabei bietet sich nicht nur die Möglichkeit, das unbekannte Enzymsystem aufzuklären, sondern auch die Korrelationen zwischen Metaboliten- und Enzymprofil sowie den entsprechenden transkribierten Genen in Abhängigkeit von der Blütenentwicklung ausführlich zu analysieren.

An die Einteilung der Blütenentwicklung bei den weiß und orange blühenden Kultivaren [120] schlossen sich die Analysen der Transkriptome an. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der gelben Blüten könnte Rückschlüsse auf die Regulierung des Biosynthesenetzwerks ermöglichen. Hierbei sollten insbesondere die Gemeinsamkeiten in der Biochemie der Nudicaulinbiosynthese in den gelb und orange blühenden Kultivaren untersucht werden, da in den orangen Blüten ebenfalls Pelargonidinderivate und Nudicauline nebeneinander vorliegen [57].

Die Duftprofilstudie der vier verschiedenfarbigen *P. nudicaule* Kultivare zeigte, dass sich die Bouquets nur aus vier bis fünf flüchtigen Verbindungen zusammensetzen. Be-

merkwürdig war das Auftreten von Indol, einer nachgewiesenen Vorstufe der Nudicaulinbiosynthese, im Duft der gelben und weißen Blüten. Dabei war der prozentuale Anteil im Bouquet des gelben Kultivars signifikant höher. Im Duftprofil der roten und orangen *P. nudicaule* Blüten fehlte das Indol hingegen völlig.

Dieses Ergebnis lässt die Überlegung zu, dass überschüssiges Indol nach der beendeten Nudicaulinbildung emittiert wird. Somit wäre hier das Vorhandensein der potentiellen Flavonoidvorstufen (beispielsweise der Pelargonidinderivate) der limitierende Faktor dieser Biosynthese. Im Gegensatz dazu spricht das Fehlen des Indols im Duftprofil der orangen Blüten dafür, dass durch diesen Mangel die Nudicaulinbildung gestoppt und die Pelargonidinderivate akkumuliert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die orange Blüte dem ES-4 des gelben Kultivars entspricht. Eine umfassende Auswertung aller Transkriptom- und Proteomdaten wird es ermöglichen, diese Hypothese weiter zu untersuchen. Für den Fall, dass die Pelargonidinderivate an der Nudicaulinbiosynthese unbeteiligt sein sollten, ergäbe sich die Frage nach ihrer Funktion in den sich entwickelnden Kronblättern der gelb blühenden *P. nudicaule* Pflanzen, da sie offenbar nicht zur Farbgebung in den gelben Blüten beitragen. Es ist nicht auszuschließen, dass der Farbwechsel während der Blütenbildung die Evolution des gelben Blütenfarbtons widerspiegelt. So könnte neben der weißen ursprünglich eine rot blühende Form existiert haben. Durch Mutation wäre ein Enzym entstanden, das die Nudicaulinbildung ermöglichte und so gelbe Blüten generierte. Diese könnten sich wiederum im zeitlichen Verlauf gegenüber der roten Form durchgesetzt haben, so dass sie nun als einzige natürliche Varietät von *P. nudicaule* neben der weißen auftreten. Durch Züchtung könnte die Mutation rückgängig gemacht und damit die ursprüngliche rote Farbe als Kulturform hervorgebracht worden sein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Zuge der Duftstudie war die Bedeutung des Dufts und seiner Kombination mit der Blütenfarbe für die ökologische Interaktion von *P. nudicaule* mit potentiellen Pollinatoren. Denn Bouquet und Färbung gehören zu den essentiellen Reizen für das Anlocken von Bestäubern [47], die oft Blütenfarben voneinander unterscheiden können [128]. Anhand der spektralen Reflexionsprofile der vier untersuchten *P. nudicaule* Kultivare wurde geschlossen, dass Honigbienen die Blütenfarben weiß, gelb und rot differenzieren können. Eine Unterscheidung zwischen rot und orange ist ihnen jedoch unmöglich. Auf Grundlage dieser Ergebnisse erfolgten Kon-

ditionierungsversuche mit freifliegenden Honigbienen und den künstlich nachgebildeten Bouquets der weißen, gelben und roten Blüten. Dabei landeten die Honigbienen etwa dreimal so häufig am zuvor erlernten Duft als bei dem neu hinzugekommenen Bouquet. Dieses Resultat verbesserte sich auf das Zehnfache, als zusätzlich zum Bouquet auch die zugehörige Farbe erlernt wurde. Daraus folgt, dass beide Reize einen großen Einfluss auf den Lerneffekt und somit auf das Bestäubungsverhalten von Pollinatoren wie Honigbienen nehmen können. Somit ergibt sich ein ökologischer Vorteil für die zuerst erlernte Duft- und Blütenfarbkombination einer *P. nudicaule* Varietät in einem natürlichen Habitat. Freilandversuche mit authentischen Populationen von verschiedenfarbigen *P. nudicaule* könnten im Folgenden Aufschluss darüber geben, wie groß der mögliche ökologische Vorteil ist. Weiterhin bleibt zu klären, wie sich die Zielfindung von Honigbienen ändert, wenn eine Konditionierung auf Duft und Blütenfarbe erfolgt, anschließend im Test jedoch nur einer dieser Reize für die Erkennung zur Verfügung steht.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Bouquets stammten ausschließlich aus siebenstündigen Duftsammlungen, die am Tag mit frisch geöffneten Blüten durchgeführt wurden. Die Analyse von möglichen tagesperiodischen Änderungen in der Duftzusammensetzung, wie beispielsweise bei Löwenmäulchen [45] und während der fünftägigen Blütezeit, sind interessante Fragestellungen für zukünftige Studien. Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob bei *P. nudicaule* die Duftemittierung signifikant abfällt, nachdem die Pollination erfolgte, wie es bei Petunien vorkommt [46]. Bei den genannten Ansatzpunkten sind insbesondere die Unterschiede in der Duftzusammensetzung der beiden nudicaulinhaltigen Kultivare (gelb und orange blühend) bezüglich des Indols als wichtige Vorstufe von Belang. Dabei ist zu vermuten, dass der Duft der gelben Blüte seinen Indolanteil über die Zeit schnell verliert, wenn es sich hierbei ausschließlich um einen Überschuss aus der Nudicaulinbiosynthese handelt und nicht um einen wichtigen Bestandteil zur ökologischen Interaktion mit Pollinatoren, der stetig neu synthetisiert wird.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die umfassende Analyse von Struktur, absoluter Konfiguration, Vorstufen sowie des zeitlichen Verlaufs der Biosynthese und die ökologische Bedeutung der Nudicauline eine essentielle Basis für weitere Untersuchungen zu *P. nudicaule* bilden. Dafür stehen die erarbeiteten und erprobten Protokolle zur

Durchführung von Fütterungsexperimenten, von Probennahmen der Entwicklungsstadien von gelben Blüten, von Protein- und RNA-Extraktionen aus dem Blütenmaterial sowie Duftsammlungen und Honigbienenkonditionierungsversuchen zur Verfügung.

Mit den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit wurde die vorausgegangene Hypothese (siehe Abschnitt 2.4.6) zum Verlauf der Nudicaulinbiosynthese überarbeitet. Sie ist zusammen mit potentiellen Enzymen, wie sie in anderen pflanzlichen Systemen nachgewiesen wurden, in Abbildung 5.2 dargestellt.

