

Diversität der Wehrchemie von Blattkäferlarven

**Sequestrierung und *de novo* Synthese als Aspekte der Evolution von
Chrysomeliden**

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Dipl. Chem. Jürgen Kuhn
geboren am 2. September 1973 in Bad Hersfeld

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Boland
2. Prof. Dr. R. Beckert
3. Prof. Dr. S. Schulz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16. Februar 2005

... iam plena omnia, omnia summis, mediis infimisque ordinibus fuerant distributa. Sed non erat paternae potestatis in extrema fetura quasi effeta defecisse, non erat sapientiae consilii inopia in re necessaria fluctuasse, non erat benefici amoris, ut, qui in aliis esset divinam liberalitatem laudaturus, in se illam damnare cogere. Statuit tandem optimus opifex, ut, cui dari nihil proprium poterat, commune esset, quicquid privatum singulis fuerat. Igitur hominem accepit indiscretae opus imaginis atque in mundi positum meditullio sic est alloquutus:

»Nec certam sedem nec propriam faciem nec munus ullum peculiare tibi dedimus, o Adam, ut, quam sedem, quam faciem, quae munera tute optaveris, ea pro voto, pro tua sententia habeas et possideas. Definita ceteris natura intra praescriptas a nobis leges coercetur. Tu nullis angustiis coercitus pro tuo arbitrio, in cuius manu te posui, tibi illam praefinies. Medium te mundi posui, ut circumspiceres inde commodius, quicquid est in mundo. Nec te caelestem neque terrenum neque mortalem neque immortalem fecimus, ut tui ipsius quasi arbitrarius honorariusque partes er fitor, in quam malueris tu te formam effingas. Poteris in inferiora, quae sunt bruta, degenerare, poteris in superiora, quae sunt divina, ex tui animi sententia regenerari.«

O summam dei patris liberalitatem, summam et admirandam hominis felicitatem, cui datum id habere, quod optat, id esse, quod velit. Bruta simulatque nascuntur, id secum afferunt (ut ait Lucilius) e bulga matris, quod possessura sunt. Supremo spiritus aut ab initio aut paulo mox id fuerunt, quod sunt futuri in perpetuas aeternitates. Nascenti homini omnifaria semina et omnigenae vitae germina indidit pater. Quae quisque excoluerit, illa adolescent er fructus suos ferent in illo: Si vegetalia, planta fiet. Si sensualia, obbrutescet. Si rationalia, caeleste evadet animal. Si intellectualla, angelus erit ei dei filius. Et si nulla creaturarum sorte contentus in unitatis centrum suae se receperit, unus cum deo spiritus factus in solitaria patris caligine, qui est super omnia constitutus, omnibus antestabit. Quis hunc nostrum chamaeleonta non admiretur?...

Giovanni Pico della Mirandola,
Oratio de hominis dignitate, 1486.

Vorwort

Diese Dissertation zeigt die Resultate meiner naturwissenschaftlichen Arbeit am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena.

Als ich vor vier Jahren nach Jena gekommen bin, ahnte ich nicht, daß ich mich derart für Blattkäfer begeistern könnte, denn während meiner Diplomarbeit habe ich nicht mit lebenden Tieren experimentiert. Der permanente Umgang mit lebenden Organismen und die ständige Konfrontation mit biologischen Fragestellungen trugen dazu bei, diese faszinierenden Tiere auf gewisse Weise schätzen zu lernen und die Vorliebe des Schöpfers für Käfer durchaus nachzuvollziehen, schließlich ist die Ordnung der Käfer (Coleoptera) mit mehr als 250.000 beschriebenen Spezies die größte unter allen Lebewesen.

Die Eleganz, mathematische Logik und Symmetrie¹ der Schöpfung bewunderte ich schon bei den rein physikalischen Untersuchungen in meiner Diplomarbeit, während mich die vielfältigen Möglichkeiten, die komplexen und anfangs scheinbar komplizierten Zusammenhänge der chemischen Ökologie beeindruckten. Und bei der vorliegenden Arbeit war es eine faszinierende Erkenntnis, daß alle biologischen Prozesse meist einer einfachen, aber genialen Ordnung folgen; festzustellen, wie so kleine, unscheinbare Kreaturen sich ausgefeilte Überlebensstrategien aneignen, die mir bis dahin nicht bewußt waren. Beispielsweise sind Larven des Großen Pappelblattkäfers (*Chrysomela populi*) so wählerisch mit ihrer Nahrung, daß sie lieber sterben, als ein ihnen nicht genehmes Blatt zu verzehren.

Die Arbeit mit Tieren bereitete mir durch die interessante Aufgabenstellung sehr viel Freude, und ich habe gelernt mit Insekten umzugehen. Nicht zuletzt wegen zahlreicher, konstruktiver und manchmal kontroverser Diskussionen mit meinem Doktorvater Prof. Boland konnte ich darüber hinaus auch meine chemisch-analytischen Fähigkeiten und meinen Sinn für die Lösung wissenschaftlicher Probleme steigern. Bei diesen Tieren werden meistens kleine bis kleinste Mengen untersucht, die auch die moderne Analytik vor eine echte Herausforderung stellen. An dieser Arbeit sollte nachvollziehbar sein, daß das Ergebnis den Aufwand rechtfertigt.

Besonders interessant war und ist für mich die Kombination verschiedener wissenschaftlicher Disziplinen, die nötig sind, um auf dem Feld der Bioorganik tätig zu werden. Die Fragestellungen sind biologischer Natur, aber die Antworten werden durch chemische oder physiko-chemische Methoden geliefert. Wo die Chemie an ihre Grenzen kommt, greifen dann Biochemie und Molekularbiologie an, um festzustellen, wie die beobachteten Phänomene auf genetischer oder enzymatischer Ebene geregelt werden. Die Biologie stellt letztendlich alles in einen Kontext, wodurch sich der Kreis wieder schließt.

Beeinträchtigt wurde diese wissenschaftlich Tätigkeit durch meine Krankheit, das heißt Operationen und die damit verbundene Genesungszeit, innerhalb der ich nicht in der Lage war, mich in vollem Umfang meiner Arbeit zu widmen. Deshalb möchte ich an dieser Stelle auch schon all den Menschen danken, die mir während dieser schweren Zeiten freundschaftlich und hilfreich zur Seite standen, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Meine Familie und meine Kölner Freunde haben mit mir gelitten und mich unterstützt. Für den experimentellen Teil meiner Arbeit wichtig und entscheidend aber war die Hilfe von Prof. Boland und meiner Kollegen Dr. Alice Shumate, Dr. Eva Petterson, Claes Johansson, Angelika Berg, Grit Winnefeld und Anja Bidermann, die während meiner meiner krankheitsbedingten (Zwangs-)Pausen für den Vollzug der zeitabhängigen Experimente gesorgt haben. Ihnen ist es anzurechnen, daß, solange ich stillgelegt war, dieses nicht auch für meine Arbeit zutreffen mußte.

Zur Erfüllung der technischen Anforderungen der Friedrich-Schiller Universität wurde diese vorliegende Arbeit in L^AT_EX 2_ε mit Dokumentklasse „book“ ohne besondere Abwandlungen der Standardseitenformatierung unter Debian Linux geschrieben und liegt als „Portable Document Format“ (.pdf) vor. Das Literaturverzeichnis wurde unter Zuhilfenahme von B_IB_TE_X mit der unsrtdin.bst-Stildatei generiert,

¹Hierzu kann ich dem interessierten Leser „Das elegante Universum“ von Brian Greene als Bettlektüre empfehlen.

die Literaturverzeichnisse gemäß der deutschen Zitierform DIN 1505 Teil 2 formatiert.

Das Originaldokument ist ein einfaches Textdokument. Für die Graphiken wurde Encapsulated Post-Script (.eps) oder „Portable Network Graphic“ (.png) Format verwendet, das leichte Verwendbarkeit im Internet gewährleistet. Dieses Dokument folgt den Regeln der deutschen Rechtschreibung wie sie auch in der „Frankfurter Allgemeinen Zeitung“ und „Frankfurter Allgemeinen Sonntagszeitung“ und in der Zeitschrift „Spiegel“ und beim gesamten Springer-Verlag Anwendung finden.

Jena, August 2004
Jürgen Kuhn

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Sequestrierung bei Insekten	1
2	Wehrchemie der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae)	2
2.1	Chemische Abwehr der adulten Käfer	2
2.2	Chemische Abwehr der Blattkäferlarven	5
2.3	Biosynthese von Wehrverbindungen	8
2.3.1	<i>de novo</i> Synthese von Iridoid Monoterpenen	8
2.3.2	Sequestrierung phenolischer Glucoside	8
2.3.3	Gemischte Strategie der Biosynthese	8
3	Methoden zur Untersuchung von Transportmechanismen	11
3.1	Thioglycoside	13
II	Hauptteil	15
4	Aufgabenstellung	15
4.1	Untersuchung von Transportmechanismen bei Blattkäferlarven (Coleoptera: Chrysomelidae)	15
4.2	<i>de novo</i> Synthese und Sequestrierung im <i>Chrysomela</i> -Kladus – Untersuchung des acylierenden Enzyms bei <i>C. lapponica</i>	16
5	Ergebnisse und Diskussion	17
5.1	Transportuntersuchungen mittels Thioglycosiden	17
5.1.1	Synthesen und Reinigung der Stoffwechsellonden	17
5.1.2	Synthese acylierter Glycoside	19
5.1.3	Synthese von Referenzestern	19
5.1.4	Analytische Methodenentwicklung	20
5.1.5	Züchtung der Käferlarven	21
5.1.6	Sekret- und Hämolymphegewinnung	22
5.1.7	Transportkinetik von Thiosalicin	24
5.1.8	Transport von Thiosalicylalkohol	25
5.1.9	Selektivität der Transporter	26
5.1.10	Konkurrenzexperimente bei <i>C. lapponica</i> (Quey)	35
5.1.11	Transportphänomene bei Chrysomelidenlarven	37
5.2	Fluoreszenzmarkierung von Transportern	38
5.3	Bestimmung des Ortes der Biosynthese bei <i>de novo</i> Synthetisierern	40
5.4	Charakterisierung der Butyryltransferase von <i>C. lapponica</i>	40
5.4.1	Nachweis der Enzymaktivität	40
5.4.2	Bestimmung der Substratspezifität	41
5.4.3	Bestimmung des butyrylübertragenden Cofaktors	42
5.4.4	Charakterisierung und Isolierung des Enzyms	43

5.5	Glucosidasekinetik mit Sekret von <i>C. populi</i>	44
5.6	Isotopenmarkierte Verbindungen zur Aufklärung des Ursprungs von Wehrsubstanzen . .	45
5.6.1	Fütterung isotopenmarkierter Verbindungen	45
6	Zusammenfassung und Ausblick	49
III	Experimenteller Teil	55
7	Synthesen	55
7.1	Verwendete Chemikalien	55
7.2	Synthesevorschriften	57
7.2.1	Oxidation von Geranylacetat mit Selendioxid	57
7.2.2	Synthesevorschriften zur Darstellung von geschützten Glycosiden	57
7.2.3	Entschützungen und Reduktionen	64
7.2.4	Synthesevorschrift zur Darstellung von Butyraten	70
7.2.5	Umesterung zur Darstellung von Vinylbutyraten	73
7.2.6	Regioselektive Acylierung von Glycosiden	74
8	Analytik	76
8.1	Spektroskopie	76
8.2	Chromatographie	76
8.3	Optische Geräte	77
8.4	Waagen	77
8.5	Parameter für die Chromatographie	77
8.5.1	LC-MS Parameter	77
8.5.2	GC-MS Parameter	78
8.5.3	ESI-MS Parameter	79
9	Biologische Experimente	79
9.1	Zuchtbedingungen	79
9.2	Fütterungsexperimente	80
9.2.1	Wahlversuch mit imprägnierten und unbehandelten Blättern	81
9.2.2	Fütterung von Thioglycosiden	81
9.2.3	Konkurrierende Fütterung von Thioglycosiden	81
9.2.4	Fütterung von isotopenmarkierten Substanzen	82
9.3	Charakterisierung des acylierenden Enzyms im Sekret von <i>C. lapponica</i>	82
9.3.1	Experimente mit Rohsekret	82
9.4	Isolierung der Butyryl-Transferase aus dem Sekret von <i>C. lapponica</i>	83
9.5	ESI-MS Spektroskopie	83
9.6	Statistik	84
	Anhang	85
A	Abkürzungen	85
B	Spektren	87

Literaturverzeichnis**175****Persönliche Daten****i**

I Einleitung

1 Sequestrierung bei Insekten

Phytophage Insekten haben sich vor allem während des Perms vor etwa 290 Millionen Jahren parallel mit der Entstehung von Angiospermen (Bedecktsamern) entwickelt [1, 2]. Mesozoische Fossilien lassen darauf schließen [3], daß die Entfaltung blütenbesuchender Gruppen von Insekten, wie Schmetterlinge (Lepidoptera) und Bienen (Apoidea), in der mittleren Kreidezeit stattgefunden und damit die vermehrte Ausbreitung und Diversifizierung von Angiospermen vorangetrieben haben [4]. Parallel dazu entwickelten sich herbivore Insekten wie beispielsweise Käfer (Coleoptera) coevolutiv mit ihren Wirtspflanzen [5–8]. Seit dieser Zeit gab es wechselseitige Anpassungen zwischen Herbivoren und ihren Wirtspflanzen. Ein besonderes Merkmal von Insektenherbivorie ist die ausgeprägte Neigung zur Entwicklung von Spezialisten (Monophagen), die sich nur von einer einzigen Pflanze oder wenigen nahe verwandten Pflanzen ernähren [9, 10]. Eine wichtige Rolle spielen dabei von den Pflanzen produzierte allelochemische Sekundärmetabolite, die als Abwehrsubstanzen gegen Pathogene oder Herbivore wirken [11], aber auch als Phagostimulantien, Allomone oder Kairomone für Gliederfüßer dienen können [12–15].

Viele Insekten haben Mechanismen entwickelt, die pflanzlichen Verteidigungsmaßnahmen zu umgehen und Toxine zum eigenen Vorteil zu nutzen. Zum einen besetzen sie dadurch eine für andere phytophage Insekten unzugängliche Nische, zum anderen profitieren sie auch direkt von den sekundären Metaboliten [16], die sie gegen Prädatoren, Parasiten und Pathogene schützen [17, 18]. Giftstoffe der Wirtspflanze können durch Metabolisierung (z. B. Oxidation durch Enzyme vom Typ Cytochrom P₄₅₀ bei Lepidopteren [19]) und Ausscheidung unschädlich gemacht werden. Einige spezialisierte Insekten nehmen giftige Pflanzenmetabolite aus der Nahrung auf und speichern diese für ihre eigene Verteidigung gegen Fraßfeinde [20–22]. Das heißt, sie sequestrieren pflanzliche Sekundärstoffe. Diese Sekundärstoffe können chemisch unmodifiziert, wie sie in der Futterpflanze vorkommen, eingesetzt werden oder zur Erhöhung der Wirksamkeit gegen Karnivoren oder zur besseren Speicher- und Verwendbarkeit für das Insekt in eine modifizierte Form, beispielsweise zur Vermeidung von Selbstvergiftung [18], gebracht werden.