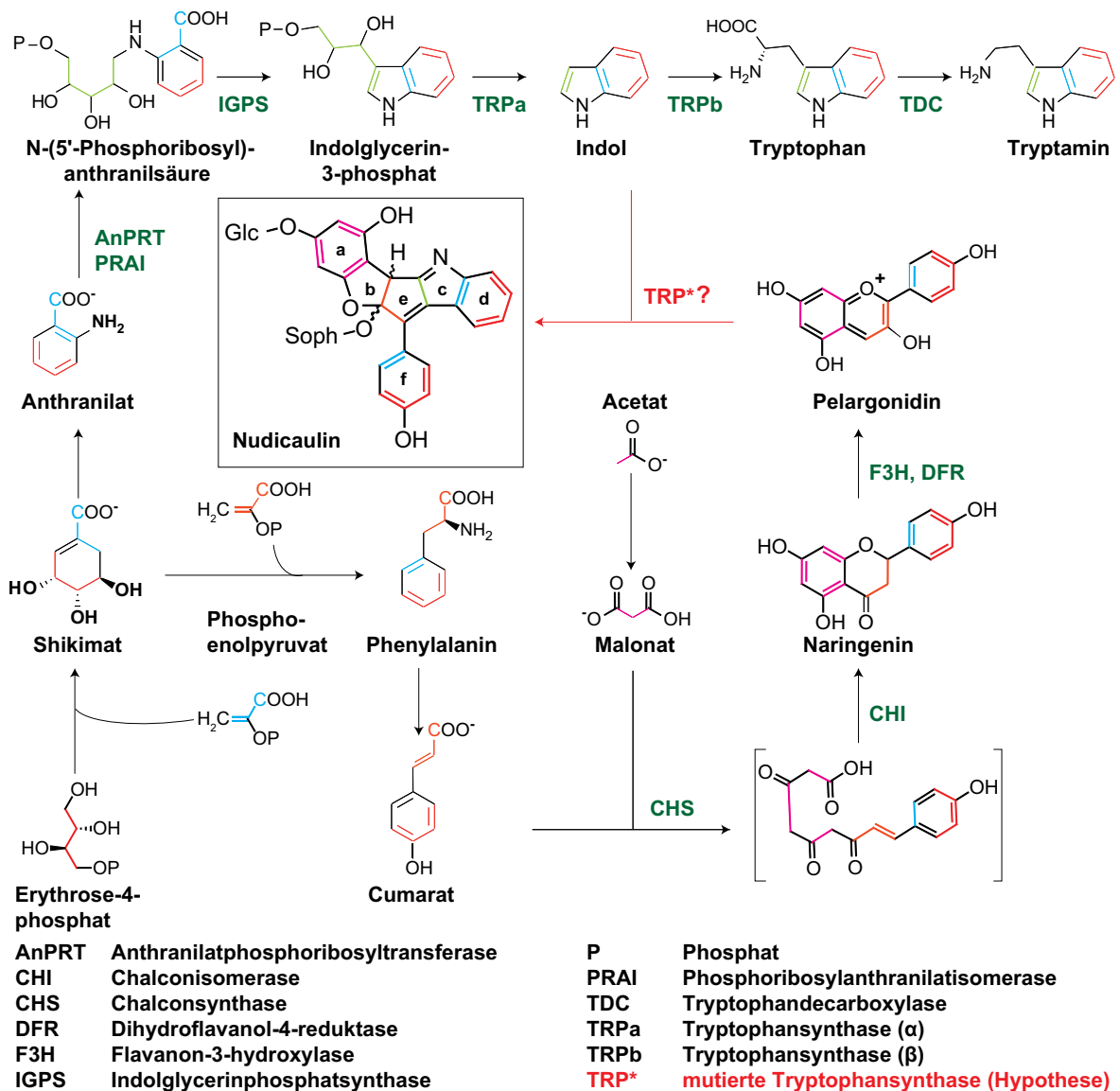


Abbildung 5.2: Überarbeitete Hypothese zum Verlauf der Nudicaulinbiosynthese mit den möglichen finalen Vorstufen Indol und Pelargonidin (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)

Die Bildung der Nudicauline könnte durch eine Nudicaulinsynthase katalysiert wer-

den, welche beispielsweise von einer mutierten Tryptophansynthase abstammt. Um diese Vermutung zu bestätigen, können die Daten aus den Transkriptom- und Proteomanalysen zu den Entwicklungsstadien der gelb, weiß und orange blühenden Kultivare herangezogen werden. Deren Auswertung wird umfassende Einblicke in das Biosynthesenetzwerk der *P. nudicaule* Blüten geben sowie zu allen Enzymen, die an der außergewöhnlichen Nudicaulinbildung beteiligt sind.

Die ausstehende Identifizierung der vorgeschlagenen naringeninartigen Vorstufe bzw. die Bestätigung, dass es sich hierbei um die detektierten Pelargonidinderivate handelt, wird es ermöglichen, Enzymassays mit Indol und dem isolierten und gereinigten Enzym (Nudicaulinsynthase) durchzuführen. Dieses Enzym wird vermutlich im ES-3 oder ES-4 der gelben *P. nudicaule* Blüten zu finden sein. Mit Hilfe von Enzymassays kann dann einwandfrei bewiesen werden, dass dieses Enzym die Bildung der beiden Nudicaulindiastereomere aus Indol und der anderen ermittelten Vorstufe katalysiert. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass zumindest eine Glucoseeinheit an C-11 der Zielmoleküle notwendig ist, um einen Zerfall zu verhindern. Aus diesem Grund sollte zum Beispiel kein Aglykon, sondern eher eine bereits glucosylierte Vorstufe eingesetzt werden, die in der Biosynthese eine Rolle spielt.

Weitere Untersuchungen zur Bioaktivität und den chemischen Eigenschaften der Nudicauline oder ihrer Synthesederivate (beispielsweise der Monoglucoside) könnten zudem zeigen, ob sie sich zum Einsatz in der Pharmazie, der Lebensmittelproduktion, der chemischen Industrie oder als Farbstoffe bzw. Färbemittel eignen. Aus ökonomischer Sicht bestünde in diesem Fall dringender Forschungsbedarf zu ihrer Totalsynthese.

Viele der vorgestellten offenen Fragestellungen bilden jetzt zentrale Punkte in einem nachfolgenden Forschungsprojekt und einer weiteren Doktorarbeit, so dass auf Grundlage der vorliegenden Arbeit weitere wichtige Erkenntnisse zur Biosynthese und Bedeutung der außergewöhnlichen Nudicauline aus *P. nudicaule* in Aussicht stehen.

Literaturverzeichnis

- [1] Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: *Lexikon der Biologie - MOHN*. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/mohn/43490>. – [Onlinezugriff November 2014]
- [2] Hanson, James R.: *Natural products: the secondary metabolites*. Bd. 17. Royal Society of Chemistry, 2003
- [3] Newman, David J.; Cragg, Gordon M. ; Snader, Kenneth M.: The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17 (2000), 3, 215–234
- [4] Grotewold, Erich: The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57 (2006), 761–780
- [5] Harborne, Jeffrey B.; Williams, Christine A.: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (2000), 6, 481–504
- [6] Stintzing, Florian C.; Carle, Reinhold: Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 15 (2004), 1, 19–38
- [7] Patra, Barunava; Schluttenhofer, Craig; Wu, Yongmei; Pattanaik, Sitakanta ; Yuan, Ling: Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829 (2013), 11, 1236–1247
- [8] Kayser, Oliver; Aversch, Nils: *Technische Biochemie: Die Biochemie und industrielle Nutzung von Naturstoffen*. Springer-Verlag, 2015
- [9] Breitmaier, Eberhard; Jung, Günther: *Organische Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2005
- [10] Australian Academy of Science: *BIOGRAPHICAL MEMOIRS - James Robert Price, 1912-1999*. <http://sciencearchive.org.au/fellows/memoirs/price.html>. – [Onlinezugriff Oktober 2014]

-
- [11] Price, JR; Robinson, Robert ; Scott-Moncrieff, R: 311. The yellow pigment of *Papaver nudicaule*. Part I. *Journal of the Chemical Society* (1939), 1465–1468
- [12] Harborne, J.B.: Plant polyphenols-XV: Flavonols as yellow flower pigments. *Phytochemistry* 4 (1965), 5, 647–657
- [13] Schliemann, Willibald; Schneider, Bernd; Wray, Victor; Schmidt, Jürgen; Nimtz, Manfred; Porzel, Andrea ; Böhm, Hartmut: Flavonols and an indole alkaloid skeleton bearing identical acylated glycosidic groups from yellow petals of *Papaver nudicaule*. *Phytochemistry* 67 (2006), 2, 191–201
- [14] Tatsis, Evangelos C.; Eylert, Eva; Maddula, Ravi K.; Ostrozhenkova, Elena; Svatoš, Aleš; Eisenreich, Wolfgang ; Schneider, Bernd: Biosynthesis of nudicaulins: A $^{13}\text{CO}_2$ -Pulse/Chase Labeling Study with *Papaver nudicaule*. *ChemBioChem* 15 (2014), 11, 1645–1650
- [15] Tatsis, Evangelos C.; Schaumlöffel, Anu; Warskulat, Anne C.; Massiot, Georges; Schneider, Bernd ; Bringmann, Gerhard: Nudicaulins, Yellow Flower Pigments of *Papaver nudicaule*: Revised Constitution and Assignment of Absolute Configuration. *Organic Letters* 15 (2013), 1, 156–159
- [16] Hegnauer, Robert: Papaveraceae. In: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Springer, 1969, 264–293
- [17] Lauber, Konrad; Wagner, Gerhard: *Flora Helvetica*. 2. Bern : Haupt, 1998
- [18] Fabergé, A.C.: Genetics of the Scapiflora Section of Papaver 1. The Garden Iceland Poppy. *Journal of Genetics* 44 (1942), 2-3, 169–193
- [19] Wind, Olaf; Christensen, Søren B. ; Mølgaard, Per: Colouring agents in yellow and white flowered *Papaver radicatum* in Northern Greenland. *Biochemical Systematics and Ecology* 26 (1998), 7, 771–779
- [20] Hanelt, Peter: Die Typisierung von *Papaver nudicaule* L. und die Einordnung von *P. nudicaule* hort. non L. *Die Kulturpflanze* 18 (1970), 1, 73–88
- [21] Agricultural Research Service: *GRIN Taxonomie der Pflanzen*. http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl. – [Onlinezugriff Juni 2014]

- [22] Meehan, M; Klett, James E. ; Cox, Robert A.: *Herbaceous Perennials - Fact Sheet No. 7.405*. Colorado State University Extension, 2012
- [23] Garibaldi, A; Martini, P; Repetto, L; Odasso, M; Bertetti, D; Poli, A ; Gullino, ML: First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt on Iceland poppy (*Papaver nudicaule*) in Italy. *Plant Disease* 96 (2012), 12, 1823–1823
- [24] Bertetti, Domenico; Ortu, Giuseppe; Gullino, MariaLodovica ; Garibaldi, Angelo: Contamination of seeds of Iceland poppy (*Papaver nudicaule* L.) by *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* (2014), 1–8
- [25] Yang, Jing L.; Zhao, Bo; Seong, Eun S.; Kim, Myong J.; Kang, Won H.; Kim, Na Y.; Yu, Chang Y. ; Li, Cheng H.: Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L., an ornamental medicinal plant. *Plant Biotechnology Reports* 4 (2010), 4, 261–267
- [26] Sher, Zaman; Khan, Z ; Hussain, Farrukh: Ethnobotanical studies of some plants of Chagharzai valley, district Buner, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 43 (2011), 3, 1445–1452
- [27] Zaman, Sher; Farrukh, Hussain ; Muhammad, Ibrar: Traditional knowledge on plant resources of Ashezai and Salarzai Valleys, District Buner, Pakistan. *African Journal of Plant Science* 8 (2014), 1, 42–53
- [28] Cui, Jian; Zhu, Dan; Liu, Tongxiang; Pang, Zongran; Li, Shuchun ; Pei, Lingpeng: *Method for manufacturing traditional Mongolian medicine preparation from *Papaver nudicaule* and *Artemisia frigida* for treating ulcerative colitis*. Version: 02 2013. <http://www.google.com/patents/CN102920789A>
- [29] The Royal Horticultural Society: *DuMont's Grosse Pflanzen Enzyklopädie*. Bd. 2. DuMont, 1998
- [30] Cooper-Driver, Gillian A.: Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56 (2001), 3, 229–236
- [31] Ohmiya, Akemi: Diversity of carotenoid composition in flower petals. *Japan Agricultural Research Quarterly* 45 (2011), 2, 163–171

- [32] Castañeda-Ovando, Araceli; Pacheco-Hernández, Ma de L.; Páez-Hernández, Ma E.; Rodríguez, José A ; Galán-Vidal, Carlos A.: Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113 (2009), 4, 859–871
- [33] Dawson, Timothy L.: Biosynthesis and synthesis of natural colours. *Coloration Technology* 125 (2009), 2, 61–73
- [34] Zhang, Yang; Butelli, Eugenio ; Martin, Cathie: Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 19 (2014), 81–90
- [35] Zvi, Michal Moyal B.; Negre-Zakharov, Florence; Masci, Tania; Ovadis, Mariana; Shklarman, Elena; Ben-Meir, Hagit; Tzfira, Tzvi; Dudareva, Natalia ; Vainstein, Alexander: Interlinking showy traits: co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnology Journal* 6 (2008), 4, 403–415
- [36] Brown, Kathryn: Something to sniff at: Unbottling floral scent. *Science* 296 (2002), 5577, 2327–2329
- [37] Halitschke, Rayko; Stenberg, Johan A.; Kessler, Danny; Kessler, André ; Baldwin, Ian T.: Shared signals—'alarm calls' from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecology Letters* 11 (2008), 1, 24–34
- [38] Ibanez, Sébastien; Dötterl, Stefan; Anstett, Marie-Charlotte; Baudino, Sylvie; Caissard, Jean-Claude; Gallet, Christiane ; Després, Laurence: The role of volatile organic compounds, morphology and pigments of globe-flowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytologist* 188 (2010), 2, 451–463
- [39] Dobson, Heidi E.; Groth, Inga ; Bergstrom, Gunnar: Pollen advertisement: chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *American Journal of Botany* (1996), 7, 877–885
- [40] Van Moerkercke, Alex; Galván-Ampudia, Carlos S.; Verdonk, Julian C.; Haring, Michel A. ; Schuurink, Robert C.: Regulators of floral fragrance production and their target genes in petunia are not exclusively active in the epidermal cells of petals. *Journal of Experimental Botany* 63 (2012), 8, 3157–3171
- [41] Cronk, Quentin; Ojeda, Isidro: Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany* 59 (2008), 4, 715–727

- [42] Kevan, Peter G.: Insect pollination of high arctic flowers. *The Journal of Ecology* 60 (1972), 3, 831–847
- [43] Dormont, L; Delle-Vedove, R; Bessi re, J-M ; Schatz, B: Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry* 100 (2014), 51–59
- [44] Majetic, Cassie J.; Raguso, Robert A. ; Ashman, Tia-Lynn: The impact of biochemistry vs. population membership on floral scent profiles in colour polymorphic *Hesperis matronalis*. *Annals of Botany* 102 (2008), 6, 911–922
- [45] Kolosova, Natalia; Gorenstein, Nina; Kish, Christine M. ; Dudareva, Natalia: Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant Cell Online* 13 (2001), 10, 2333–2347
- [46] Negre, Florence; Kish, Christine M.; Boatright, Jennifer; Underwood, Beverly; Shibuya, Kenichi; Wagner, Conrad; Clark, David G. ; Dudareva, Natalia: Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *The Plant Cell Online* 15 (2003), 12, 2992–3006
- [47] Zuker, Amir; Tzfira, Tzvi; Ben-Meir, Hagit; Ovadis, Marianna; Shklarman, Elena; Itzhaki, Hanan; Forkmann, Gert; Martens, Stefan; Neta-Sharir, Inbal; Weiss, David ; others: Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding* 9 (2002), 1, 33–41
- [48] Knudsen, Jette T.; St hl, Bertil: Floral odours in the Theophrastaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 22 (1994), 3, 259–268
- [49] Pichersky, Eran; Dudareva, Natalia: Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell. *Trends in Biotechnology* 25 (2007), 3, 105–110
- [50] Robinson, Gertrude M.; Robinson, Robert: A survey of anthocyanins. I. *Biochemical Journal* 25 (1931), 5, 1687
- [51] Robinson, Gertrude M.; Robinson, Robert: A survey of anthocyanins. II. *Biochemical Journal* 26 (1932), 5, 1647
- [52] Lawrence, William John C.; Price, James R.; Robinson, Gertrude M. ; Robinson, Robert: The distribution of anthocyanins in flowers, fruits and leaves. *Philoso-*