Die bekanntesten Beispiele für Sequestrationsprozesse liefern verschiedene Lepidopteren [15, 23–25], die in der Lage sind, hochtoxische Pyrrolizidine (s. auch Abb. 2.2) [22, 26], Cardenolide [27, 28], Cyanogene-Glycoside [29], Iridoidglycoside [30–35], Azoxyglycoside [36] oder Glucosinolate [15, 37–39] (Abb. 1.1) aufzunehmen, in der Hämolymphe oder den Flügeln zu speichern und zur eigenen Verteidigung einzusetzen. So sind beispielsweise Schmetterlingsarten der Papilionidae, Pieridae und Nymphalidae durch Aufnahme von Cycasin und Macrozamin, zwei Azoxyglycoside, für räuberische Vertebraten

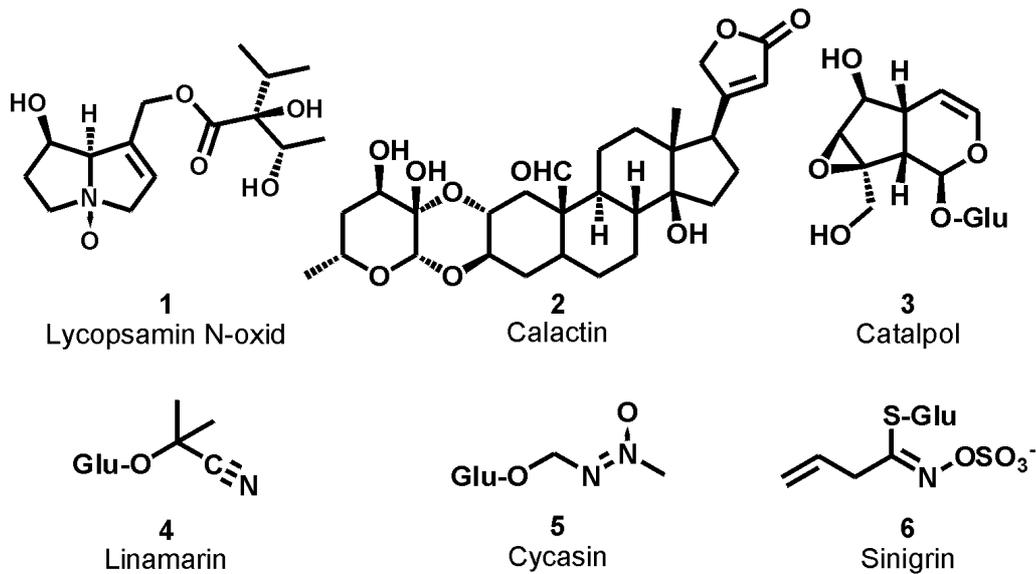


Abbildung 1.1: Beispiele für sequestrierte Substanzen bei Schmetterlingen. Lycopsamin *N*-oxid **1** ist ein Beispiel für ein Pyrrolizidinalkaloid, Calactin **2** für ein Cardenolid, Catalpol **3** ist ein Iridoidglycosid, Linamarin **4** ein Cyanogenes-Glycosid, Cycasin **5** ein Azoxyglycosid und Sinigrin **6** ein Glucosinolat.

und Invertebraten, wie Spinnen oder Ameisen, ungenießbar [36, 40, 41].

Auch aus der sehr großen Familie der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae) mit mehr als 37.000 bisher beschriebenen Arten [42] weltweiter Verbreitung gibt es einige Beispiele für die erfolgreiche Weiterverwendung von pflanzlichen Metaboliten zu Abwehrzwecken [14, 43–51] (Kapitel 2).

2 Wehrchemie der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae)

Der Name der Familie „Chrysomelidae“ leitet sich von den griechischen Wörtern *chrysos*: Gold und *melolathion*: Käfer ab und bezieht sich auf die Signal- und Warnfarben der adulten Blattkäfer [52–54] (Abb. 2.6).

Larven und Imagines vieler Arten der Unterfamilie Chrysomelinae verteidigen sich chemisch durch exokrine Drüsensekrete gegen Fraßfeinde [43, 55]. Die dabei eingesetzten Substanzen werden sowohl bei den Adulten als auch den Larven meist *de novo* synthetisiert [52, 55]. Als sekundäres evolutives Ereignis hat sich die Sequestrierung von Metaboliten der Wirtspflanze etabliert [53, 56].

2.1 Chemische Abwehr der adulten Käfer

Wehrsubstanzen innerhalb des Tribus Chrysomelini gehören zu unterschiedlichen chemischen Klassen von Verbindungen [43, 52, 59]: Aminosäurederivate, Steroide und Pyrrolizidinalkaloid *N*-oxide (Abb. 2.1).

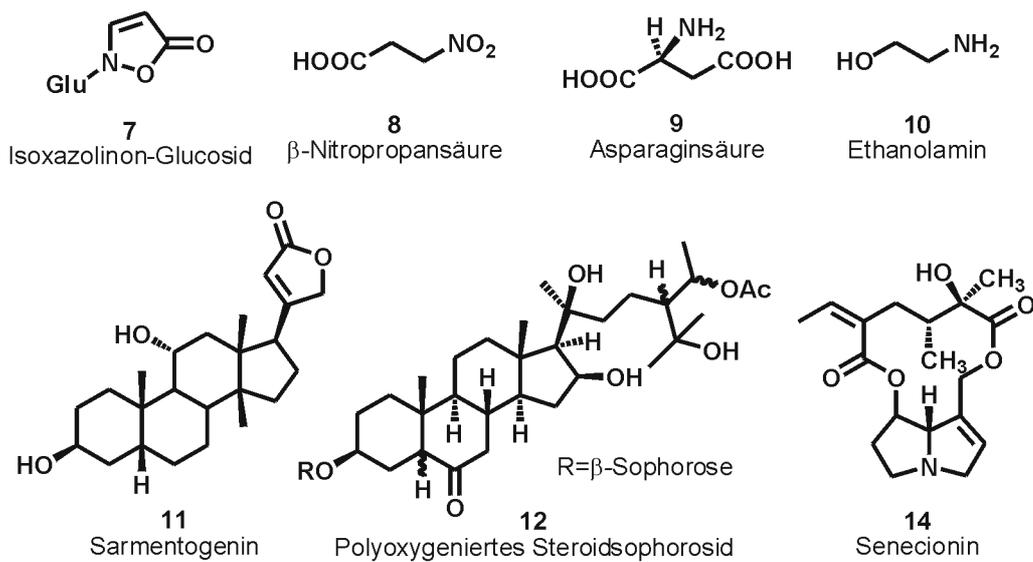


Abbildung 2.1: Beispiele für Wehrverbindungen adulter Blattkäfer (Tribus Chrysomelini). Aminosäuren und abgeleitete Verbindungen: Isoxazolinon-Glucosid **7**, 3-Nitropropansäure **8**, Asparaginsäure **9**, Ethanolamin **10**. Beispiele für Steroide: Sarmontogenin **11** (Cardenolid) und Steroid **12** aus *Chrysolina quadrigemina* [57]. Senecionin **13** ist ein Pyrrolizidinalkaloid *N*-oxid.

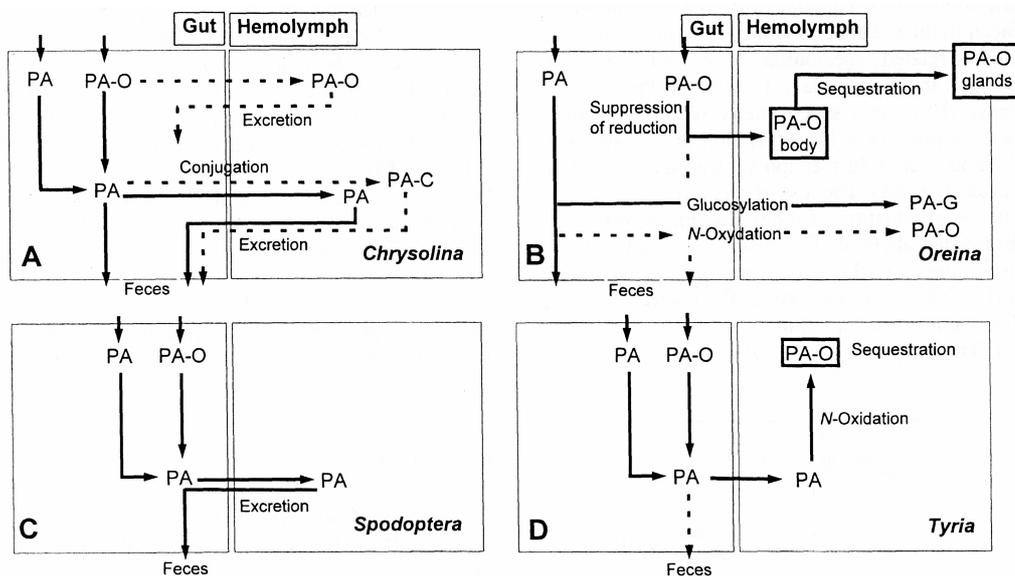


Abbildung 2.2: Strategien zur Aufnahme, Metabolisierung und Speicherung von tertiären Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und ihren *N*-Oxiden (PA-O) aus Hartmann, 1999 [58]. Chrysomelide: (A): *Chrysolina coeruleans* unangepaßt, keine Sequestrierung („Biochemische Kontrolle“). (B): *Oreina cacaliae* angepaßt, Sequestrierer. Lepidopteren: (C): *Spodoptera littoralis* Tolerierung von Alkaloiden, keine Sequestrierung. (D): *Tyria jacobaeae* angepaßt, Sequestrierer. Beide nicht angepassten Spezies verfügen über Mechanismen PAs direkt auszuseiden, der bei Sequestrieren unterdrückt ist. Diese speichern in beiden Fällen polare Substanzen (PA-O, PA-G). Pfeile: Hauptweg; gestrichelt: untergeordneter Weg. PA-C: Pyrrolizidinalkaloid-Konjugat; PA-G Pyrrolizidinalkaloid-Glucosid.

Die unterschiedliche Wehrchemie der Adulten wird sogar als taxonomisches Merkmal bei Chrysomeliden verwendet [52, 60] (Tab. 2.1). Isoxazolinone [43], Nitropropansäureglycoside [61], Dipeptide [62], Aminosäuren [54, 57, 63], polyoxygenierte Steroidglycoside [57, 64, 65] und Cardenolide [66–70] werden autogen hergestellt [71, 72], während Pyrrolizidinalkaloid-*N*-oxide von den Wirtspflanzen [73–80] sequestriert werden [45, 56, 58, 60, 81–83].

Tabelle 2.1: Wehrverbindungen in Adulten verschiedener Subtribus der Chrysomelini (nach Pasteels, 1982, 1984, 1989). Abweichungen einzelner Genera oder einzelner Spezies sind eingerückt unter dem betreffenden Subtribus aufgeführt.

Subtribus	gefundene Wehrverbindungen
Chrysomelina Genus <i>Colaspidema</i>	Isoxazolinone, Nitropropansäureglycoside unbekannte Verbindungen
Phyllodectina Genus <i>Chrysolina</i> einzelne Spezies Genus <i>Oreina</i> einzelne Spezies einzelne Spezies	Isoxazolinone, Nitropropansäureglycoside Cardenolide, Ethanolamin Polyoxygenierte Steroidglycoside, Ethanolamin Cardenolide, Ethanolamin Cardenolide, Ethanolamin, Pyrrolizidinalkaloid <i>N</i> -oxide Ethanolamin, Pyrrolizidinalkaloid <i>N</i> -oxide
Doryphorina	Cardenolide, Ethanolamin, Aminosäuren
Gonioctenia	nicht identifizierte Aminosäurederivate

Im Organismus werden diese *per se* ungiftigen Substanzen nach unspezifischer Reduktion im Darm in tertiäre Alkaloide (wie z. B. Senecionin **13**) umgewandelt und absorbiert (Abb. 2.2) [74]. Oxidierende Enzyme vom Typ Cytochrom P₄₅₀ bioaktivieren Pyrrolizidinalkaloide leicht in instabile Pyrrolderivate mit alkylierenden und damit zytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften [58, 74]. Die Mechanismen für die Aufnahme, Speicherung und Detoxifizierung von pflanzlichen Pyrrolizidinalkaloid-*N*-oxiden sind von Hartmann et al. für einige Blattkäfer durch radioaktiv [58, 77, 81, 83] und deuteriummarkierte [75, 77] Metabolite gut untersucht worden.

Die Adaption der Tiere an diese Toxine gelingt durch Unterdrückung der darmspezifischen Reduktion der *N*-Oxide, effiziente Aufnahme der Alkaloid-*N*-Oxide und Entgiftung des tertiären Alkaloids durch *O*-Glucosylierung [58, 74, 81]. Der gezielte Transport polarer Substanzen wie *N*-Oxide und Glucoside beispielsweise vom Darm in die Hämolymphe oder von dort in andere Körperteile wie den Wehrdrüsen verlangt Transporter, da unpolare Membranen nicht passiert werden können (Abschn. 3) [74, 78, 80].

Sehr gut untersucht ist beispielsweise das Genus *Oreina*, in dem Adulte den Wechsel von *de novo* Synthese von Cardenoliden zu Sequestrierung von Pyrrolizidinalkaloiden vollziehen [76, 78, 80]. Die adulten Käfer können die aufgenommenen Substanzen in speziellen Drüsen und damit verbundenen Organen oder in der Hämolymphe – hierbei tritt als Abwehrreaktion das sogenannte Reflexbluten auf [39] – speichern [59].

In geringem Maße sind auch *de novo* Produzenten (z. B. *Chrysolina coerulans*) in der Lage polare Pyrrolizidinalkaloid-*N*-oxide durch die unpolare Darmmembran in die Hämolymphe zu schleusen (Abb. 2.2). Dieser unspezifische Transport – und das damit vorhandene Transportsystem – könnte die Grundvoraussetzung für die Anpassung an verschiedene Pflanzen und Sequestrierung pflanzlicher Toxine darstellen [74, 78, 80].

Wirtspflanzenwechsel folgen dabei einer parallelen Kladogenese [44, 84], geschehen aber auch zu entfernt verwandten Pflanzenfamilien [85, 86].

In der Literatur [87] wird ein Modell beschrieben, daß Wirtswechsel von phytophagen Insekten an chemisch ähnliche Metabolite gebunden ist. Diese „Phytochemische Brücke“ erklärt Wirtspflanzenwechsel oftmals besser als die Pflanzenphylogenie oder geographische Verteilung des Wirtes [88, 89].

2.2 Chemische Abwehr der Blattkäferlarven

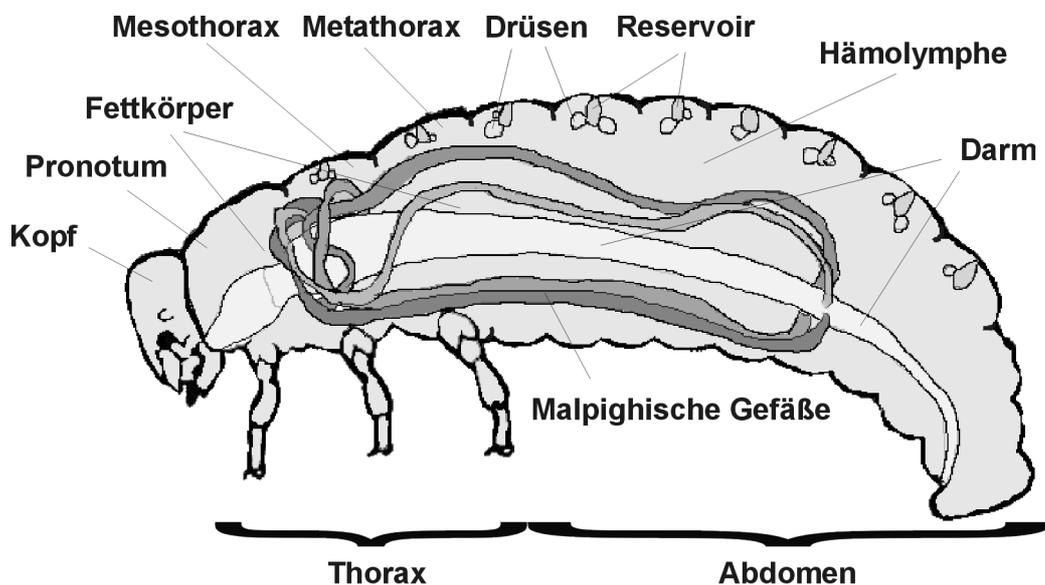


Abbildung 2.3: Schematische Zeichnung einer Larve (S. Discher) mit Bezeichnungen der wichtigsten Körperteile.

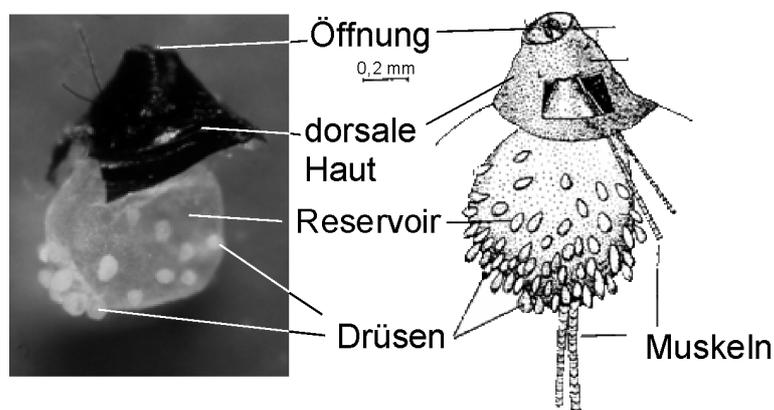


Abbildung 2.4: Photo (A. Burse) und Detailzeichnung (Hinton, 1951) exokriner Larvaldrüsen.