- phical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 230 (1939), 567, 149–178
- [53] Acheson, R.M.; Jenkins, C.L.; Harper, John L. ; McNaughton, I.H.: Floral pigments in *Papaver* and their significance in the systematics of the genus. *New Phytologist* 61 (1962), 3, 256–260
- [54] Harborne, JB: Gossypetin and herbacetin as taxonomic markers in higher plants. *Phytochemistry* 8 (1969), 1, 177–183
- [55] Tétényi, P.: Chemodifferentiation of Papavereae from Coasts of the Black-Sea to the Atlantic. In: *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*. Springer, 2002, 173–181
- [56] Cornuz, Georges; Wyler, Hugo ; Lauterwein, Jürgen: Pelargonidin 3-malonylsophoroside from the red Iceland poppy, *Papaver nudicaule*. *Phytochemistry* 20 (1981), 6, 1461–1462
- [57] Tatsis, Evangelos C.; Böhm, Hartmut ; Schneider, Bernd: Occurrence of nudicaulin structural variants in flowers of papaveraceous species. *Phytochemistry* 92 (2013), 105–112
- [58] Preininger, V.: Chemotaxonomy of the Papaveraceae Alkaloids. In: *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer, 1985, 23–37
- [59] Preininger, V.: Chapter 1 Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. In: Brossi, Arnold (Hrsg.): *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* Bd. 29. Academic Press, 1986, 1 – 98
- [60] Istatkova, Ralitsa; Philipov, Stefan; Yadamsurenghiin, Gerelt-Od; Samdan, Javzan ; Dangaa, Selenge: Alkaloids from *Papaver nudicaule* L. *Natural Product Research* 22 (2008), 7, 607–611
- [61] Ahmed, Zaheer; Ali, Dildar ; Malik, Abdul: Structure determination of ursene-type triterpenes by NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (2006), 7, 717–719

- [62] Hardick, David J.; Blagbrough, Ian S.; Cooper, Gary; Potter, Barry V.; Critchley, Trevor ; Wonnacott, Susan: Nudicauline and Elatine as Potent Norditerpenoid Ligands at Rat Neuronal α -Bungarotoxin Binding Sites: Importance of the 2-(Methylsuccinimido)benzoyl Moiety for Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Binding. *Journal of Medicinal Chemistry* 39 (1996), 24, 4860–4866
- [63] Zhou, J.; Xie, G. ; Yan, X.: *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications: Vol. 4: Isolated Compounds N-S*. Springer, 2011 (Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines: Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications). <http://books.google.de/books?id=VPjcIdkqStAC>
- [64] Müller-Esterl, Werner: *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Spektrum Verlag, 2009
- [65] Wasinger, Valerie C.; Cordwell, Stuart J.; Cerpa-Poljak, Anne; Yan, Jun X.; Gooley, Andrew A.; Wilkins, Marc R.; Duncan, Mark W.; Harris, Ray; Williams, Keith L. ; Humphery-Smith, Ian: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* 16 (1995), 1, 1090–1094
- [66] Ephritikhine, Geneviève; Ferro, Myriam ; Rolland, Norbert: Plant membrane proteomics. *Plant physiology and biochemistry* 42 (2004), 12, 943–962
- [67] Winkel, Brenda S.: Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55 (2004), 85–107
- [68] Hanson, James R.: *The organic chemistry of isotopic labelling*. Royal Society of Chemistry, 2011
- [69] Selcia Ltd.: ¹⁴C Custom Radiosynthesis Radiolabelled API for Clinical Trials GLP Analytics Metabolite Synthesis. http://www.selcia.com/sites/default/files/RADIOLABELLING_FLYER_Web.pdf. – [Onlinezugriff Oktober 2014]
- [70] Schneider, Bernd: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in biosynthetic studies. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 51 (2007), 3, 155–198

- [71] Staunton, David; Schlinkert, Robin; Zanetti, Giulia; Colebrook, Simon A. ; Campbell, Iain D.: Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (2006), S1, S2–S9
- [72] Sobhanifar, Solmaz; Reckel, Sina; Junge, Friederike; Schwarz, Daniel; Kai, Lei; Karbyshev, Mikhail; L/öhr, Frank; Bernhard, Frank ; Dötsch, Volker: Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. *Journal of Biomolecular NMR* 46 (2010), 1, 33–43
- [73] Knaggs, Andrew R.: The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports* 20 (2003), 1, 119–136
- [74] Schwender, Jörg: Isotopic steady-state flux analysis. In: *Plant metabolic networks*. Springer, 2009, 245–284
- [75] Eisenreich, Wolfgang; Strauss, Gerhard; Werz, Udo; Fuchs, Georg ; Bacher, Adelbert: Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *European Journal of Biochemistry* 215 (1993), 3, 619–632
- [76] Glawischnig, Erich; Gierl, Alfons; Tomas, Adriana; Bacher, Adelbert ; Eisenreich, Wolfgang: Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of amino acid biosynthesis and intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize kernels. *Plant Physiology* 125 (2001), 3, 1178–1186
- [77] Dayan, Franck E.; Kagan, Isabelle A. ; Rimando, Agnes M.: Elucidation of the biosynthetic pathway of the allelochemical sorgoleone using retrobiosynthetic NMR analysis. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), 31, 28607–28611
- [78] Max Planck Institute for Chemical Ecology: *Biosynthesis and Function of Volatiles in Woody Plants and Grasses*. <https://ice.mpg.de/ext/729.html>. – [Onlinezugriff Mai 2015]
- [79] Max Planck Institute for Chemical Ecology: *iDiv MPI-CE Biodiversity Project Group/Ecological Functions of Plant Secondary Metabolites*. <https://ice.mpg.de/ext/itb-groups.html>. – [Onlinezugriff Mai 2015]

- [80] Technische Universität Braunschweig: *Enzyme Database - BRENDA*. <http://www.brenda-enzymes.org>. – [Onlinezugriff Oktober 2014]
- [81] Kyoto University Bioinformatics Center: *GenomeNet*. <http://www.genome.jp/>. – [Onlinezugriff Oktober 2014]
- [82] Mikkelsen, Susan R.; Corton, Eduardo: *Bioanalytical Chemistry*. mikkelsen2004bioanalytic Wiley Sons, Inc., 2004
- [83] School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>. – [Onlinezugriff März 2015]
- [84] Richter, Gerhard: *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, 1996
- [85] Yoo, Heejin; Widhalm, Joshua R.; Qian, Yichun; Maeda, Hiroshi; Cooper, Bruce R.; Jannasch, Amber S.; Gonda, Itay; Lewinsohn, Efraim; Rhodes, David ; Dudareva, Natalia: An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. *Nature Communications* 4 (2013)
- [86] Jørgensen, Kirsten; Rasmussen, Anne V.; Morant, Marc; Nielsen, Allan H.; Bjarnholt, Nanna; Zagrobelny, Mika; Bak, Søren ; Møller, Birger L.: Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (2005), 3, 280–291
- [87] Burbulis, Ian E.; Winkel-Shirley, Brenda: Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), 22, 12929–12934
- [88] Vogt, Thomas: Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3 (2010), 1, 2–20
- [89] Tanaka, Yoshikazu: Flower colour and cytochromes P450. *Phytochemistry Reviews* 5 (2006), 2-3, 283–291
- [90] Atkins, PW: *Physikalische Chemie; 3. korr. Auflage*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2001
- [91] Haken, Hermann; Wolf, Hans C.: *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer-Verlag, 2002