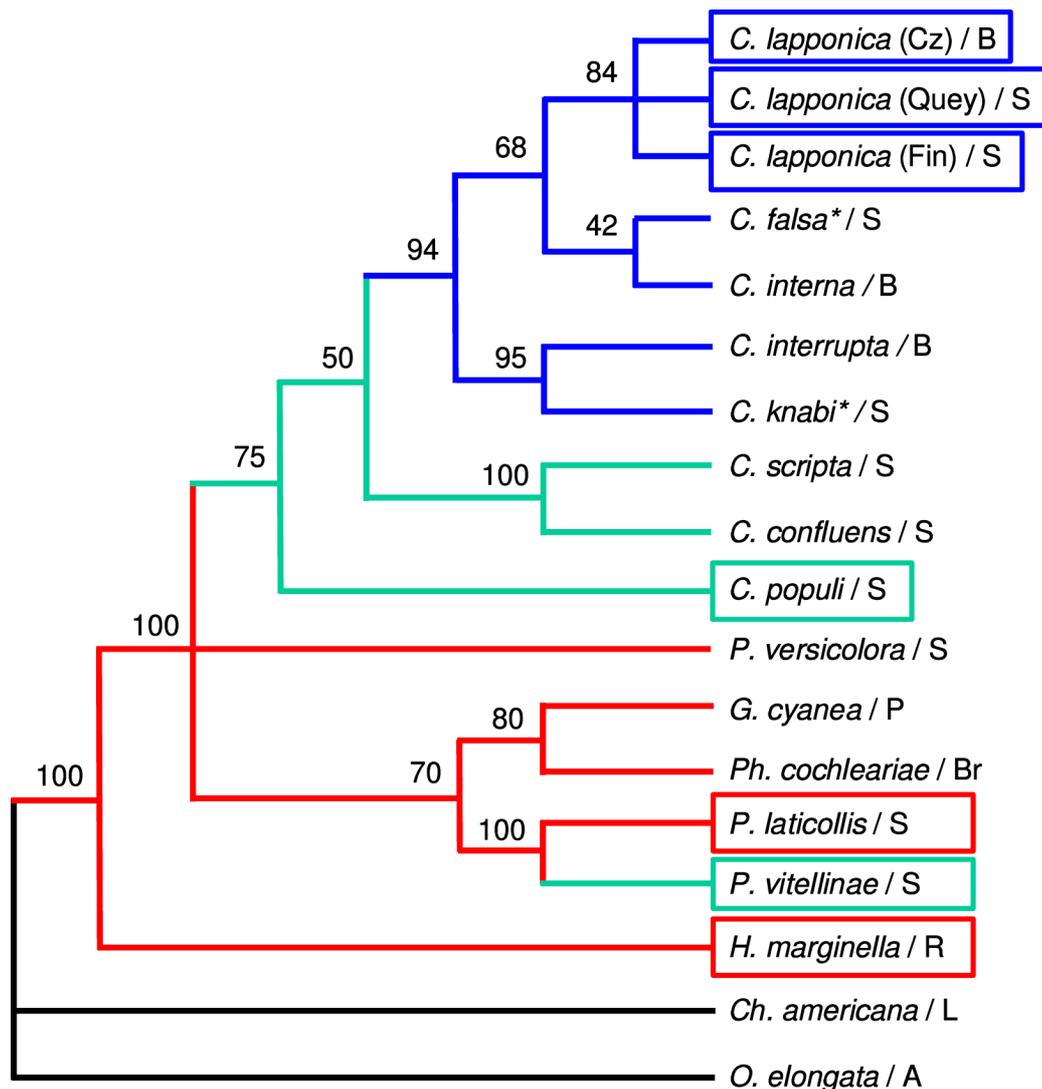


Abbildung 2.5: Mitochondriale 16S rRNA Phylogenie von Blattkäfern des Subtribus *Chrysomelina*. Maximum-Parsimonie-Rekonstruktion der chemischen Verteidigungsstrategien mit Bootstrap-Werten oberhalb der Verzweigungen (Phylogenie: A. Termonia). Rot: *de novo* Synthese betreibende Spezies; Grün: Sequestrierer; Blau: Spezies mit gemischter Strategie der Biosynthese. In Kästchen sind Spezies markiert, die für Transportuntersuchungen verwendet wurden. Wirtspflanzen: /B:Betulaceae; /S: Salicaceae; /P: Polygonaceae; /Br: Brassicaceae; /R: Ranunculaceae.

Die meisten Blattkäferlarven verteidigen sich mechanisch, z. B. durch Haare und Sklerite. Arten der *Cassidinae* reichern Abwehrstoffe der Wirtspflanzen in den Faeces [90] an und bauen daraus einen tragbaren Schild. Im Tribus *Chrysomelini* haben viele Spezies chemische Methoden zur Verteidigung entwickelt. Aus Drüsenreservoirien kann ein Wehrsubstanzen enthaltendes Sekret [55, 91] angereichert und bei Gefahr entlassen werden [92, 93].

Blattkäferlarven der Subtribus *Chrysomelina* (Abb. 2.5) und *Phyllodectina* besitzen neun paarige Tubuli auf ihrem Meso- und Metathorax sowie auf den ersten sieben Abdominalsegmenten (Abb. 2.3 und Abb. 2.6). Nur ein Drüsenpaar findet sich zwischen den Abdominalsegmenten 7 und 8 bei den Subtribus *Gonioctenina* und *Paropsina* und bei den Subtribus *Chrysolina* und *Doryphorina* zwischen den Abdominalsegmenten 8 und 9 [12, 92–95].

Bei räuberischen Angriffen, wie beispielsweise durch Ameisen und andere Arthropoden, sind die Tiere

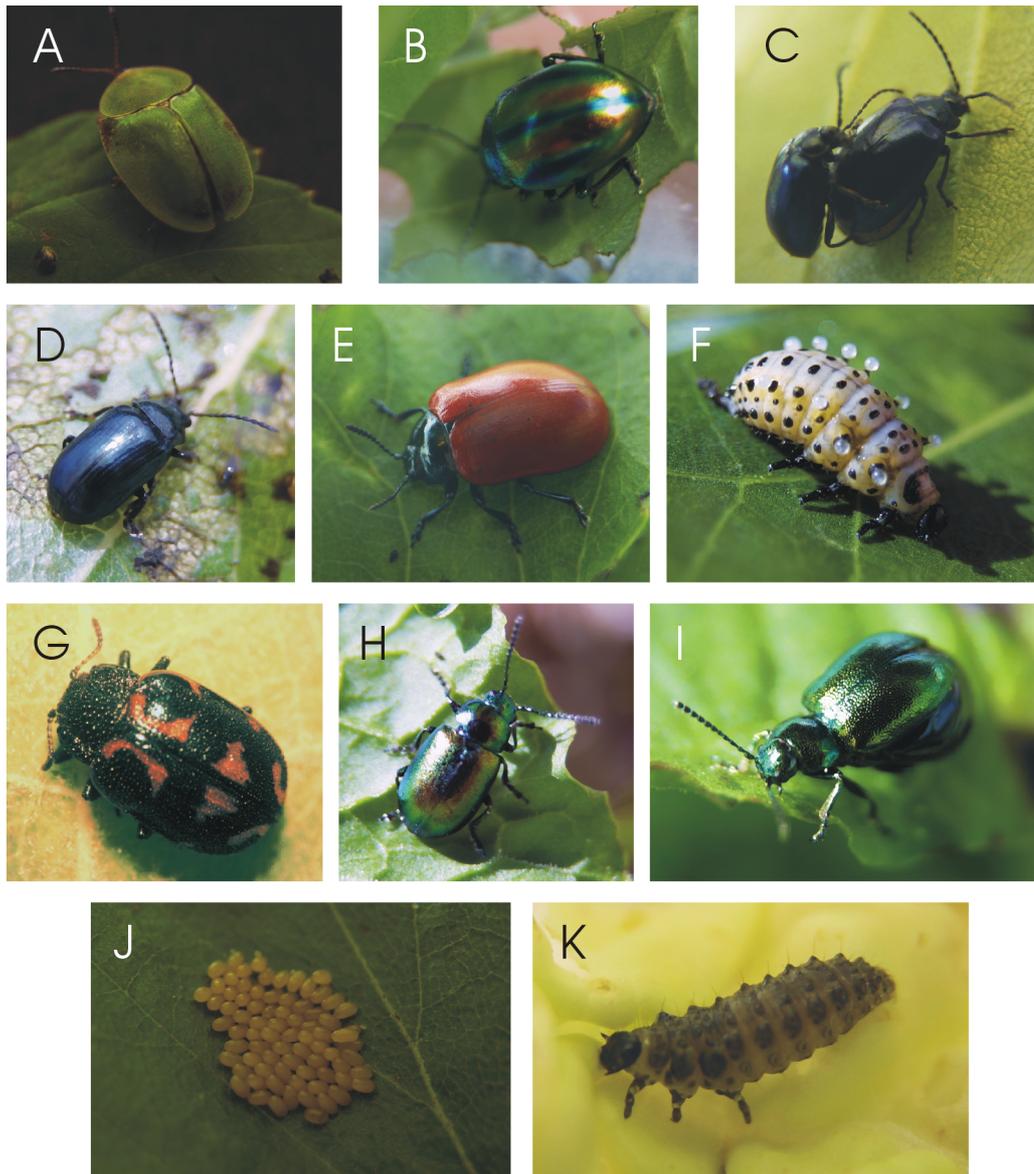


Abbildung 2.6: Beispiele für Blattkäfer: Imagines, Larven und Eier. (A): *Cassida viridis* (Grüner Schildkäfer); (B): *Chrysolina fastuosa* (Ovaläugiger Blattkäfer); (C): kopulierende *Angelastica alni* (Erlenblattkäfer); (D): *Phratora*-Spezies; (E): *C. populi* (Großer Pappelblattkäfer); (F): Larve (3. Stadium) von *C. populi* (gut zu sehen die neun paarigen Tubuli mit ausgestülptem Sekret auf dem Meso- und Metathorax, sowie auf den ersten sieben Abdominalsegmenten); (G): *Chrysomela lapponica* mit deutlich erkennbaren Tröpfchen von Wehrsekret auf Elytren und Pronotum; (H): männliches Imago von *Gastrophysa viridula* (Ampferblattkäfer); (I): weibliches Imago von *G. viridula*; (J): Eigelege von *C. lapponica*; (K): Larve (3. Stadium) von *Phaedon cochleariae* (Meerrettichblattkäfer). (Photos: S. Discher, A. Burse).

in der Lage, Drüsenreservoir, in denen sich das Wehrsekret befindet, durch Erhöhung des Hämolympdruckes oder Muskeleinsatz auszustülpen [42]. Die Abbildung 2.4 zeigt ein Photo und eine Zeichnung [94] eines solchen Reservoirs.

Die wichtigsten Abwehrsubstanzen im Sekret der Larven können folgenden chemischen Klassen von Verbindungen zugeordnet werden: Iridoide, aromatische Aldehyde und Ester (Acetate, Isobutyrate, 2-Methylbutanoate), HCN [12, 43, 52, 96]. Die Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über Wehrsubstanzen innerhalb der verschiedenen Subtribus der Chrysomelini.

Tabelle 2.2: Wehrverbindungen von Larven des Tribus Chrysomelini (nach Hilker, 1993 und Pasteels, 1982, 1984, 1989).

Subtribus	gefundene Wehrverbindungen
Chrysomelina	Iridoide, Salicylaldehyd, Benzaldehyd, Juglon, Isobutyrate, 2-Methylbutanoate, Alkyl- und Alkenylacetate
Phyllodectina	Iridoide, Salicylaldehyd
Paropsina	Benzaldehyd, HCN
Gonioctenia	6-Methyl-5-hepten-2-on, <i>trans</i> -2-Hexenal, Linalool, 2-Phenylethanol, 6-Methyl-5-hepten-2-ol

2.3 Biosynthese von Wehrverbindungen

2.3.1 *de novo* Synthese von Iridoid Monoterpenen

Blattkäferlarven der Subtribus Chrysomelina und Phyllodectina schützen sich in den meisten Fällen durch cyclopentanoide Monoterpene (Iridoide) [91, 97, 98]. Diese dienen primär zur Abwehr von Ameisen [30, 99] und sind auch antimikrobiell wirksam [100]. Aus Markierungsexperimenten ist bekannt, daß diese Verbindungen aus Mevalonsäure *de novo* gebildet werden können [101–103]¹. Als Zwischenprodukt entsteht 8-Hydroxygeraniol [104], das glucosyliert und dann in das Reservoir transportiert wird [105]. Dort finden zwei Vorgänge statt: die Spaltung der glucosidischen Bindung und die Überführung der freien Alkohole durch eine Oxidase in Aldehyde [106–108]. In einem letzten Schritt werden die Iridoide durch eine Cyclase und eine Isomerase gebildet (Abb. 2.7).

2.3.2 Sequestrierung phenolischer Glucoside

Einige Spezies des *Chrysomela* Kladus haben Mechanismen entwickelt, glucosidisch gebundene Metabolite ihrer Wirtspflanze aufzunehmen und für die eigene Verteidigung einzusetzen. Hierbei handelt es sich um aromatische Verbindungen wie Salicin. Diese werden unverändert in das Wehrsekret-enthaltende Reservoir transportiert, wo das Glycon abgespalten und der freie benzyliche Alkohol zu einem Aldehyd enzymatisch oxidiert wird [99, 107, 109, 110].

2.3.3 Gemischte Strategie der Biosynthese

Larven der *Chrysomela interrupta*-Gruppe verfügen über beide oben vorgestellten Arten der Wehrsubstanzgewinnung. Innerhalb dieser Gruppe ist ein Wirtswechsel von Salicaceae (Weiden) auf Betulaceae

¹Siehe dazu auch Abbildung 5.13 auf Seite 40.

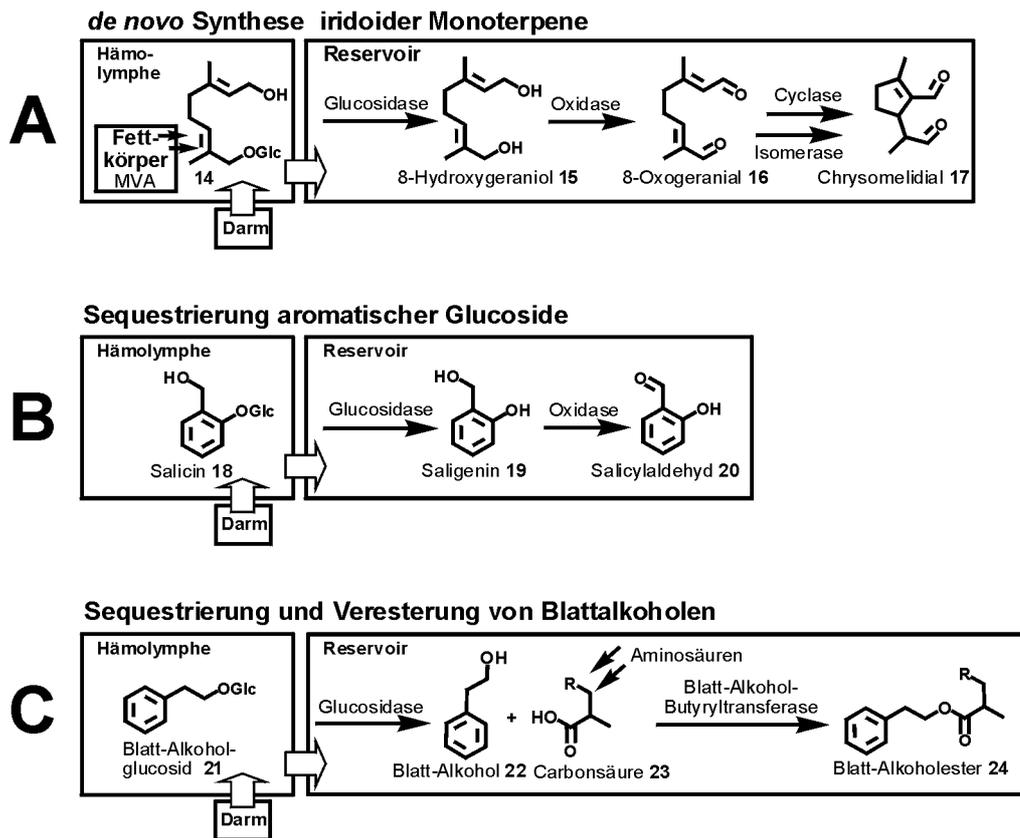


Abbildung 2.7: Biosynthese der Wehrverbindungen im Subtribus *Chrysolina*.

A: *de novo* Synthese iridoider Monoterpene. Glucosidisch gebundenes 8-Hydroxygeraniol **14** kann mit der Nahrung aufgenommen werden oder über den Mevalonat-Weg (MVA) biosynthetisiert und dann ins Reservoir transportiert werden, wo durch Hydrolyse 8-Hydroxygeraniol **15** freigesetzt wird; Oxidation der Alkoholfunktionen bildet den reaktiven Dialdehyd **16** (Dial) und Cyclisierung führt zum Iridoid **17**.