- [92] Friebolin, Horst: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2013
- [93] Reichenbacher, Manfred; Popp, Jürgen: *Challenges in molecular structure determination*. Springer, 2012
- [94] Butler, Eamonn: *AVANCE - Beginners Guide Version 003*. <https://www.auburn.edu/cosam/departments/chemistry/facilities/documents/Bruker.pdf>. – [Onlinezugriff März 2012]
- [95] Kromidas, Stavros: *Handbuch Validierung in der Analytik*. John Wiley & Sons, 2000
- [96] Wedler, Gerd; Freund, Hans-Joachim: *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. Bd. 1. John Wiley & Sons, 1997
- [97] Schwedt, Georg: *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*. Wiley-VCH, 2008
- [98] Breitmaier, Eberhard: *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*. John Wiley & Sons, 2005
- [99] Doerffel, Klaus; Geyer, R: *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1994
- [100] Meusinger, R: *NMR-Spektren richtig ausgewertet: 100 Übungen für Studium und Beruf/Reinhard Meusinger*. 2010
- [101] Herzog, Wolf-Dietrich; Messerschmidt, Michael: *NMR-Spektroskopie für Anwender*. VCH, 1995
- [102] Duddeck, Helmut; Dietrich, Wolfgang ; Tóth, Gábor: *Structure elucidation by modern NMR: a workbook*. Steinkopff, 1998
- [103] Simpson, Jeffrey H.: *Organic structure determination using 2D-NMR spectroscopy: a problem-based approach*. Academic Press, 2011
- [104] Cammann, Karl: *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum-Verlag Heidelberg, 2001
- [105] Schwedt, Georg: *Taschenatlas der Analytik*. Wiley-VCH, 2007

- [106] IUPAC Gold Book: *Isotopomer*. <http://goldbook.iupac.org/I03352.html>. – [Onlinezugriff Mai 2015]
- [107] IUPAC Gold Book: *Isotopologue*. <http://goldbook.iupac.org/I03351.html>. – [Onlinezugriff Mai 2015]
- [108] Allen, DK; Ratcliffe, RG: Quantification of isotope label. In: *Plant metabolic networks*. Springer, 2009, 105–149
- [109] Gillmaier, Nadine: *Interaktion zwischen Metabolismus und Virulenz pathogener Bakterien*. – [Dissertation, 2012]
- [110] Backhaus, Klaus; Erichson, Bernd; Plinke, Wulff ; Weiber, Rolf: *Multivariate Analysemethoden*. Springer, 2000
- [111] Zwanziger, Heinz W.; Einax, Jürgen W ; Geiß, Sabine: *Chemometrics in environmental analysis*. Wiley-VCH Verlag, 1997
- [112] Eckey, Hans F.; Kosfeld, Reinhold ; Rengers, Martina: *Multivariate Statistik*. Springer, 2002
- [113] Danzer, Klaus; Hobert, H; Fischbacher, C ; Jagemann, K-U: *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*. Springer, 2001
- [114] Pruscha, Helmut: *Statistisches Methodenbuch*. Springer, 2006
- [115] Henrion, René; Henrion, G: *Multivariate Datenanalyse*. Springer, 1995
- [116] Tauler, Romà; Walczak, Beata ; Brown, Steven D.: *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*. Elsevier, 2009
- [117] Beckert, H; Fanghänel, E; Habicher, WD; Metz, P; Pavel, D ; Schwetlick, K: *Organikum, 22. Auflage*. Wiley-VCH, 2004
- [118] Rhodium: *Synthesis of tryptamine from tryptophan*. <https://www.erowid.org/archive/rhodium/chemistry/tryptophan.html>. – [Onlinezugriff April 2011]
- [119] Kleber, Hans-Peter; Schlee, Dieter ; Schöpp, Wulfdieter: *Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung*. Bd. 5. G. Fischer, 1999

- [120] Dudek, Bettina: *Optimierung der Nudicaulinisolation aus gelben Papaver nudicaule-Blüten und Entwicklungsstudie der Knospen der weißen und orangen Varietät.* – [Projektbericht, 2014]
- [121] Faurobert, Mireille; Pelpoir, Esther ; Chaïb, Jamila: Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. In: *Plant Proteomics*. Springer, 2007, 9–14
- [122] Bradford, Marion M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976), 1, 248–254
- [123] Wartenberg, Dirk; Vödisch, Martin; Kniemeyer, Olaf; Albrecht-Eckardt, Daniela; Scherlach, Kirstin; Winkler, Robert; Weide, Mirko ; Brakhage, Axel A.: Proteome analysis of the farnesol-induced stress response in *Aspergillus nidulans* - The role of a putative dehydrin. *Journal of Proteomics* 75 (2012), 13, 4038–4049
- [124] Reichenbächer, Manfred; Einax, Jürgen W: *Challenges in analytical quality assurance*. Springer Science & Business Media, 2011
- [125] Dudek, Bettina: *Isolationsoptimierung und Quantifizierung von Nudicaulinen aus gelben Papaver nudicaule-Blüten.* – [Projektbericht, 2014]
- [126] Dudek, Bettina: *Untersuchungen zu Metabolitenprofil und Farbentstehung in gelben Papaver nudicaule-Blüten.* – [Masterarbeit, Mai 2015]
- [127] Glenn, Weslee S.; Nims, Ezekiel ; O’Connor, Sarah E.: Reengineering a tryptophan halogenase to preferentially chlorinate a direct alkaloid precursor. *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011), 48, 19346–19349
- [128] Briscoe, Adriana D.; Chittka, Lars: The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology* 46 (2001), 1, 471–510
- [129] Hertweck, Christian: Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angewandte Chemie* 121 (2009), 26, 4782–4811

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aglykonstruktur von Gossypetin- und Kämpferolderivaten	4
2.2	Die vier unterschiedlichen Blütenfarben der untersuchten Kultivare von <i>P. nudicaule</i>	5
2.3	Strukturbeispiele für die häufigsten Blütenfarbstoffklassen: Lutein (Carotenoid), Pelargonidin (Flavonoid) und Miraxanthin V (Betalain) . . .	6
2.4	Aglykonstrukturen der häufigsten Anthocyane	7
2.5	Abhängigkeit der Anthocyanidinstruktur vom pH-Wert nach [34] . . .	8
2.6	Strukturvorschlag für das Nudicaulinaglykon nach [13]	14
2.7	Nudicaulin A und B aus <i>Launaea nudicaulis</i>	16
2.8	Nudicauline aus <i>Delphinium</i>	16
2.9	Nudicaulin aus <i>P. nudicaule</i> var. <i>chinense</i>	16
2.10	Bildung von Shikimisäure ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat nach [73] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)	23
2.11	Indolbiosyntheseweg ausgehend von Chorismat nach [84] (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)	24
2.12	Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanine aus Chorismat nach [81, 84] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)	25
2.13	Darstellung von Zimtsäure-CoA und <i>p</i> -Cumaroyl-CoA ausgehend von Tyrosin bzw. Phenylalanine nach [81] (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)	26
2.14	Umsetzung von <i>p</i> -Cumaroyl- und Malonyl-CoA zu Dihydrokämpferol nach [84, 81] (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)	27
2.15	Biosynthese von Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin und Kämpferol aus Dihydrokämpferol nach [81] (Kohlenstoffatome in der gleichen Farbe haben denselben biosynthetischen Ursprung)	28

2.16	Zusammenhang zwischen dem Ursprung der einzelnen Kohlenstoffverbände (gleiche Farbmarkierung) im Nudicaulinaglykon sowie den Biosynthesewegen zur Bildung von Indol und Flavonoiden aus der ^{13}C -Studie in Anlehnung an [14]	29
2.17	Beispiel für das Isotopenprofil im Massenspektrum einer C_3 -Einheit nach [108]	40
2.18	Signale der Isotopomere im NMR-Spektrum einer C_3 -Einheit nach [108]	40
2.19	Vergleich der Isotopenprofile eines Metaboliten natürlichen Ursprungs (grau) und aus einem Fütterungsexperiment (FE, rot) in Anlehnung an [108]	41
2.20	NMR-Signale aus den Isotopologen eines Fütterungsexperiments mit Mehrfachmarkierung in Anlehnung an [108]	43
2.21	Berechnung der absoluten ^{13}C -Häufigkeit und der ^{13}C - ^{13}C -Anreicherung an einer Position des Zielmoleküls anhand der Signalintegrale im NMR-Spektrum des Fütterungsexperiments (links) und der Referenz (rechts)	44
3.1	Schema Fütterungsexperimente	52
3.2	Trennungsgang zur Nudicaulinisolation modifiziert nach [15]	53
4.1	Strukturvorschlag 2006 (links) nach [13] und revidierte Struktur der Nudicauline (rechts) nach [15]	65
4.2	Schematische Darstellung der HMBC-Korrelationen von H-3 im Spektrum von Nudicaulin I (aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$)	66
4.3	Schematische Darstellung der Korrelationen von H-3 (links) in Anlehnung an [15] und H-12 (rechts) im HMBC-Spektrum von Dihydronudicaulin I (aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$)	67
4.4	Schematische Darstellung der HMBC-Korrelationen der eingeführten Methylprotonen im Spektrum vom methylierten Nudicaulin I (aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$) nach [15]	69
4.5	Schematische Darstellung der ROESY-Korrelationen im Spektrum von Nudicaulin I (links) und II (rechts) (aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$) nach [15]	70