B: Sequestrierung von phenolischen Glucosiden. Metabolite der Wirtspflanze (Salicin **18**) werden über die Nahrung aufgenommen und gelangen ins Reservoir, wo durch Hydrolyse (Saligenin **19**) und Oxidation der Alkoholfunktionen phenolische Aldehyde (Salicylaldehyd **20**) entstehen.

C: gemischte Strategie der Biosynthese. Glucosidisch gebundene Blatt-Alkohole (z. B. glucosidisch gebundener Phenylethanol **21**) der Wirtspflanze werden ins Reservoir transportiert und dort, nach Hydrolyse, zum freien Blatt-Alkohol (Phenylethanol **22**), mit, aus Aminosäuren (Valin, Isoleucin) *de novo* synthetisierten, Carbonsäuren **23** zu Blatt-Alkoholestern **24** umgesetzt.

In allen drei Fällen müssen mindestens zwei Membranen passiert werden: Darm — Hämolymph und Hämolymph — Reservoir.

(Birken) mehrfach unabhängig voneinander erfolgt [88, 89]. Ein eindrucksvolles Beispiel für solch eine Änderung des Wirtes, und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Chemie des Wehrsekretes, liefern Larven von *C. lapponica*, da von diesen Blattkäfern allopatrische Populationen (Weide: Finnland und Frankreich; Birke: Tschechischen Republik) bekannt sind [51].

Die Larven verfügen über eine sehr breite Palette unterschiedlicher Abwehrsubstanzen (69 identifizierte Verbindungen) [91, 111] (Abb. 2.8), deren Zusammensetzung allerdings sehr stark von den Inhaltsstoffen der Wirtspflanze abhängt [44, 112, 113].

Das Sekret auf Weiden lebender finnischer Tiere ähnelt dem von *C. populi* oder anderen typischen Sequestrierern, da es zum größten Teil Salicylaldehyd **20** enthält, den die Larven aus dem Salicin der gefressenen Weidenblätter sequestrieren [114]. In sehr geringen Mengen sind Ester von Blatt-Alkoholen²

²Im Folgenden werden mit Blatt-Alkoholen alle Alkohole in Blättern bezeichnet, die auch Blattalkohol ((3Z)-Hex-3-en-1-

vorhanden, die aus aufgenommenen, glucosidisch gebundenen Alkoholen (Blatt-Alkoholen) der gefressenen Blättern und *de novo* synthetisierter Isobuttersäure oder 2-Methylbuttersäure gebildet werden [112].

Bei in Frankreich gefundenen Tieren wird neben einer großen Menge Salicylaldehyd auch viel Blatt-Alkoholester im Sekret detektiert.

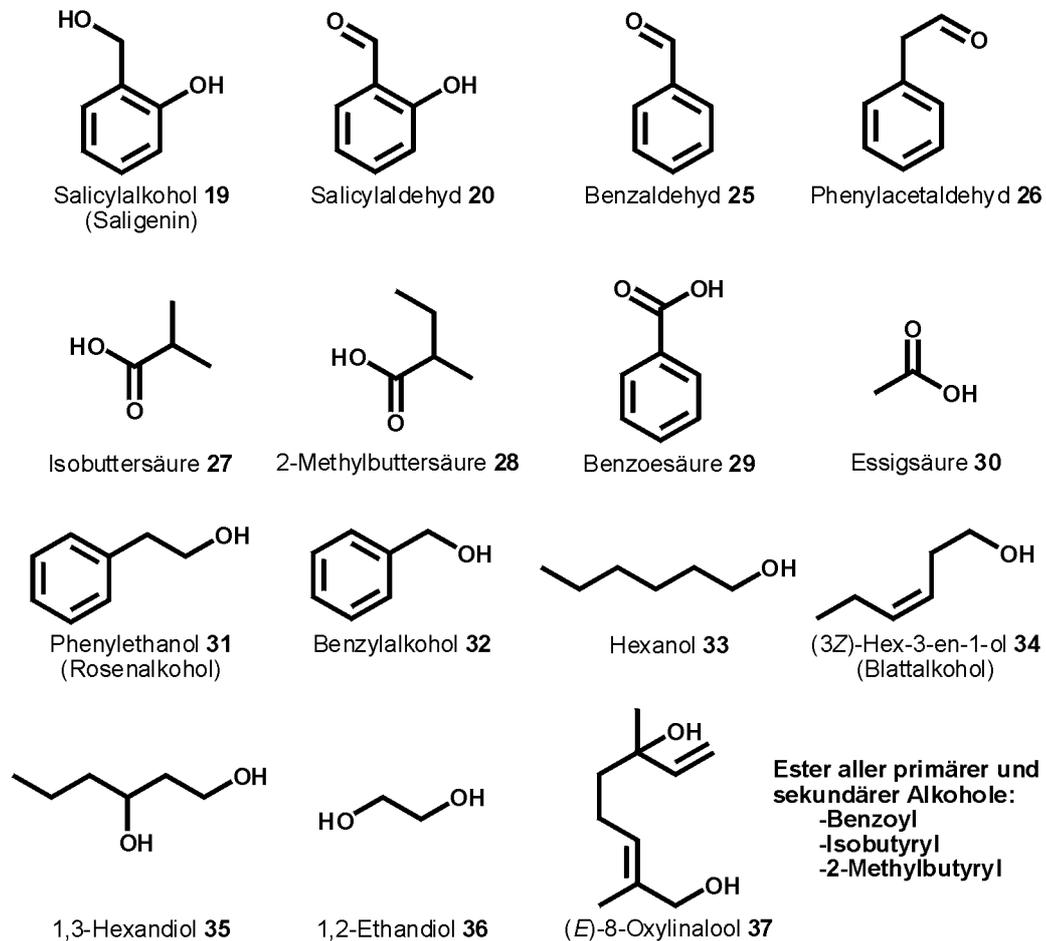


Abbildung 2.8: Substanzen im Wehrsekret von *C. lapponica* Larven (nach Hilker, 1994). Es finden sich Salicylaldehyd 20, der sequestriert wird, daneben Aldehyde wie Benzaldehyd 25 und Phenylacetaldehyd 26. Nachgewiesen sind außerdem Carbonsäuren (Isobuttersäure 27, 2-Methylbuttersäure 28), die aus körpereigenen Aminosäuren hergestellt werden, Benzoesäure 29 und Essigsäure 30, und auch Ester dieser Säuren mit Alkoholen (Phenylethanol 31, Benzylalkohol 32, Hexanol 33, (3Z)-Hex-3-en-1-ol 34, 1,3-Hexandiol 35, 1,2-Ethandiol 36, (E)-8-Hydroxylinalool 37, Saligenin 19), zumeist pflanzlichen Ursprungs.

Bestimmte tschechische Populationen leben auf Birken. Diese *C. lapponica* Larven verfügen nicht über Salicylaldehyd 20 im Wehrsekret, weil Salicin 18 in den Blättern von Betulaceen nicht vorkommt; hier besteht das Sekret aus größeren Mengen an Blatt-Alkoholestern.

Bei *C. lapponica* können die Auswirkungen eines Wirtspflanzenwechsels auf die Zusammensetzung des Wehrsekretes beobachtet werden.

Alle oben bei Lepidopteren und Käfern vorgestellten Sequestrierungsphänomene verlangen verschiedenartige und komplexe Anpassungen des Stoffwechsels der Insekten an die entsprechenden Substanzen. Zum einen müssen Wege gefunden werden, die Verbindungen aufzunehmen und zum Speicherort

ol) beinhalten.

zu transferieren, zum anderen dürfen keine toxischen Substanzen in den Körper des Insektes gelangen und mit eigenen, wichtigen physiologischen Prozessen interferieren. Dies erfordert eine gezielte Aufnahme pflanzlicher Metabolite sowie spezifische Transportmechanismen in geeignete Speicherkapazitäten im Körper des Insektes [115].

Die meisten Untersuchungen von Sequestrierungsprozessen sind phänomenologischer Natur. Nur wenige Arbeiten befassen sich mit dem Transport von Metaboliten auf molekularer Ebene (z. B. [27, 48, 78, 105]).

3 Methoden zur Untersuchung von Transportmechanismen

Transportprozesse spielen in der belebten Natur eine wichtige Rolle. Sowohl bei prokaryotischen als auch bei eukaryotischen Lebewesen müssen Metabolite, die zur Speicherung oder Weiterverarbeitung vorgesehen sind, oder Substrate, die eine physiologische Wirkung erzeugen sollen, vom Ort ihrer Aufnahme, Entstehung oder Bildung an den Ort ihrer Bestimmung transportiert werden.

Dabei muß die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen durchquert werden, deren hydrophobes Inneres als Barriere für den Durchtritt der meisten polaren Moleküle wirkt. Innen- und Außenseiten von Membranen sind stets unterschiedlich, auch findet sich oftmals ein elektrisches Potential [116], was einen Durchtritt nochmals erschweren kann. Die Abgrenzungsfunktion ermöglicht den Zellen, unterschiedliche Konzentrationen von Solventa in verschiedenen Kompartimenten aufrecht zu erhalten [116]. Um diese Barrieren sinnvoll zu nutzen, müssen die Zellen über geeignete Mechanismen verfügen, bestimmte Moleküle oder Ionen durch die Membranen zu schleusen.

Von Interesse sind hier verschiedene Aspekte von Transportphänomenen. In den meisten Fällen läßt sich für ein Substrat mindestens ein Membrandurchtritt feststellen, beispielsweise wird das gleiche Molekül in verschiedenen Kompartimenten eines Organismus gefunden oder Konzentrationsgradienten oder Potentiale werden an Membranen auf- oder abgebaut.

Lipophile Moleküle wie Steroidhormone sind in der Lage, durch einfache Diffusion in Richtung eines Konzentrationsgradienten die Lipiddoppelschicht zu passieren. Die durch Ausgleich von Konzentrationsunterschieden vermehrte Entropie sorgt für die benötigte Energie [117]. Anorganische Ionen und wasserlösliche, organische Moleküle hingegen werden mittels Transportproteinen durch die Membran geschleust. Dabei können auch Ionengradienten von Ionen wie Na^+ die Energie für den Membrandurchtritt durch erleichterte Diffusion über spezielle Kanäle (passiver Transport) liefern. Daneben gibt es noch Transportprozesse, die Konzentrationsgradienten entgegengesetzt verlaufen. Für diesen aktiven Transport muß Freie Enthalpie aufgewendet werden, die aus dem gleichzeitigen Abbau anderer Gradienten oder aus

energiereichen Verbindungen, wie der Hydrolyse von ATP, stammen kann [116].

Zur Untersuchung, ob ein Transportphänomen aktiver oder passiver Natur ist, bedarf es geeigneter Sonden. Diese sollten den betrachteten Transport möglichst wenig stören oder verändern. Außerdem sollten sie gut zu detektieren sein, sei es durch optische Methoden wie Fluoreszenzmarkierung oder Messung der UV Absorption oder durch chemisch-analytische Methoden, wie Massenspektroskopie, oder physikalische Methoden, wie z. B. Messung von Potentialen beim Patch Clamping. Zudem sollten Transportsonden leicht verfügbar, d. h. kommerziell erhältlich oder verhältnismäßig leicht herzustellen sein.

Oftmals werden Glycosidtransporter molekulargenetisch untersucht. Hierdurch sind Aussagen über Primär- und Sekundärstruktur von Transportproteinen und Identifikation von in den Transportern involvierten Aminosäuren möglich.

Das Problem, welche molekularen Parameter des Substrats den Transport ermöglichen, welche strukturellen Anforderungen erfüllt sein müssen und welche Strukturen und chemische Funktionalitäten den Transport zusammenbrechen lassen, läßt sich nur auf chemischem Wege klären [118, 119].

Als geeignete Sonden bieten sich mit stabilen Isotopen wie Deuterium und ^{13}C markierte Verbindungen an. Der Einbau der schwereren Isotope muß im Falle von Deuterium selbstverständlich an nicht aziden Stellen im Molekül passieren, damit die Markierung nicht durch Austauschreaktionen mit Protonen aus der Umgebung verloren geht. Der Einbau sowohl von Deuterium als auch von Kohlenstoffisotopen im Glycon oder Aglycon eines Zuckers erfordert oftmals erheblichen synthetischen Aufwand. Vorteilhaft ist, daß dabei die chemischen Eigenschaften der Verbindung nicht verändert werden und es immer selektive Nachweisverfahren wie ^{13}C -NMR und MS gibt [120, 121].

Synthetisch genauso anspruchsvoll ist die Isotopenmarkierung mit radioaktiven Isotopen wie Tritium. Der Nachweis radioaktiv markierter Verbindungen ist recht empfindlich. Als Voraussetzung müssen Labore über entsprechende Sicherheitsvorkehrungen verfügen.

Eine weitere Möglichkeit zur Markierung besteht darin, die Sauerstoffbrücke in Glycosiden durch andere Atome auszutauschen [122]. Der Ersatz durch Kohlenstoff führt zu sehr stabilen C-Glycosiden [123–125]. Als Vorteil der eingebauten Methylengruppe erweist sich die Ähnlichkeit zum Sauerstoffatom bezüglich Bindungswinkel und Größe. Nachteilig wirkt sich das Fehlen von freien Elektronenpaaren aus, weshalb keine *O*-typischen Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen werden können [126]. Die Synthese solcher Verbindungen kann mitunter recht anspruchsvoll sein. Weniger schwierig ist es, anstelle des Sauerstoffs eine Stickstoffbrücke ins Molekül einzubringen, wobei allerdings, bedingt durch die freien Elektronenpaare am Stickstoff, mit erhöhter Reaktivität des *N*-Glycosids gerechnet werden muß.

Einen guten Kompromiß zwischen Reaktivität, struktureller Ähnlichkeit und Synthesaufwand bieten Thioglycoside [127].

3.1 Thioglycoside

Bei Thioglycosiden handelt es sich um Verbindungen, bei denen das Glycon und das Aglycon anstatt über eine Sauerstoffetherbrücke mittels einer Thiobrücke miteinander verbunden sind [126].

Thioglycoside sind natürlich vorkommenden *O*-Glycosiden in chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich [128]. Allerdings ist Schwefel deutlich größer als Sauerstoff und weniger elektronegativer, was zur Folge hat, daß Bindungen im Vergleich zum leichteren Homologen weniger polarisiert und länger sind. Ein anderer wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Chalkogenen besteht in der deutlich geringeren Neigung von Schwefel zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Abbildung 3.1 zeigt, daß die Einführung von Schwefel in Salicin nur wenige Auswirkungen auf die Struktur hat. Lediglich die Bindungslängen ($C_{\text{ar}} - \text{O} = 1,39 \text{ \AA}$ und $C_{\text{Glc}} - \text{O} = 1,41 \text{ \AA}$; $C_{\text{ar}} - \text{S} = 1,77 \text{ \AA}$ und $C_{\text{Glc}} - \text{S} = 1,80 \text{ \AA}$) und -winkel ($\angle(C_{\text{ar}} - \text{O} - C_{\text{Glc}}) = 117,7^\circ$, $\angle(C_{\text{ar}} - \text{S} - C_{\text{Glc}}) = 102,4^\circ$) der Brücke sind leicht verändert [129].

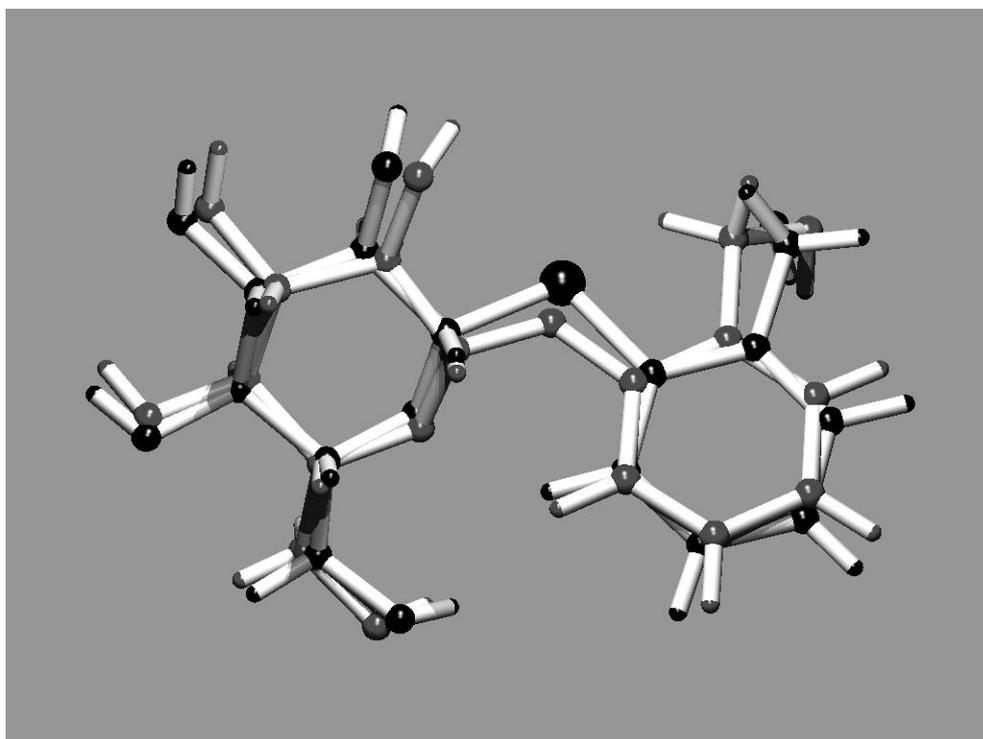


Abbildung 3.1: Superposition der Kristallstrukturen von Salicin **18** (graue Atome) und Thiosalicin **38** (schwarze Atome). (B. K. Feld).