4.6	Experimentell ermittelte CD-Spektren der Monoglucoside von Nudicaulin I und II im Vergleich zu den berechneten CD-Spektren der Aglykone von Nudicaulin I und II sowie die Zuordnungen der absoluten Konfiguration in den Aglykonen nach [15]	71
4.7	Absolute Konfiguration von Nudicaulin I und II nach [15]	71
4.8	Isotopologenprofile und berechnete prozentuale ^{13}C -Anreicherungen für Nudicaulin I der $^{13}\text{CO}_2$ -Studie (links, vereinfacht nach [14]) und aus dem FE mit $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glucose (rechts) (gleichfarbige Balken symbolisieren denselben biosynthetischen Ursprung)	74
4.9	FE mit universal ^{13}C -markiertem Phenylalanin: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-11) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (blau)	76
4.10	FE mit [2- ^{13}C]Tyrosin: Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (blau)	78
4.11	FE mit universal markiertem Acetat: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-7 & C-9) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (orange)	79
4.12	FE mit [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure: ^{13}C -NMR-Spektrum (Ausschnitt für C-14, C-16 bis C-18) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkiertem Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (grün)	80
4.13	FE mit [2- ^{13}C]Indol: ^{13}C -NMR-Spektrum (^{13}C -Markierung in C-2) und Säulendiagramm aus dem Isotopenprofil von unmarkierten Nudicaulin I (grau) und dem ^{13}C -Überschuss im Nudicaulin I aus dem FE (grün) .	82
4.14	Die unterschiedlichen Farben der Blütenblätter während ihrer Entwicklung in den geschlossenen Knospen von gelb blühenden <i>P. nudicaule</i> .	84
4.15	Dendrogramm der Clusteranalyse zur Einteilung von Entwicklungsstadien für verschieden farbiges Blütenmaterial aus noch geschlossenen Knospen von gelb blühenden <i>P. nudicaule</i>	86

4.16	Darstellung von Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 2 (links) und Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 3 (rechts)	87
4.17	Darstellung von Diskriminanzfunktion 1 gegen Diskriminanzfunktion 2 und Diskriminanzfunktion 3	88
4.18	Rohextraktchromatogramme aus der HPLC-DAD-Analyse von ES-1 bis ES-5 des gelb blühenden <i>P. nudicaule</i> bei einer Wellenlänge von 460 nm	89
4.19	Vergleich der UV-Spektren aus der HPLC-DAD-Analyse von den Pelargonidinderivaten in ES-3 der gelben <i>P. nudicaule</i> Blüten (links) und dem unsubstituierten Pelargonidin (Referenz, rechts)	90
4.20	Chromatogramme bei 254 nm aus der HPLC-DAD-Analyse der Nudicaulinfraktionen von ES-1 bis ES-5	91
4.21	Totalionenchromatogramme aus der GC-MS-Analyse der Duftprofile für die vier <i>P. nudicaule</i> Kultivare im blühenden Stadium	94
4.22	Darstellung der Hauptkomponente 1 gegen 2 für die Duftprobennahmen der vier <i>P. nudicaule</i> Blütenfarben	96
4.23	Vergleich der spektralen Reflexionen (links) der vier <i>P. nudicaule</i> Blütenfarben (aufgenommen von Kooperationspartner Dr. Jaime Martinez-Harms, MPI für chemische Ökologie) und Farbwahrnehmung von Honigbienen nach [128] (rechts)	98
4.24	Vergleich der Landungszahlen der Honigbienen auf den Emissionsquellen des konditionierten Dufts des gelben Kultivars und der im Test hinzugefügten Bouquets von roten bzw. weißen Blüten (links) und Vergleich der Landungszahlen der Honigbienen bei Konditionierung auf Duft und Farbe der gelben Blüten im Test gegen Duft und Farbe der weißen Blüte (rechts)	99
5.1	Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Fütterungsexperimenten mit ¹³ C-markierten Intermediaten des Polyketid-, Phenylpropanoid- und Indolbiosyntheseweges (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)	105
5.2	Überarbeitete Hypothese zum Verlauf der Nudicaulinbiosynthese mit den möglichen finalen Vorstufen Indol und Pelargonidin (gleichfarbige Kohlenstoffatome haben denselben biosynthetischen Ursprung)	109

Tabellenverzeichnis

2.1	Hauptmerkmale, Verteilung und Beispiele der häufigsten Farbstoffklassen	7
2.2	Inhaltsstoffe in offenen <i>P. nudicaule</i> Blüten nach [57], Aufschlüsselung der Strukturen im Anhang A	13
2.3	Intensitätsverhältnis und Multiplizität bei $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplung mit einer Kernsorte in Anlehnung an [100]	34
3.1	Probenzusammensetzung und Farbstoffmarkierung der 2D-DIGE-Gele	57
4.1	Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit $[^{13}\text{C}_6]$ Glucose	75
4.2	Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit $[^{13}\text{C}_9]$ Phenylalanin	77
4.3	Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit $[^{13}\text{C}_2]$ Acetat	78
4.4	Kopplungskonstanten für die Satelliten der ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome im Aglykon von Nudicaulin I aus dem Experiment mit [ring- $^{13}\text{C}_6$]Anthranilsäure	81
4.5	Molekülpeak und prominenteste Fragmente der drei Anthocyane in ES-3 und ES-4 aus der LC-MS-Analyse und mögliche Zuordnung (Mal - Malonylrest, Glc - Glucose)	88
4.6	Diskriminanzvariablen für die ES-1 bis ES-4 des gelben <i>P. nudicaule</i> geordnet nach den zugehörigen Retentionszeiten, Wilks- Λ und der Verteilung ihrer relativen Intensitäten im Chromatogramm der HPLC-DAD-Analyse sowie ihrer Aglykonstruktur	90
4.7	Faktorladungen der Variablen in der Hauptkomponentenanalyse . . .	96
4.8	Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen Flächenanteile für die flüchtigen Verbindungen im Duftprofil weißer und gelber <i>P. nudicaule</i> Blüten	97
B.1	Übersicht über Fütterungsexperimente – Teil 1	XXVIII
B.2	Übersicht über Fütterungsexperimente – Teil 2	XXIX

C.1	Synthese- und Gebrauchskemikalien – Teil 1	XXX
C.2	Synthese- und Gebrauchskemikalien – Teil 2	XXXI
C.3	Isotopenmarkierte Verbindungen	XXXII
E.1	Methoden der analytischen HPLC	XXXIV
E.2	Methoden der präparativen HPLC	XXXIV
E.3	LC-Methoden der LC-MS-Kopplungen	XXXIV

Anhang

A Übersicht der Inhaltsstoffe von *P. nudicaule* Blüten

Kämpferolderivate nach [13]:

- (1) Kämpferol-3-*O*- β -sophorosid
- (2) Isomer von 1
- (3) Kämpferol-3-*O*- β -sophorosid-7-*O*- β -glucosid
- (4) Kämpferol-3-*O*- β -sophorosid-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid
- (5) Kämpferol-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -glucosid
- (6) Kämpferol-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid
- (7) Isomer von 6

Gossypetinderivat nach [13]:

- (A) Gossypetin-7-*O*- β -glucosid (Gossypitrin)

Nudicauline nach [13]:

- (I) Nudicaulin-7-*O*- β -glucosid-11-*O*-sophorosid
- (II) Isomer von I
- (III) Nudicaulin-7-*O*- β -glucosid-11-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid
- (IV) Isomer von III
- (V) Nudicaulin-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid-11-*O*- β -sophorosid
- (VI) Isomer von V
- (VII) Nudicaulin-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid-11-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid
- (VIII) Isomer von VII

Pelargonidinderivate nach [57]:

- (8) Pelargonidin-3-*O*- β -sophorosid-7-*O*- β -glucosid
- (9) Pelargonidin-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -glucosid
- (10) Pelargonidin-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid-7-*O*- β -(6-malonyl)-glucosid
- (11) Pelargonidin-3-*O*- β -sophorosid
- (12) Pelargonidin-3-*O*- β -(6-malonyl)-sophorosid

B Übersicht über Fütterungsexperimente

Tabelle B.1: Übersicht über Fütterungsexperimente – Teil 1

Nr.	Vorstufe	eingesetzte Menge	Medium (50 ml)	Blütenmaterial
1	[¹³ C ₆]Glucose	50 mg	Wasser	1,0 g
2	[¹³ C ₆]Glucose	50 mg	Wasser	1,6 g
3	[¹³ C ₆]Glucose	100 mg	Wasser	2,5 g
4	[¹³ C ₆]Glucose	375 mg	Wasser	1,3 g
5	[¹³ C ₆]Glucose	125 mg	Wasser	1,5 g
6	[1- ¹³ C]Phenylalanin	5 mg	Wasser	1,6 g
7	[1- ¹³ C]Phenylalanin	10 mg	Wasser	1,4 g
8	[¹³ C ₉]Phenylalanin	15 mg	Wasser	1,0 g
9	[3- ¹³ C]Phenylalanin	15 mg	Wasser	1,9 g
10	[ring- ¹³ C ₆]Phenylalanin	15 mg	Wasser	0,9 g
11	[2- ¹³ C]Phenylalanin	15 mg	Wasser	0,8 g
12	[¹³ C ₁₁]Tryptophan	15 mg	Wasser	1,5 g
13	[1- ¹³ C]Natriumacetat	7,5 mg	Wasser	1,0 g
14	[¹³ C ₁₁]Tryptophan	15 mg	Wasser	0,5 g
15	[2- ¹³ C]Phenylalanin	15 mg	Wasser	1,0 g
16	[1- ¹³ C]Natriumacetat	7,5 mg	Wasser	1,2 g
17	[1- ¹³ C]Natriumacetat	7,5 mg	Wasser	1,1 g
18	[2- ¹³ C]Malonsäure	9,5 mg	Wasser	1,2 g
19	[2- ¹³ C]Indol	10,5 mg	Wasser	1,7 g
20	[2- ¹³ C]Malonsäure	9,5 mg	Wasser	1,0 g
21	[ring- ¹³ C ₆]Anthranilsäure	10,5 mg	Wasser	1,0 g
22	[¹³ C ₅]Ribose	12,5 mg	Wasser	1,3 g
23	[1- ¹³ C]Natriumacetat	15 mg	Wasser	1,0 g
24	[¹³ C ₂]Natriumacetat	15 mg	Wasser	0,8 g
25	[2- ¹³ C]Malonsäure	15 mg	Wasser	0,8 g

Tabelle B.2: Übersicht über Fütterungsexperimente – Teil 2

Nr.	Vorstufe	eingesetzte Menge	Medium (50 ml)	Blütenmaterial
26	[ring- ¹³ C ₆]Anthranilsäure	15 mg	Wasser	1,9 g
27	[1- ¹³ C]Natriumacetat	15 mg	Wasser	1,5 g
28	[¹³ C ₂]Natriumacetat	15 mg	Wasser	2,0 g
29/30	[¹⁵ N]Anthranilsäure	15 mg	Wasser	2,0 / 2,1 g
31/32	[¹⁵ N]Ammoniumchlorid	100 mg	Puffer*	1,0 g / 1,2 g
33/34	[¹⁵ N]Anthranilsäure	50 mg	Puffer*	1,3 g / 1,3 g
35	[¹³ C ₅]Ribose	25 mg	Puffer*	0,9 g
36	[¹³ C ₅]Ribose	25mg ab Tag 2	Puffer*	1 g
37	[¹³ C ₅]Ribose	25 mg	Puffer*	1 g
38	[¹³ C ₁₀]Tryptamin	10 mg	Puffer*	1,3 g
39	[2- ¹³ C]Indol	20 mg	Puffer*	1,2 g
40	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure/ [¹³ C ₆]Glucose	10,5 mg / 200 mg	Puffer*	1,4 g
41	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	6 mg	Puffer*	1,2 g
42	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	10 mg	Puffer*	1,3 g
43	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	3 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,2 g
44	[¹³ C ₉]Phenylalanin	30 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,0 g
45	[¹³ C ₆]Glucose	200 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	0,9 g
46/47	[2- ¹³ C]Indol	10 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,2 g / 1,3 g
48	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	10 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,3 g
49	[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	10 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,3 g
50	[2- ¹³ C]Tyrosin	10 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,2 g
51	[2- ¹³ C]Tyrosin	10 mg	Puffer*/Wasser (1:1 V%)	1,0 g

* Natriumdihydrogenphosphat-/ Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (pH-Wert 5,8 [119])

C Verwendete Chemikalien

Tabelle C.1: Synthese- und Gebrauchschemikalien – Teil 1

Substanz	Bezugsquelle	Bemerkung
Acetonitril	Merck	hypergrade (LC-MS)
Acetonitril	ROTH/VWR	HPLC-grade
Ameisensäure	Fluka	> 98 %
Ameisensäure	Sigma-Aldrich	Eluentadditiv (LC-MS)
Ammoniumacetat	ROTH	-
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich	~ 25 % NH ₃ basis
Cellulase 1	Serva	Onozuka R-10 aus <i>Trichoderma viride</i>
Cellulase 2	Sigma-Aldrich	aus <i>Aspergillus aculeatus</i>
CHAPS	ROTH	-
Chloroform	ROTH	-
Cyclohexanol	ROTH	-
Cyclohexanon	Acros	99,8 % extra pure
1,2 Dimethoxybenzen	Sigma-Aldrich	-
1,4 Dimethoxybenzen	Sigma-Aldrich	-
Dichlormethan	VWR, ROTH	-
Dinatriumhydrogenphosphat	ROTH	-
Dithiotreitol	Serva	-
DMSO	Sigma-Aldrich	> 99,8 %

Tabelle C.2: Synthese- und Gebrauchschemikalien – Teil 2

Substanz	Bezugsquelle	Bemerkung
Dye reagent	GE	-
EDTA	ROTH	-
Eisessigsäure	Fischer	-
Farnese	Sigma-Aldrich	-
Glucose	ROTH	-
β -Glucosidase	Sigma-Aldrich	aus Mandeln
2-Heptadecanone	Sigma-Aldrich	-
4-Hydroxybenzaldehyd	Sigma-Aldrich	-
Indol	Sigma-Aldrich	-
Kaliumchlorid	ROTH	-
Methanol	ROTH	-
Methanol	ROTH/VWR	HPLC-grade
Methyliodid	Sigma-Aldrich	-
Natriumhydrogencarbonat	Merck	-
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	-
Palladium auf Aktivkohle	Sigma-Aldrich	10 % Pd
Pektinase 1	Sigma-Aldrich	aus <i>Aspergillus aculeatus</i>
Pektinase 2	Merck	-
Pharmalyte	GE health care	-
Phenol Tris-HCL	ROTH	gesättigt (pH 6.6/7.9)
Piperidin	Riedel-deHaën	-
Pyridin	Merck	> 0,0075 H ₂ O
Salzsäure	Sigma-Aldrich	37 %
Salzsäure	ROTH	-
Sucrose	ROTH	-
Trifluoressigsäure	ROTH	> 99,9 % zur Synthese
Triton X-100	Serva	-
Urea	ROTH	-
Wasserstoff	Westfalen AG	-