Diese Verbindungen wurden ursprünglich in der Pharmakologie zur Inhibierung von Enzymen oder Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt [128, 130–132]. Der große Unterschied zu *O*-Glycosiden besteht in der Beständigkeit gegenüber hydrolysierenden Enzymen wie beispielsweise Glucosidasen [133].

Für diese Arbeit bedeutet das: durch Analyse von verschiedenen Geweben lassen sich Transportwege nachverfolgen, da die strukturanalogen Thioglycoside zwar transportiert aber nicht gespalten werden. Im Gegensatz zu den hydrolysierten und daher nicht unmittelbar nachweisbaren Sauerstoffanalogen reichern sich die Schwefelverbindungen also in dem betreffenden Gewebe an, was leichte Analyse und Quantifi-

zierung ermöglicht [134].

Beim praktischen Einsatz an Ratten [134] und bei der Fütterung von Thioglycosiden an Insekten [129] zeigen sich keine toxischen Eigenschaften sowie keine Inhibierung von Transportprozessen. Das Fraßverhalten von Blattkäferlarven wird nicht wesentlich beeinflusst (Abschn. 9.2.1). Weitere Vorteile von Thioglycosiden sind die leichte synthetische Zugänglichkeit durch Koenigs-Knorr- [135–137] oder Mitsunobu-Kopplung [138, 139] und die gute Quantifizier- und Detektierbarkeit mittels LC-MS.

II Hauptteil

4 Aufgabenstellung

4.1 Untersuchung von Transportmechanismen bei Blattkäferlarven (Coleoptera: Chrysomelidae)

Blattkäferlarven der Subfamilie Chrysomelinae haben im Verlauf ihrer Abstammungsgeschichte mehrfach unabhängig voneinander Fähigkeiten zur Sequestrierung von glycosidisch gebundenen Pflanzenmetaboliten entwickelt. Aus vorangegangenen Arbeiten [129] ist bekannt, daß die Spezies, die *de novo* Synthese von iridoiden Monoterpenen betreiben, auch befähigt sind, Vorstufen der eigenen Wehrverbindungs-Biosynthese (8-Hydroxygeranylglucosid **14**, Abb. 2.7 A), wenn diese in den Pflanzen vorkommen, unverändert mit der Nahrung vom Darm ins Reservoir zu transportieren. Die Spezies, von denen Sequestrierung ihrer Wehrchemie angenommen wird (*Chrysomela* Kladus), nehmen unterschiedliche Glucoside ihrer Wirtspflanze auf. Meistens wird Salicin **18** sequestriert, wobei im Reservoir Salicylaldehyd **20** gebildet wird (Abb. 2.7 B). Larven der sogenannten *C. interrupta*-Gruppe nehmen Glucoside von Blatt-Alkoholen, wie Phenylethanol **31**, Benzylalkohol **32** oder (3Z)-Hex-3-en-1-ol **34** auf und verestern diese mit *de novo* gebildeten Carbonsäuren zu entsprechenden Blatt-Alkoholestern **24** (Abb. 2.7 C). Bei allen drei Typen der verschiedenen Wehrsubstanzen (Iridoide, aromatische Aldehyde, Blatt-Alkoholester) müssen mindestens zwei Membranen, nämlich die, die den Darm von der Hämolymphe trennt und die, die Hämolymphe und Reservoir voneinander scheidet, passiert werden.

Welche molekularen Parameter bei diesen Transportvorgängen eine Rolle spielen, und ob es sich dabei um einen aktiven oder um einen passiven (beispielsweise durch Diffusion) Transport handelt, ist nicht bekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die Art des Transportes der glycosidisch gebundenen Metabolite (aktiv oder durch Diffusion) charakterisiert und zudem geklärt werden, welche strukturellen Elemente oder physikalischen Eigenschaften des Substrates überhaupt einen Transport ermöglichen.

Hierzu werden die thioanalogen Glucoside natürlicher Metabolite, wie Thiosalicin **38**, und die Thio-glucoside von 8-Hydroxygeraniol **66** und verschiedener Blatt-Alkohole synthetisiert, aber auch Analoga insbesondere des Thiosalicins hergestellt, die von ähnlicher Struktur sind und vergleichbare physikalische Eigenschaften, wie die Polarität und den Diffusionskoeffizienten, besitzen.

Ziel dieses Teils der Arbeit soll es somit sein, in allen drei Gruppen von Blattkäferlarven (*de novo* Synthetisierer, Sequestrierer und *C. interrupta*-Gruppe) die Transportfähigkeiten für Glycoside in den Larven zu charakterisieren. Die Bedeutung von Transportsystemen für die evolutive Entstehung chemisch so deutlich unterschiedlicher Wehrsubstanzen im Sekret der Larven soll geklärt und hieraus soll ein Modell entwickelt werden, wie und unter welchen Voraussetzungen sich der Transportprozeß im Verlauf der Evolution verändert haben könnte.

In diesem Kontext soll auch untersucht werden wo die Biosynthese von Iridoiden in archetypischen Blattkäferlarven zu lokalisieren ist.

4.2 *de novo* Synthese und Sequestrierung im *Chrysomela*-Kladus – Untersuchung des acylierenden Enzyms bei *C. lapponica*

Bei Larven der *C. interrupta*-Gruppe ist bekannt, daß diese in ihrem Wehrsekret über Ester (Isobutyrate und 2-Methylbutyrate) verfügen. Diese Butyrate werden aus sequestrierten, glucosidisch gebundenen Blatt-Alkoholen der Wirtspflanze und Carbonsäuren, aus Aminosäuren (Valin, Isoleucin) *de novo* synthetisiert, gebildet [112]. Im Sekret der Larven finden sich nur wenige Enzyme im Vergleich zur Hämolymphe. In der Literatur [110] sind eine Oxidase und eine Glucosidase beschrieben, die übrigen Proteine im Sekret sind unbekannt. Fraglich ist auch, ob die Biosynthese Wehrverbindungen sich im Sekret oder an anderer Stelle im Körper der Larve vollzieht. Der Verlauf der Synthese dieser Ester ist unbekannt.

Es soll geklärt werden, ob die Ester im Sekret von *C. lapponica* im Körperinnern der Larve oder im Reservoir entstehen, ob bei der Transformation von Alkoholen zu Estern ein Enzym beteiligt ist und welche Substrate dieses akzeptiert.

Es soll untersucht werden, ob die Alkohole im Sekret der Larven ausschließlich pflanzlichen Ursprungs sind, da einige Verbindungen, wie Benzoesäure **29** und Essigsäure **30**, keine glucosidisch gebundene Pendants in der Wirtspflanze besitzen bzw. dort nur in geringeren Mengen vorkommen. Durch Fütterung isopenmarkierter Aminosäuren könnte, bedingt durch den Einbau der Isotope in Wehrsubstanzen, geklärt werden, ob Verbindungen auch vollständig *de novo* synthetisiert werden können.

Gegenstand von Untersuchungen dieser Arbeit soll auch sein, welche sequestrierenden Spezies zur eigenen Biosynthese befähigt sind und welche pflanzliche Metaboliten aufzunehmen vermögen.

Darüberhinaus soll geklärt werden, welchen Einfluß bei der Biosynthese von Wehrverbindungen involvierte Enzyme und Transportmechanismen auf die Evolution dieser Tiere haben.

Die erzielten Ergebnisse sollen letztendlich als Diskussionsgrundlage dienen, ob die *de novo* Synthese der archetypische Mechanismus ist und die Fähigkeit zur Sequestrierung sich erst später hieraus entwickelt hat und die modernste Art der Biosynthese der gemischte Mechanismus ist, wie bisher angenommen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Transportuntersuchungen mittels Thioglycosiden

Die Biosynthese von Wehrverbindungen bei Blattkäferlarven des Subtribus Chrysomelina (Abschn. 2.3) benötigt mindestens zwei Transportschritte durch Membranen. Derartige Transportphänomene lassen sich gut mit Thioglycosiden (Abschn. 3.1) untersuchen.

Zur Durchführung der Experimente war es nötig, eine breite Palette verschiedener Substanzen, die Thioanaloga natürlicher Metabolite, aber auch Derivate dieser Verbindungen, in ausreichender Menge und Reinheit herzustellen. Diese Thioglycoside wurden dann durch Imprägnierung der Wirtspflanzen den Tieren verfüttert, dann nach bestimmten Zeitintervallen die Konzentrationen in Hämolymphe und Sekret bestimmt.

5.1.1 Synthesen und Reinigung der Stoffwechselsonden

Zur Darstellung phenolischer Thioglycoside hat sich eine Variante der Koenigs-Knorr-Reaktion [136] (Tab. 5.1) als geeignet erwiesen. Die Synthese von thioanalogen Blatt-Alkoholglycosiden war mit einer Mitsunobu-Kupplung [139] (Tab. 5.2) schnell und effizient möglich. Die acetylierten Zwischenprodukte wurden mit Methanolat oder Lithiumaluminiumhydrid entschützt (Tab. 5.3). In beiden Fällen hat eine zweistufige, bei dem 8-Hydroxygeranylderivat eine dreistufige Synthese zu den gewünschten Produkten geführt.

Tabelle 5.1: Synthetisierte phenolische Thioglycoside (Prod.), Ausbeuten in %, sowie eingesetztes Glycon (Gly.) und Aglycon (Agly.).

39	R ¹ = H, R ² = OAc	41 - 48		49 - 58		
40	R ¹ = OAc, R ² = H					
Nr.	Gly.	Agly.	X	R ³	Prod.	[%]
1	39	41	S	Ph-	49	92
2	39	42	S	2-CH ₃ -Ph	50	85
3	39	43	S	3-CH ₃ -Ph	51	83
4	39	44	S	4-CH ₃ -Ph-	52	84
5	39	45	S	2-HOCOCH ₃ -Ph-	53	84
6	39	46	S	3-HOCOCH ₃ -Ph-	54	93
7	39	47	S	4-HOCOCH ₃ -Ph-	55	63
8	39	48	S	4-Methylcumarin-7-yl	56	82
9	39	48	O	4-Methylcumarin-7-yl	57	60
10	40	45	S	2-HOCOCH ₃ -Ph-	58	50

Tabelle 5.2: Synthetisierte Thioglycoside (Prod.) nach Mitsunobu, Ausbeuten in % , sowie eingesetzte Alkohole (Alk.).

Nr.	Alk.	R-OH	Prod.	[%]
1	31	Ph-CH ₂ CH ₂ -OH	61	55
2	32	Ph-CH ₂ -OH	62	69
3	34	(3Z)-Hex-3-en-1-ol	63	82
4	60	8-Hydroxygeranylacetat ^a	64	79

^a Hergestellt durch Oxidation von Geranylacetat **65** mit SeO₂ [129, 140].

Die Reinigung der Substanzen erfolgte anfänglich mittels MPLC, später mittels High Speed Counter-current Chromatography (HSCCC), da mit der Gegenstromchromatographie gleich gute Produktreinheiten, bei deutlich reduziertem Lösungsmittel- und Zeitaufwand, erzielt werden konnten. Alle synthetisierten Thioglycoside sind mit Ausbeuten in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Entschützung aller synthetisierten Thioglycoside.

Verb.	R ¹	R ²	R ³	X	[%]
38^a	H	OH	2-HOCH ₂ -Ph	S	50
66^b	H	OH	8-Geranyl	S	72
67^b	H	OH	(3Z)-Hex-3-en-1-yl	S	67
68^b	H	OH	Ph-(CH ₂) ₂ -	S	96
69^b	H	OH	Ph-CH ₂ -	S	96
70^b	H	OH	4-CH ₃ -Ph-	S	96
71^b	H	OH	3-CH ₃ -Ph-	S	99
72^b	H	OH	2-CH ₃ -Ph-	S	98
73^b	H	OH	Ph-	S	63
74^a	H	OH	4-HOCH ₂ -Ph-	S	57
75^a	H	OH	3-HOCH ₂ -Ph-	S	40
76^b	H	OH	4-Methylcumarin-7-yl	S	99
77^b	H	OH	4-Methylcumarin-7-yl	O	0 ^c
78^a	OH	H	2-HOCH ₂ -Ph-	S	57

^a Entschützung mit LiAlH₄ [129].

^b Entschützung mit NaOCH₃.

^c Das Produkt färbt sich an Luft und Licht schnell braun und zerfällt.

5.1.2 Synthese acylierter Glycoside

Larven von *C. lapponica* sind in der Lage, primäre und sekundäre Alkohole zu verestern (Abschn. 5.4.2), wodurch auch Thioglycoside, vor allem an Position 6 des Zuckers, acyliert werden. Zur Quantifizierung der Verbindungen mittels HPLC-MS, war es nötig Referenzen zu synthetisieren. Dazu wurden Vinylbutyrate von Isobuttersäure **27** und 2-Methylbuttersäure **28** durch Umesterung von Vinylacetat hergestellt [141–143], und die Produkte in einer enzymatischen Reaktion mit einer Lipase von *Candida antarctica* (Novozym©435) erzeugt [144–151]. Synthetisierte in 6-Position acylierte Glucoside sind in Tabelle 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.4: Synthese acylierter Glycoside.

Nr.	Subst.	X	R ¹	R ²	Prod.	[%]
1	18	O	2-HOCH ₂ -Ph-	CH ₃ -	79	80
2	72	S	2-CH ₃ -Ph-	(CH ₃) ₂ CH- ^a	80	2
3	67	S	(3Z)-Hex-3-en-1-yl	(CH ₃) ₂ CH- ^a	81	<1

^a Synthese der Vinylbutyrate durch Umesterung von Vinylacetat in Gegenwart von Hg(II)(AcO)₂ [141].

5.1.3 Synthese von Referenzestern

Sekret von *C. lapponica* Larven wurde mit Alkoholen umgesetzt (Abschn. 5.4.2). Zur Identifizierung der gebildeten Ester im GC-MS-Chromatogramm wurden Referenzsubstanzen hergestellt (Tab. 5.5).

Tabelle 5.5: Synthese von Referenzestern.

Nr.	R ¹	R ²	Prod.	[%]
1	H	1-Heptanyl	82	96
2	H	2-Heptanyl	83	45
3	H	3-Ethyl-3-pentanyl	84	<1
4	CH ₃ -	1-Heptanyl	85	99
5	CH ₃ -	2-Heptanyl	86	41
6	CH ₃ -	3-Ethyl-3-pentanyl	87	<1

5.1.4 Analytische Methodenentwicklung

Zur Identifizierung und Quantifizierung von gefütterten Thioglycosiden in der Hämolymphe und im Sekret von Larven erfolgte die Untersuchung der Proben mittels LC-MS, die Identifikation der jeweiligen Substanz durch die Retentionszeit und das Massenspektrum. Eine Quantifizierung war durch Aufnahme von Eichgeraden für alle getesteten Substanzen möglich. Peakflächen des HPLC-Chromatogramms bzw. des MS-Chromatogramms der analysierten Substanzen wurden zusammen mit den jeweiligen Steigungen der Eichgeraden in Gleichung (Gl. 5.1) eingesetzt, wodurch sich die Konzentration im Sekret bzw. der Hämolymphe (c_S) ermitteln ließ:

$$c_S = \frac{V_A}{V_E} \cdot a \cdot \frac{V_R}{m_S} \cdot \frac{A}{m} \cdot u \quad (\text{Gl. 5.1})$$

V_A ist das Volumen der Anfangslösung, V_E das eingespritzte Volumen, a ist der Verdünnungsfaktor der Probe, V_R der Faktor zur Korrektur des injizierten Volumens (hier $30 \mu\text{l}$), m_S die Masse des abgenommenen Sekretes, A ist die gemessene Peakfläche (in derselben Einheit, wie die Steigung der Eichgeraden, die durch den Buchstaben m repräsentiert wird) und u ist ein Faktor zur Umrechnung der Einheiten. Linearität der Eichgeraden kann für Messungen von $0,05 \text{ mM}$ Lösungen ($30 \mu\text{l}$ Injektionsvolumen) bis 10 mM Lösungen ($3 \mu\text{l}$ Injektionsvolumen) gewährleistet werden. In diesem Konzentrationsbereich waren die Standardabweichungen verhältnismäßig klein. Bei verdünnteren Lösungen sind die Substanzpeaks nicht mehr leicht vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden und bei stark konzentrierten Lösungen wird die Kapazität der Säule überschritten, wodurch die Peaks nicht mehr symmetrisch werden. Das Limit der eingesetzten Detektoren (UV, MS) liegt ebenfalls in dem genannten Bereich, was sich z. B. in einer asymptotisch verlaufenden Eichkurve äußert. Die UV-Absorption bei 224 und 254 nm , die Gesamtionenintegration (TIC), sowie die Integration der intensivsten Ionen (SIM) (Abschn. 8.5.1) wurde in jedem einzelnen Fall betrachtet und auf Konsistenz der Werte überprüft. Hierbei sollten die Mittelwerte aller Messungen innerhalb der Fehlergrenzen liegen. Diese Grenzen ließen sich durch eine Rechnung der Fehlerfortpflanzung für mittlere Fehler nach Gauß für eine Funktion $y = f(x_1, \dots, x_n)$ nach Gleichung (Gl. 5.2) abschätzen [152], wobei s_{x_i} die Standardabweichung der Größe ist:

$$s_y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 s_{x_i}^2} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Als Standardabweichungen wurden hierbei entweder kleinste ablesbare Einheiten oder Fehler laut Datenblättern der Gerätehersteller, für die integrierten Peaks die Standardabweichungen für mehrfache Integrationen desselben Peaks angenommen. Am meisten fehlerbehaftet sind die Massebestimmungen (bis zu ca. 10% bei Sekretmengen $< 50 \mu\text{g}$) und die Integrationen der Peaks und damit auch die Steigung der Eichgeraden (bis zu ca. 5% bei wenig Thioglycosid in der Probe). Nach Einsetzen aller angenommenen Fehler und Ableitungen in obige Gleichung (Gl. 5.2) zur Fehlerrechnung ergibt sich ein abgeschätzter Fehler für die Messungen von bis zu ca. 50 nM Thioglycosid pro mg abgenommenem Sekret. Da die Massebestimmungen des Sekretes von *H. marginella* nur mit einer Analysenwaage ($d=0,1 \text{ mg}$) durchgeführt

werden konnten, lag hier der Fehler teilweise noch darüber (Abschn. 8.4). Für die Hämolymphe-messungen ergaben sich Fehler von bis zu ca. 10 nM Thioglycosid pro mg abgenommener Hämolymphe. Innerhalb dieser Fehlergrenzen waren UV- und MS-Messungen konsistent, jedoch lagen die gemessenen Werte für die Hämolymphe innerhalb dieses Bereiches. Die Anzahl der Messungen, die auf statistischem Wege eine höhere Genauigkeit gewährleisten hätten, ließ sich allerdings nicht steigern, da hierfür nicht genügend Tiere zur Verfügung standen.

Die im Folgenden angegebenen Thioglycosidkonzentrationen sind durch Integration der intensivsten Ionen ermittelt, was auch bei Substanzen ohne Chromophor problemlos möglich war und verlässliche Werte lieferte. Dieses Verfahren versagte allerdings bei der Untersuchung des Sekretes von *C. lapponica* (Abb. 5.2), bei der die Gesamtionenintegration angegeben wird, da die acylierten Thioglycoside deutlich unterschiedliche Intensitäten der einzelnen Ionen, aber ähnliche Gesamtionenintegrationen wie die unveränderten Thioglycoside aufweisen. In beiden Fällen zeigt der Vergleich mit den Werten aus den UV-Messungen, daß die MS-Werte innerhalb der Fehlergrenzen ähnliche Ergebnisse liefern.

In Chromatogrammen ist ein deutlicher Peak sowohl im UV (224 nm, 254 nm) der HPLC als auch bei der Betrachtung des MS-Laufes (TIC und SIM) zu beobachten. Dieser Peak kann leicht mittels des Fragmentierungsmusters als das zu analysierende Thioglycosid identifiziert werden. Im APCI-Modus läßt sich stets der sukzessive Verlust von bis zu fünf Hydroxygruppen in Form von Wasser, außerdem gut das protonierte Pyranosylkation und, weniger deutlich, das Kation des Aglycons + H beobachten.

Abbildung 5.1 zeigt einen typischen MS-Lauf und das Massenspektrum bei der Analyse von Thioglycosiden.

Nach Fütterung von Thiosalicylalkohol sind die Proben zusätzlich noch mittels GC-MS untersucht worden. Es ließ sich allerdings kein Thioalkohol in der Hämolymphe oder im Sekret nachweisen.

5.1.5 Züchtung der Käferlarven

Alle Spezies konnten in Weinschränken bei Temperaturen zwischen 18° und 20° C mit einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 h gehalten werden, *P. cochleariae* und *G. viridula* auch im Labor (ca. 23° C und Tag/Nacht Rhythmen entsprechend der Jahreszeit) (Abschn. 9.1). Letztere waren unproblematisch zu füttern, da Chinakohl (*Brassica pekinensis*) ganzjährig in Supermärkten angeboten wird und *Rumex* Pflanzen in der Umgebung des Institutes reichlich in der Zeit von April bis November wachsen.

Alle Spezies, die auf Pappeln (*Populus*) oder auf Hahnenfußgewächsen (*Ranunculus*) leben, wurden von Jacques Pasteels (Abschn. 9.1) gesammelt und direkt nach Jena verfrachtet. Für das Überleben der gesammelten Eier oder jungen Larven war es wichtig, diese möglichst schnell zu transportieren und bei Ankunft sofort mit frischer Nahrung und Wasser zu versorgen. Transportzeiten von mehr als zwei Tagen führten insbesondere im Sommer zu sehr hoher Mortalität der Larven und Eier.

Die Fütterung mit den Wirtspflanzen war bei den meisten Spezies unproblematisch, bis auf die Larven von *C. populi*, die besondere Ansprüche an die Qualität der Blätter stellten. Diese Tiere fressen nur junge Blätter ausgesuchter Bäume der richtigen Wirtspflanzenspezies (z. B. *Populus canadensis*), ein Vorkosten der Blätter auf Geschmack und Konsistenz ist hier empfehlenswert.

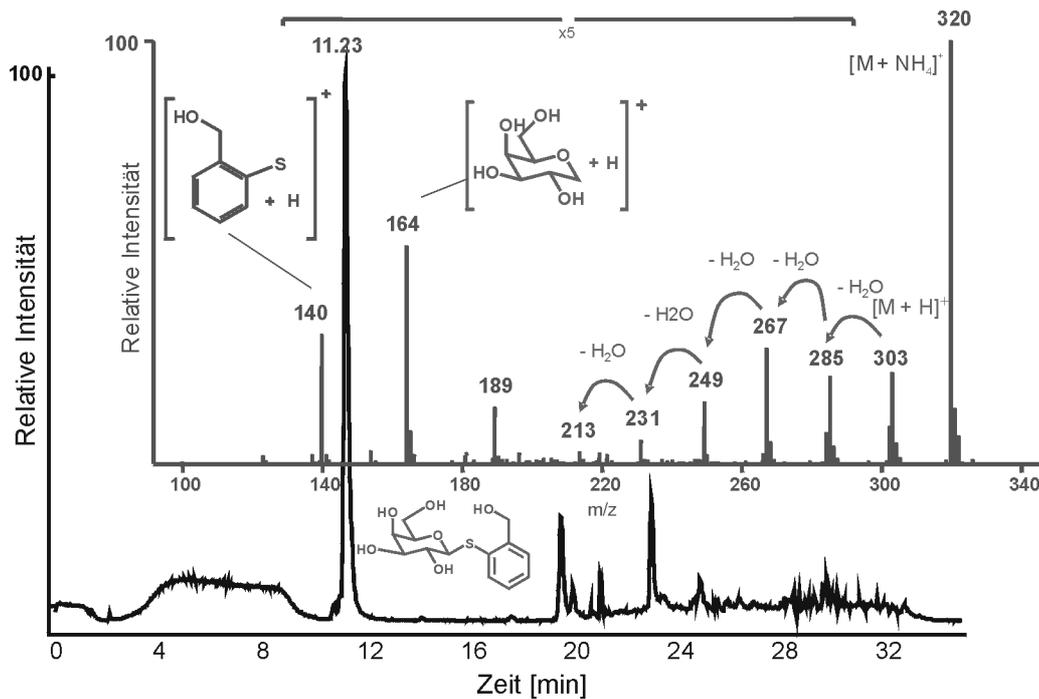


Abbildung 5.1: TIC-Chromatogramm und Massenspektrum (APCI) von Verbindung **78**. Der Peak bei der Retentionszeit von 11.23 kann aufgrund des Massenspektrums dem gefütterten Thioglycosid zugeordnet werden. Hauptfragmente sind die quasimolekularen Ionen $[M + NH_4]^+$ (320) und $[M + H]^+$ (303). Gut erkennbar ist der Verlust von fünf Wassermolekülen (285, 267, 249, 231, 213) sowie das Pyranosylkation (164), im Gegensatz zum oftmals nur schwach erkennbaren protonierten Kation des Aglycons (140).

5.1.6 Sekret- und Hämolymphegewinnung

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Größe der Larvenspezies (Länge 3-20 mm) geben diese verschiedene Mengen an Sekret. Dieses Sekret ist am besten im Versuchs- oder Zuchtbehältnis abzunehmen, da bei jeder Berührung, also auch beispielsweise beim Transfer von imprägnierten Blättern unter ein Mikroskop, die Larven ihre Reservoirs ausstülpen und damit leicht Sekret durch Berührung mit der Pinzette verloren gehen kann. Außerdem werden die Tiere durch das Licht des Mikroskops und die taktile Störung leicht „nervös“ und bewegen sich deutlich mehr, als wenn sie ungestört normalen Lichtverhältnissen ausgesetzt werden, beides erschwert nochmals die Abnahme von Sekret. Nur bei der sehr kleinen Spezies *Hydrotassa marginella* empfiehlt sich eine Sekretabnahme unter dem Mikroskop, da die Tiere derart klein sind, daß die Sekrettröpfchen mit bloßem Auge kaum zu erkennen sind.

Sekret wurde mit käuflichen Borosilikatkapillaren¹ mit 0,67 mm Außendurchmesser und 0,234 mm Wandstärke abgenommen. Diese Kapillaren haben sich durch die symmetrische Geometrie und kantenlose Verarbeitung als vorteilhaft erwiesen, da sie leicht gewogen werden können und die Tiere nicht verletzen.

Die abgenommenen Sekretmengen von 10–1500 μg wurden mit einer Mikrowaage (Abschn. 8.4) bestimmt. Für die anfänglichen Experimente stand ein solches Gerät nicht zur Verfügung, was sich auch bei den Meßwerten, insbesondere von *H. marginella*, in höheren Standardabweichungen widerspiegelt. Hier ist, wie in vorhergegangenen Arbeiten beschrieben [129], durch mehrfache Wiederholung der Massebe-

¹Firma Hilgenberg

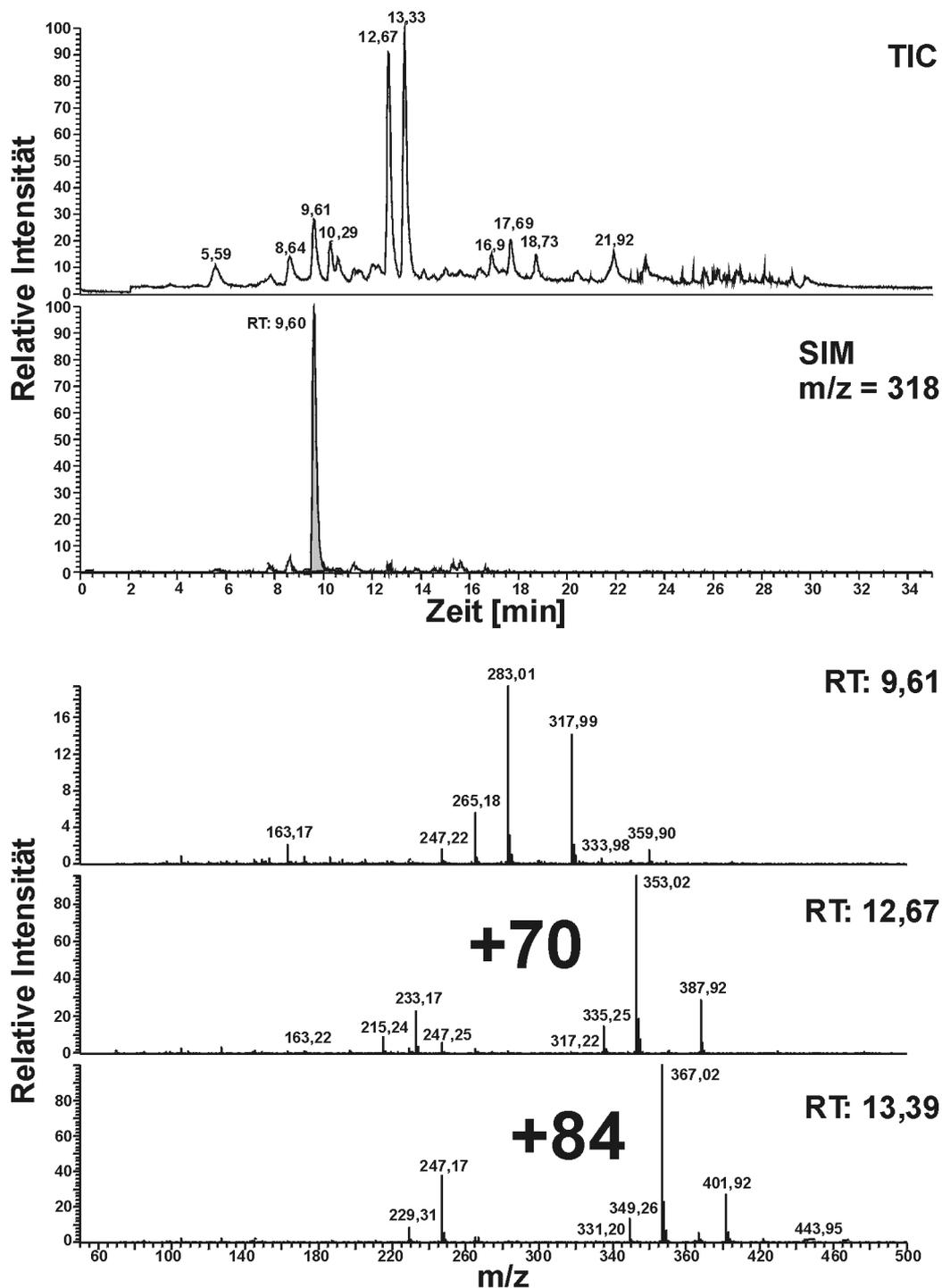


Abbildung 5.2: MS-Chromatogramm und Spektren von *C. lapponica* 48 h nach Fütterungsbeginn mit **68**. Bei einer Retentionszeit von 9,61 min findet sich die eingesetzte Substanz, bei 12,67 und 13,39 min die korrespondierenden Ester, die aus den Spektren durch die Verschiebung der Peaks um 70 bzw. 84 m/z (entsprechend Isobutyryl- bzw. 2-Methylbutyrylrest) abgeleitet werden können. Gezielte MS-Messungen dieser Derivate ließen aufgrund des Fragmentierungsmusters auf eine Acylierung an 6-Position des Zuckers vermuten.

stimmungen des Sekretes eine Kompensation versucht worden.

Die Abnahme der Hämolymphe erfolgte zu Anfang von, durch kurzzeitiges Einfrieren getöteten, Tieren. Dabei wurde den Larven mit einer Schere ein Bein abgeschnitten und die austretende Hämolymphe mit Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm aufgenommen und gewogen. Für diese Messungen war eine Analysenwaage vollkommen ausreichend, da die Mengen an Hämolymphe sich im Milligrammbereich bewegten. Mit zunehmender Geschicklichkeit konnte auch den lebenden, nicht eingefrorenen Tieren Hämolymphe abgenommen werden, indem mit einer Schere ein kleiner Schnitt zwischen Thorax und dem oberstem Glied eines Beines gesetzt und die austretende Hämolymphe, wie oben beschrieben, gesammelt wurde.