Tabelle C.3: Isotopenmarkierte Verbindungen

Vorstufe	Isotopenanteil	Bezugsquelle
[1- ¹³ C]Acetat	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[1- ¹³ C]Phenylalanin	99 %	Deutero
[1,2- ¹³ C]Ribose	99 %	Sigma-Aldrich
[2- ¹³ C]- <i>p</i> -Cumarsäure	99 %	Syntheseprodukt
[2- ¹³ C]Indol	98 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[2- ¹³ C]Malonsäure	99 %	Deutero
[2- ¹³ C]Phenylalanin	99 %	Deutero
[2- ¹³ C]Tyrosin	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[3- ¹³ C]Phenylalanin	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[¹³ C ₁₀]Tryptamin	98 %	Syntheseprodukt
[¹³ C ₁₁]Tryptophan	98 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[¹³ C ₂]Acetat	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[¹³ C ₅]Ribose	98 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[ring- ¹³ C ₆]Anthranilsäure	99 %	Sigma-Aldrich
[¹³ C ₆]Glucose	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[ring- ¹³ C ₆]Phenylalanin	99 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[¹³ C ₉]Phenylalanin	98 %	Cambridge Isotopic Laboratories
[¹⁵ N]Ammoniumchlorid	98 %	Sigma-Aldrich
[¹⁵ N]Anthranilsäure	52 %	VEB Berlin Chemie
DMSO- <i>d</i> 6	99,80 %	euriso-top
MeOH- <i>d</i> 4	99,80 %	euriso-top

D Verwendete Geräte

Analytische HPLC Agilent Serie HP1100 Serie mit Software ChemStation for LC 3D Rev. A 08.04 [1008] und Trennsäule LiChroCart 250-4 Purospher STAR RP-18ec (250 mm Länge, 4 mm Innendurchmesser, 5 μm Partikelgröße).

Präparative HPLC Shimadzu Serie 10A bzw. 20 A mit Software LC Solutions Version 1.21SP1 und Trennsäule LiChroCart 250-10 Purospher STAR RP-18ec (250 mm Länge, 10 mm Innendurchmesser, 5 μm Partikelgröße).

LC-MS Agilent Serie HP 1100 Serie mit Trennsäule LiChroCart 250-4 Purospher STAR RP-18ec (250 mm Länge, 4 mm Innendurchmesser, 5 μm Partikelgröße) und Software Bruker Hystar & Bruker Esquire 3000 Ion Trap Massenspektrometer mit Software Esquire-controll.

UHPLC-ESI-MS/MS Ultimate 3000 series RSLC (Dionex) mit Trennsäule Acclaim C18 (150 mm Länge, 2,1 mm Innendurchmesser, 2,2 μm Filmdicke, Dionex) und LTQ Orbitrap XL Massspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit ESI-Quelle sowie Analysensoftware XCALIBUR.

GC-MS Agilent-GC 6890N mit unpolarer Trennsäule Agilent-HP5 (30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,32 μm Filmdicke) und Agilent-MS 5975B.

NMR Bruker Avance 500 MHz NMR-Spektrometer mit TCI Cryoprobekopf (5 mm) mit Software Topspin 2.1 & Bruker Avance III HD 700 MHz Spektrometer mit TCI Mikrocryoprobekopf (1,7 mm) mit Software Topspin 3.2. Als interner Standard dienten die ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von $\text{MeOH-}d_4$ (δ 3,30 für ^1H , δ 48,97 für ^{13}C) bzw. von $\text{DMSO-}d_6$ (δ 2,52 für ^1H , δ 40,45 für ^{13}C).

E Analysemethoden

Tabelle E.1: Methoden der analytischen HPLC

	Lösungsmittelgemisch	Gradient	Laufzeit	Flussrate
Methode 1	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	20-60 % MeOH	40 min	1 ml/min
Methode 2	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	50-100 % MeOH	30 min	1 ml/min
Methode 3	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	10-100 % MeOH	30 min	1 ml/min
Methode 4	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	20-50 % MeOH	30 min	1 ml/min

Tabelle E.2: Methoden der präparativen HPLC

	Lösungsmittelgemisch	Gradient	Laufzeit	Flussrate
Methode 5	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	20-60 % MeOH	30 min	3,5 ml/min
Methode 6	MeOH/H ₂ O (0,1 % TFA)	50-100 % MeOH	30 min	3,5 ml/min

Tabelle E.3: LC-Methoden der LC-MS-Kopplungen

	Lösungsmittelgemisch	Gradient	Laufzeit	Flussrate
Methode 7	MeCN (0,1 % FA)/ H ₂ O (0,1 % FA)	50-100 % MeCN	30 min	1 ml/min
Methode 8	MeCN (0,1 % FA)/ H ₂ O (0,1 % FA)	0-100 % MeCN	15 min	300 μ l/min

Methode 8 GC-MS Injektionsvolumen 1 μ l, Elektronensprayionisation bei 4 kV, Transferkapillare mit 35 V Spannung bei 275 °C, Messung im positiven Modus zwischen m/z 100 - 2000 bei einer Auflösung des Orbitrapmassenanalysators von 30000 m/ δ m

Methode 9 GC-MS Temperatur am Injektionsport 265 °C, Heliumflussrate von 1,1 ml/min, Temperaturgradient: 265 °C für 2 min, mit 15 °C/min auf 250 °C, für 3 min bei 250 °C

Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinen Gutachtern Prof. Dr. Jürgen W. Einax und PD Dr. Bernd Schneider für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung meines interessanten Projekts in der Arbeitsgruppe NMR/Biosynthese am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie.

Für seine Betreuung und die viele guten Ratschläge bedanke ich mich ausdrücklich bei Dr. Evangelos C. Tatsis. Außerdem möchte ich allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe NMR/Biosynthese am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dr. Sara Agnolet, Dr. Christin Paetz, Bettina Dudek, Kati Barthold, Olga Ihssen und Dr. Renate Elinger haben mir sehr im Labor und bei technischen sowie wissenschaftlichen Problemen geholfen.

Mein ausdrücklicher Dank für die fruchtbaren Kooperationen sowie die Durchführung von verschiedenen Messungen gilt Prof. Dr. Gerhard Bringmann, Dr. Anu Schaumlöffel, Dr. Aleš Svatoš, Dr. Natalie Wielsch, Dr. Marco Kai, Dr. Riya Christina Menezes, Dr. Heiko Vogel, Dr. Jaime Martinez-Harms und Yvonne Hupfer.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Gewächshausteam des Max-Planck-Institutes für chemische Ökologie, insbesondere Dr. Tamara Krügel, Birgit Arnold und Henriette Dübner für die ständige Pflege der *P. nudicaule* Pflanzen, die dieses Projekt erst ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen ehemaligen Mitarbeitern des Lehrbereichs Umweltanalytik für die Diskussionsbereitschaft und den freundlichen Umgang, vor allem bei Gisa Baumbach, Dr. Kristin Schäfer, Dr. Simon Prikler und Dr. Stefan Möller bedanken.

Abschließend danke ich ausdrücklich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotionsphase sowie darüber hinaus auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anne-Christin Warskulat
Geburtsdatum 13.05.1987
Geburtsort Sömmerda

Ausbildung

seit 01/2011

Promotion

Forschungsstätte Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Arbeitsgruppe NMR/Biosynthese
Betreuer: PD Dr. Bernd Schneider
Hochschule Friedrich-Schiller-Universität Jena
Betreuung durch Prof. Dr. Jürgen W. Einax

10/2005 - 12/2010

Studium

Hochschule Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studienfach Chemie / Umweltchemie Diplom
Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biogeochemie Jena
Abteilung Biogeochemische Prozesse
Untersuchung der Einflüsse von Landnutzung und
Management auf die organische Bodensubstanz
mit Hilfe der Pyrolyse-GC/MS und chemometrischer
Auswertemethoden

1997 - 2005

Gymnasium

Staatliches Gymnasium *A. Schweitzer* Sömmerda

1993 - 1997

Grundschule

Staatliche Grundschule *A. Diesterweg* in Sömmerda

Ort, Datum

Unterschrift