Mögliche Kontaminationen durch auf den Larven befindliche Testsubstanz schien bei vorsichtiger Arbeitsweise kein Problem zu sein, da Sekret nur in Form von Tröpfchen eingesammelt wurde, also bevor sich das Sekret über den Körper der Larve ausbreitete und damit in Kontakt mit Testsubstanz von Außen kommen konnte. Das Gleiche gilt auch für die Abnahme von Hämolymphe, die bei geschickter Operation als Tröpfchen austrat und somit nicht in Kontakt mit der Haut der Tiere kam.

5.1.7 Transportkinetik von Thiosalicin

Es ist in früheren Fütterungsexperimenten gezeigt worden [129], daß Thioglycoside für die untersuchten Insekten prinzipiell nicht giftig sind, da diese Substanzen die Entwicklung von Larven nicht nachteilig beeinflussen. Außerdem scheinen Larven von *C. populi* unbehandelte Blätter ebenso zu fressen wie Blätter, die mit Thiosalicin **38** imprägniert wurden (Abschn. 9.2.1).

Die Kinetik aus den Fütterungsversuchen (Abb. 5.3) zeigt deutlich das Ansteigen der Konzentration an Thiosalicin **38** im Sekret mit der Zeit. Bereits nach 2 h ist das gefütterte Substrat im Sekret deutlich nachweisbar und die Konzentration steigt steil an, bis nach 16 Stunden eine Sättigung erreicht wird. Die Konzentration in der Hämolymphe bleibt über den gesamten Zeitraum in etwa gleich niedrig (< 10 nmol/mg). Auf eine statistische Auswertung dieser Werte wurde verzichtet, da die Konzentrationen zu niedrig sind, um zuverlässige Integrationen der Peaks durchzuführen. Das Hintergrundrauschen liegt sowohl bei den UV-Messungen als auch bei den durch Massenspektroskopie ermittelten Werten bereits in derselben Größenordnung wie die Peaks (Abschn. 5.1.4). Die angegebenen Werte spiegeln somit möglicherweise fehlerbehaftete Konzentrationsmessungen der Hämolymphe wider. Immerhin zeigen sie, daß Thiosalicin **38** zwar gut nachweisbar ist, aber im Vergleich zu den Konzentrationen im Sekret in deutlich geringeren Konzentrationen vorliegt. Ein diffusionsähnlicher Prozeß kann ausgeschlossen werden, da die Konzentrationen in der Hämolymphe ansonsten auch ansteigen müßten (deutlich über den Fehlerbereich hinaus), sogar wenn die Diffusion durch semipermeable Membranen hindurch verlaufen würde. Zu bedenken ist dabei auch, daß eine Aufnahme des Thioglycosids aus dem Darm in die Hämolymphe noch in Richtung des Konzentrationsgradienten verläuft, der Import von der Hämolymphe ins Drüsenreservoir nach wenigen Stunden dagegen schon gegen einen Konzentrationsgradienten gerichtet ist. Dabei werden Konzentrationsunterschiede an Thioglycosid von bis zu zwei Größenordnungen erreicht (10-1000

nmol/mg). Diese Beobachtungen lassen auf einen aktiven Transportmechanismus durch Transportproteine schließen.

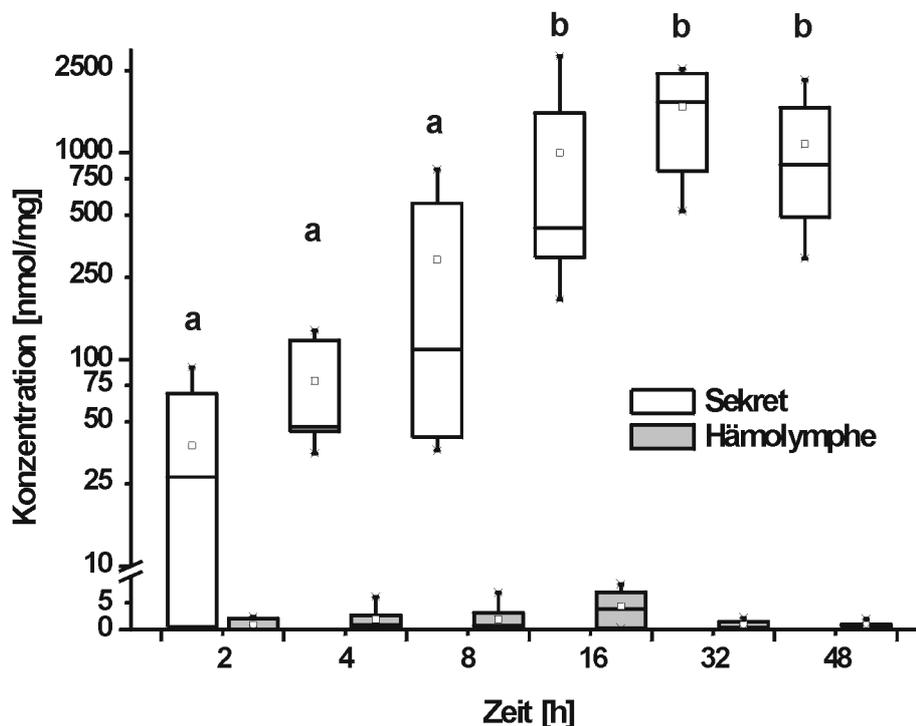


Abbildung 5.3: Kinetik der Thiosalicinaufnahme bei *C. populi*. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen von Thiosalicin **38** im Sekret (weiß) und in der Hämolymphe (grau) nach verschiedenen Zeitintervallen ab Fütterungsbeginn von mit Thiosalicin **38** imprägnierten Blättern. Die Buchstaben über den Balken markieren signifikante Unterschiede der Konzentrationen im Sekret ($df=5$; $F=16,229$; $p=0,00$). Für die Zeitintervalle von 4, 8, 16 und 24 h ist $n=6$, bei $t=2$ h ist $N=4$ und bei $t=48$ h ist $n=10$.

Außerdem haben die Experimente gezeigt, daß spätestens 24 Stunden nach Fütterungsbeginn eine Sättigung erreicht wurde. In vorangegangenen Arbeiten für *de novo* synthetisierende Spezies (*P. cochleariae* und *G. viridula*) konnten ähnliche Zeitwerte ermittelt werden [129]. Für weitere Experimente wurde deshalb ein Zeitintervall von 48 h von Beginn der Fütterungen bis zur Abnahme von Sekret gewählt, um Sättigung und verhältnismäßig kleine Varianzen zu gewährleisten.

5.1.8 Transport von Thiosalicylalkohol bei *C. populi*

Die Fähigkeit von Blattkäferlarven zum Transport glycosidisch gebundener Metaboliten ist mit obigen Versuchen zwar schon hinlänglich demonstriert worden, doch sollte getestet werden, ob auch das Aglycon weitertransportiert wird. In Fraßexperimenten mit Larven von *C. populi* wurden Blätter verfüttert, die mit Thiosalicylalkohol **88**, also dem Thioaglycon von Salicin **38**, imprägniert waren.

In den Proben von Sekret und Hämolymphe konnte mittels GC-MS kein Thiosalicylalkohol nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigten die LC-MS Untersuchungen klar das Vorhandensein von Thiosalicin **38** nach Fütterung des Aglycons **88**. Das gefütterte Aglycon wurde somit glycosyliert. Die

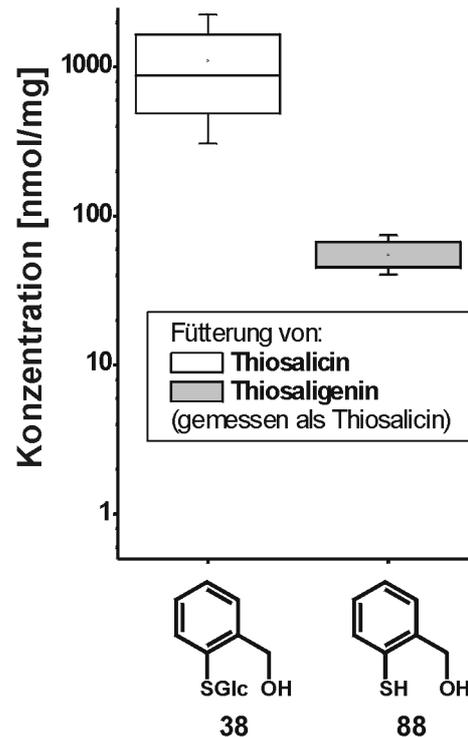


Abbildung 5.4: Thiosaligeninfütterung bei *C. populi*. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen an Thiosalicycin **38** im Sekret 48 h nach Fütterungsbeginn von Thiosalicycin **38** (weiß) und Thiosaligenin **88** (grau). Die gemessenen Konzentrationen an Thiosalicycin **38** unterscheiden sich signifikant ($df=12,501$; $t=10,991$; $p=0,00$) voneinander.

Abbildung 5.4 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen im Vergleich mit gemessenen Werten nach Thiosalicycinfütterung. Die in der Hämolymphe gemessenen Mengen sind innerhalb der Meßgenauigkeit gleich, unterscheiden sich jedoch erheblich voneinander für den Import ins Sekret.

Mögliche Ursache für die Glucosylierung des Aglycons könnten die im Darm der Tiere befindlichen Glucosidasen sein, die auch die Rückreaktion der Hydrolyse von Zuckern, also die Glucosylierung, katalysieren. Da die entstandenen Thioglycoside sich der Spaltung der Thiobrücke widersetzen, reichern diese sich an und könnten von Transportproteinen erfaßt werden und genau wie Thiosalicycin **38** selber ins Reservoir der Tiere transportiert werden. Vermutlich ist somit kein bzw. nur sehr wenig Aglycon **88** von den Tieren aufgenommen worden.

5.1.9 Selektivität der Transporter

Feld et al. haben bereits erste Hinweise für selektive Transportsysteme gewinnen können [105, 129]. In Versuchen wurden phenolische *O*-Glucoside, aber auch Thioglycoside wie Thiosalicycin **38** und das Thioglycosid von 8-Hydroxygeraniol **66** sowie zwei Derivate letztgenannter Verbindung gefüttert, bei denen Hydroxygruppe und Glycon vertauscht sind (Glucosid **89**) bzw. gar keine Hydroxygruppe am terpenoiden Grundgerüst vorhanden ist (Glucosid **90**) (Abb. 5.5).

Als Versuchstiere dienten *P. cochleariae*, *G. viridula* und *P. laticollis* als Vertreter *de novo* Synthese betreibender Spezies, sowie *C. populi* und *P. vitellinae* als geeignete Beispiele für Sequestrierer.

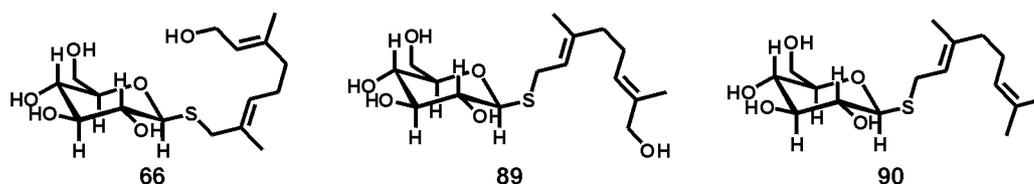


Abbildung 5.5: In Fütterungsexperimenten verwendete terpenoide Glucoside von Feld et al.. Glucosid **66** wird im Gegensatz zu den Verbindungen **89** und **90** von *de novo* Produzenten vom Darm ins Wehrreservoir transportiert.

Für diese Arbeit wurden für Fütterungsexperimente Spezies ausgewählt, die leicht zu handhaben und an der Basis von Verzweigungen in der Phylogenie (Abb. 2.5) zu finden sind. Außerdem sollten repräsentativer Verbindungen für alle drei Entwicklungsstufen im Wehrsekret getestet werden (Abschn. 2.3). Als *de novo* Synthetisierer wurden *H. marginella* und *P. laticollis* ausgewählt, da diese Spezies parapatriisch mit vielen sequestrierenden Spezies lebt. Als typischer Sequestrierer diente vor allem *C. populi*, aber auch *P. vitellinae*, der zu Larven mit autogener Synthese von Wehrverbindungen näher verwandt ist als zu anderen Sequestrierern (Abb. 2.5). *C. lapponica* kommt in allopatrischen Populationen vor, und ist deshalb als Beispiel für eine gemischte Biosynthese ausgewählt worden.

Alle getesteten Spezies weisen einen charakteristischen Transport für verschiedene Thioglycoside auf. Für alle getesteten Verbindungen findet sich eine Anreicherung im Sekret. Die Konzentrationen können sich dabei allerdings um den Faktor 500 unterscheiden. Die höchsten gemessenen Konzentrationen sind im molaren Bereich, was sogar zur Fällung der kristallinen Substanzen im Sekret der Tiere führt. Bei ähnlichen chemischen Strukturen (Glycosylrest + aromatisches oder aliphatisches Aglycon mit höchstens einer weiteren Hydroxyfunktion) und damit annähernd gleichen physikalischen Eigenschaften wie beispielsweise dem Diffusionskoeffizienten² sollten so deutliche Unterschiede in transportierten Mengen an Thioglycosid nicht auftreten, zumal die Diffusion entgegen des Gradienten verlaufen müßte. Im Folgenden werden diese Zusammenhänge dargestellt und die statistischen Auswertungen für die betreffenden Spezies diskutiert.

In der Hämolymphe kann die jeweilige Testsubstanz eindeutig nachgewiesen werden, doch sind die Konzentrationen nahe am Detektionslimit. Innerhalb dieser Grenzen erreichen vermutlich alle Thioglycoside unabhängig von den getesteten Spezies etwa gleiche Konzentrationen von bis zu 10 nmol/mg_{Sekret}. Aus diesem Grunde erscheint es wenig sinnvoll, die Hämolymphe Daten statistisch auszuwerten. Im Folgenden werden die ermittelten Werte für die Hämolymphe aus diesem Grunde nicht mehr diskutiert und nicht in den Graphiken dargestellt.

²Aus der Stokes-Einstein-Gleichung geht hervor, daß die Diffusion bei konstanter Temperatur von der Viskosität des Mediums abhängt [117]. Die Reibungskraft, die Kugeln – und als solche können solvatisierte Moleküle angenommen werden – ist proportional zum Radius der Kugeln [153]. Die Solvathüllen (Hydrathüllen) der verwendeten Thioglycoside können, aufgrund der ähnlichen Strukturen und funktionellen Gruppen, als weitestgehend gleich (Radius) angenommen werden, wodurch Kugeln mit ähnlichem Radius und damit ähnlichen Diffusionskoeffizienten betrachtet werden.

Transport bei *de novo* Synthetisierern

Die gemessenen Konzentrationen an Thioglycosiden im Sekret von *H. marginella* und *P. laticollis* wurden mittels ANOVA statistisch untersucht, um Unterschiede in der Transportkapazität festzustellen. Die Daten von *H. marginella*³ sind nach der Gleichung: $t = \ln(w + 10)$ (Abschn. 9.6) und die Daten von *P. laticollis* logarithmisch⁴ ($t = \ln(w)$) transformiert worden. Die Tabelle 5.6 gibt die statistischen Werte an, die für beide Spezies deutlich zeigen, daß sich nur die Transportrate des Thioglycosids von 8-Hydroxygeraniol **66** signifikant von der anderer gefütterter Verbindungen unterscheidet.

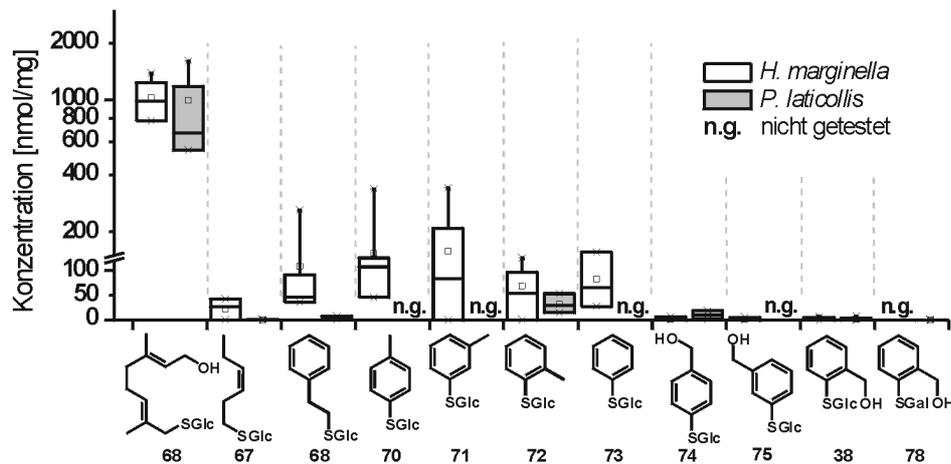


Abbildung 5.6: Thioglycosidtransport bei *H. marginella* und *P. laticollis*. Die Graphik zeigt die gemessenen Konzentrationen (LC-MS) an verschiedenen Thioglycosiden im Sekret der Larven 48 h nach Fütterungsbeginn.

Den Meßergebnissen ist zu entnehmen, daß *H. marginella* und *P. laticollis* ausschließlich das Thioanalogon des Glucosids von 8-Hydroxygeraniol **66**, also des natürlichen Substrates [106], im Sekret akkumulieren (ca. 700-1000 nmol/mg) (Abb. 5.6). Alle anderen getesteten Substanzen werden nur in deutlich geringerem Umfang (ca. 0-100 nmol/mg) ins Sekret transportiert, selbst bei thioglycosidisch gebundenen Blatt-Alkohole geschieht dies praktisch gar nicht. Die Larven müssen also ein selektives – allerdings nicht spezifisches – und aktives Transportsystem besitzen. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von Feld et al. unterstützt [129], da auch dort qualitativ hohe Transportraten für das thioanaloge terpenoide Glucosid **66** gefunden wurden; die Derivate dieser Verbindung dagegen wurden nur in verringertem Ausmaß im Sekret von *de novo* Synthetisierern detektiert.

Transport bei Sequestrierern

Zur Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den transportierten Mengen an Thioglycosiden wurden alle Daten von *C. populi* und *P. vitellinae* nach logarithmischer Transformation jeweils

³Diese Spezies ist recht klein und gibt entsprechend wenig Sekret ab (Abschn. 5.1.6). Außerdem stand zu Beginn der Meßreihen keine Mikrowaage zur Verfügung. Die Addition von 10 soll der dadurch vergrößerten Meßgenauigkeit Rechnung tragen.

⁴Für die Statistische Auswertung ist es unerheblich, wie die Daten transformiert werden, solange dadurch Homogenität der Daten erreicht wird (Abschn. 9.6).

Tabelle 5.6: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Fütterungsexperimente von *H. marginella* und *P. laticollis* nach Fütterung mit verschiedenen Thioglycosiden. Unterschiedliche Buchstaben in der Spalte Gruppe markieren signifikante Unterschiede zwischen den Verbindungen.

Verbindung	<i>H. marginella</i>		<i>P. laticollis</i>	
	N	Gruppe	N	Gruppe
66	5	a	4	a
67	3	bc	3	c
68	4	b	3	bc
70	4	b	-	-
71	4	b	-	-
72	4	bc	3	b
73	3	b	-	-
74	3	c	3	bc
75	3	c	-	-
38	4	c	7	c
78	-	-	4	c

mittels ANOVA ausgewertet. Die Messungen ergaben verschiedene Transportkapazitäten. In beiden Fällen unterscheidet sich Thiosalicin **38** signifikant von allen anderen Thioglycosiden. Innerhalb der Thioglycoside unterscheiden sich nochmals zwei Gruppen von Verbindungen signifikant (Tab. 5.7). Anhand der Meßwerte und der Statistik können subjektiv drei verschiedene Transportraten unterschieden werden: gute Transportrate (Thiosalicin **38**), geringe Transportrate (alle Kresolderivate) und sehr geringe Transportrate (alle Derivate von Blatt-Alkoholen).

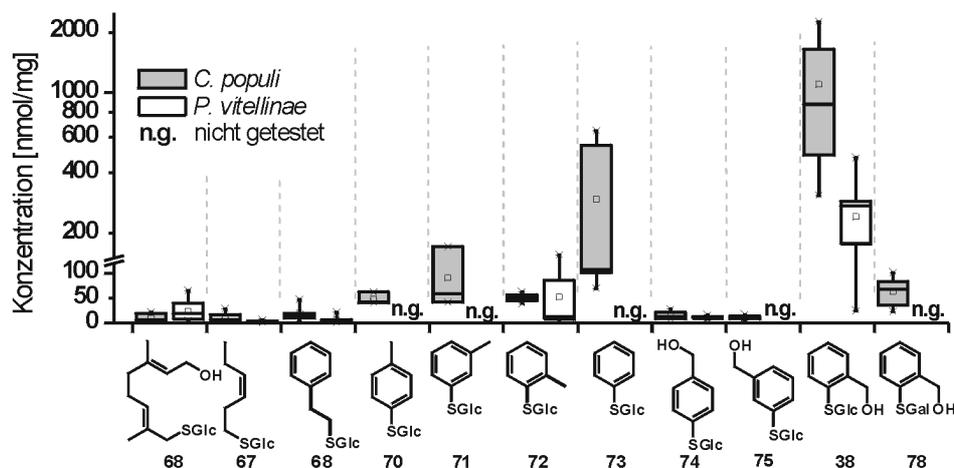


Abbildung 5.7: Thioglycosidtransport bei *C. populi* und *P. vitellinae*. Die Graphik zeigt die gemessenen Konzentrationen (LC-MS) an verschiedenen Thioglycosiden im Sekret der Larven 48 h nach Fütterungsbeginn.

Im Vergleich mit den *de novo* Synthese betreibenden Spezies (Abschn. 90) zeigen die Werte bezüglich

Tabelle 5.7: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Fütterungsexperimente von *C. populi* und *P. vitellinae* nach Fütterung mit verschiedenen Thioglycosiden. Unterschiedliche Buchstaben in der Spalte Gruppe markieren signifikante Differenzen zwischen den Verbindungen. Für beide Spezies werden drei signifikant unterschiedliche Transportraten gefunden.

Verbindung	<i>C. populi</i>		<i>P. vitellinae</i>	
	N	Gruppe	N	Gruppe
66	7	c	7	b
67	5	c	5	c
68	5	c	5	c
70	4	b	-	-
71	4	b	-	-
72	6	b	5	b
73	6	b	-	-
74	4	c	5	b
75	5	c	-	-
38	10	a	7	a
78	10	b	-	-

der akkumulierten Substanzen ein gegenteiliges Bild. Nur Thiosalicin **38** wird in größeren Mengen transportiert (ca. 1000 bzw. 350 nmol/mg). Die benzyliche Hydroxygruppe hat entscheidenden Einfluß auf die Transportrate, da alle Kresolderivate in deutlich verringertem Ausmaß (ca. 75 bzw. 10 nmol/mg) im Sekret angereichert werden. Zudem ist die richtige Stellung der OH-Gruppen im Zucker wichtig, da auch das Galactosid, bei dem eine Hydroxygruppe in Position 4 nicht wie in der Glucose äquatorial, sondern axial steht, nur in stark verringertem Maße (ca. 75 nmol/mg) transportiert wird (Abb. 5.7). Interessanterweise führen also selbst kleinste Veränderungen an der Grundstruktur des Thiosalicins **38** (Glucose + *ortho*-benzyliches Aglycon) dazu, daß der Transport praktisch zusammenbricht (< ca. 25nmol/mg), was auch dem deutlich reduzierten Transport der Positionsisomeren **75** und **74** von Thiosalicin **38** entnommen werden kann (Abb. 5.7).

Es kann vermutet werden, daß die Transportproteine die Substrate durch Wasserstoffbrücken zu allen Hydroxyfunktionen im aktiven Zentrum binden. Fehlende OH-Gruppen oder solche an falschen Positionen reduzieren die Bindungseigenschaften des Substrates durch fehlende Wasserstoffbrücken, wodurch der Transport deutlich reduziert wird, jedoch nicht vollständig verschwindet.

Bemerkenswerterweise ist der Thiosalicintransport bei *P. vitellinae* geringer als bei *C. populi*, was damit zusammenhängen könnte, daß zum einen erstgenannte Spezies zu *de novo* Synthetisierern sehr nah verwandt ist (Genus Phratorini) [89] (Abb. 2.5) und zum anderen auch nicht so viel Salicylaldehyd im Sekret gefunden wird wie bei *C. populi*, die zum *Chrysomela* Kladus gehört mit ausschließlich sequestrierenden Spezies.

Die Statistik (Tab. 5.7) weist aus, daß es drei signifikant unterschiedliche Gruppen des Transports gibt. Eine Gruppe bildet dabei immer das Thiosalicin **38** mit dem besten Transport. Dann gibt es eine Gruppe von Verbindungen, die wenig im Sekret akkumuliert werden, wozu alle phenolischen Thioglycoside einschließlich des Galactosids gehören, mit Ausnahme der Positionsisomeren von Thiosalicin **38**, die ihrerseits zu der Gruppe mit einem geringeren Transport gehören, wie auch die Derivate von Blatt-Alkoholen und dem terpenoiden Glycosid.

Bemerkenswert ist zudem die augenscheinlich hohe Transportrate der Verbindung **73** (ca. 300 nmol/mg) (Abb. 5.7), die sich statistisch nicht vom Transport der Kresolderivate, wohl aber von dem des Thiosalicins **38** unterscheidet (Tab. 5.7).

Transport bei *C. lapponica*

Es wurde der Thioglycosidimport für Tiere aus jedem Habitat (Finnland: Weide, Frankreich: Weide, Tschechische Republik: Birke) statistisch mittels ANOVA untersucht.

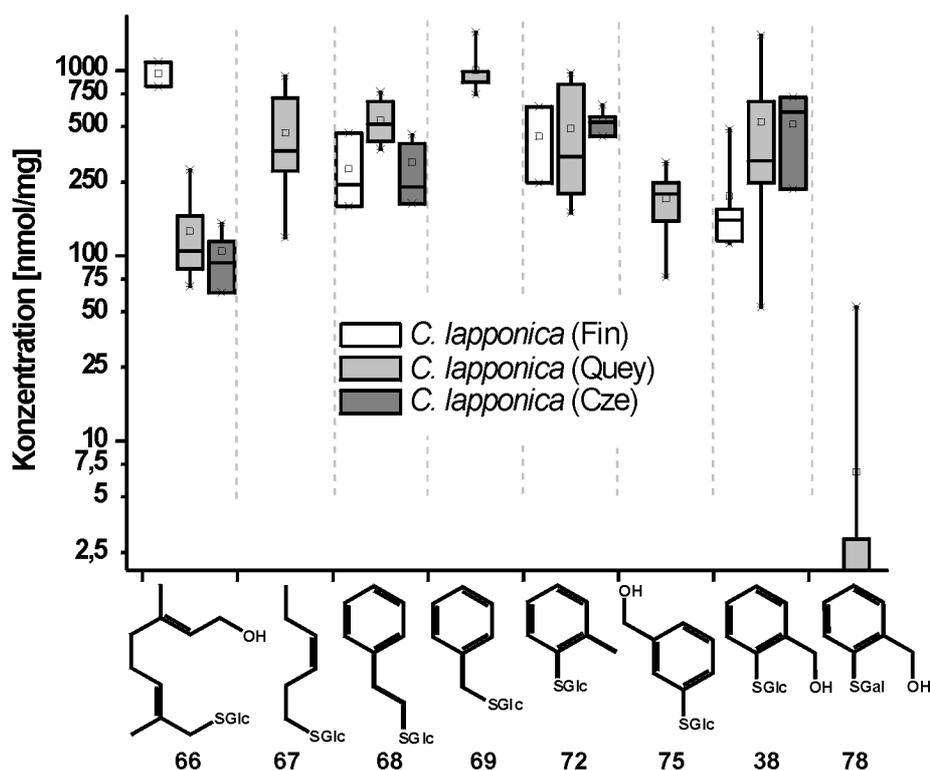


Abbildung 5.8: Import verschiedener Thioglycoside bei Larven von *C. lapponica* aus verschiedenen Habitaten nach Fütterung auf *Salix caprea*. Fin: Finnland; Quey: Queyras; Cze: Tschechien.

Für die finnischen Tiere ergab sich kein wesentlicher qualitativer Unterschied beim Transport der vier verschiedenen Thioglycoside **66**, **67**, **68** und **38** (zwischen ca. 250-1000 nmol/mg), was durch die Statistik bestätigt wird (df=3; F=4,886; p=0,032). Die Tabelle 5.8 gibt die Stichprobenzahl N und die Gruppenzugehörigkeit jeder Verbindung wieder. Quantitativ unterscheidet sich der Transport des monoterpeneren Thioglycosids **66** (ca. 1000 nmol/mg) vom Thiosalicintransport **38** (ca. 250 nmol/mg).

Trotz der quantitativen Unterschiede kann als Fazit konstatiert werden, daß alle getesteten Substanzen in hohen Mengen von den Tieren aufgenommen werden können, wenn die Ergebnisse des Transports bei *de novo* Synthetisierern und Sequestrierern (s. o.) verglichen werden, bei denen jeweils eine Verbindung in relativ hoher Quantität, alle anderen Verbindungen dagegen in geringeren Mengen ins Reservoir transportiert werden.

Bei den Spezies aus Queyras in Frankreich wurden acht Substanzen getestet, darunter auch das Galactosid. Statistisch gesehen besteht kein Unterschied zwischen den Glucosiden (Transportraten zwischen ca. 150-800 nmol/mg), allerdings ein signifikanter Unterschied zum Galactosid ($df=6$; $F=37,125$; $p=0,00$) mit einer Transportrate von unter 10 nmol/mg.

Bei der statistischen Auswertung der Meßwerte der Allospezies auf Birke (Tschechische Republik) fällt auf, daß der Transport des Geraniolderivates (ca. 100 nmol/mg) sich signifikant vom Import der anderen Thioglycoside (ca. 300-500 nmol/mg) unterscheidet ($df=4$; $F=13,864$; $p=0,00$). Dieser Trend hat sich bereits bei den finnischen Tieren abgezeichnet, jedoch in umgekehrter Quantität. Trotz dieses quantitativen Unterschiedes ist die Größenordnung des Transportes noch vergleichbar.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Fütterungsexperimente von *C. lapponica* aus verschiedenen Habitaten (Fin: Finnland; Quey: Queyras, Frankreich; Cze: Tschechische Republik) nach Fütterung mit unterschiedlichen Thioglycosiden. Unterschiedliche Buchstaben in der Spalte Gruppe markieren signifikante Differenzen zwischen den Verbindungen.

Verbindung	<i>C. lapponica</i> (Fin)		<i>C. lapponica</i> (Quey)		<i>C. lapponica</i> (Cze)	
	N	Gruppe	N	Gruppe	N	Gruppe
66	2	a	2	a	4	a
67	-	-	5	a	-	-
68	3	ab	5	a	4	b
69	-	-	6	a	-	-
72	2	ab	2	a	4	b
38	5	b	7	a	3	b
78	-	-	10	b	-	-

Alle drei getesteten *C. lapponica*-Lokaltypen zeigen ähnliche, aber im Vergleich mit den anderen Spezies deutlich veränderte Transportmuster. Hier ist keine Bevorzugung einer bestimmten „Leitstruktur“ zu finden, es werden alle Thioglycoside in der gleichen Größenordnung transportiert, einzig das Thiogalactosid **78** nicht (Abb. 5.8). Kleinere Unterschiede in der Statistik können durch die geringe Stichprobenzahl verursacht sein, was sich auch in niedrigen F-Werten widerspiegelt.

Die Schlußfolgerung ist, daß die Tiere vermutlich eine oder mehrere mäßig selektive Transporter besitzen müssen. Die Existenz sehr vieler selektiver aber spezifischer Transporter ist unwahrscheinlich, da auch das rein synthetische Kresolderivat **72** in größeren Mengen aufgenommen wird, für das kein selektiver Transporter vorhanden sein sollte. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Tiere mehrere Transporter besitzen. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise ein Salicintransporter und ein wenig selek-

tiver Transporter für Glucoside von Blatt-Alkoholen. In solch einem Fall wäre der selektive Transporter für Salicin, wie er bei reinen Sequestrieren wie *C. populi* und *P. vitellinae* vorliegt, beibehalten worden und ein zweiter Transporter hätte sich aus diesem oder möglicherweise auch aus einem anderen Glucosidtransporter in den Tieren entwickelt. Insgesamt kann also festgehalten werden, daß *C. lapponica* in der Lage ist, Thioglycoside von möglichen Blatt-Alkoholen und Thiosalicin **38** aufzunehmen.

Übersicht über alle getesteten Spezies

Die Abbildung 5.9 zeigt den Transport ausgewählter Substanzen für alle Larvenspezies, sie verdeutlicht die unterschiedlichen Transportfähigkeiten in den einzelnen Gruppen von Blattkäferlarven. Die Werte für *C. lapponica* sind zur besseren Übersicht aus den Werten der einzelnen Habitate zusammengefaßt, da die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede für den Transport der verschiedenen Glycoside für die drei verschiedenen Lokaltypen ergeben hat. Zu beachten sind dabei die Unterschiede im Transport von Verbindung **66** (Abb. 5.8). Bei den Meßwerten für diese Substanz ist jedoch zu bedenken, daß kein Chromophor im Molekül vorhanden ist (Abschn. 5.1.4 und 90), was zu größeren Meßfehlern durch unterschiedliche Acylierung der Thioglycoside führen kann, außerdem ist der F-Wert recht niedrig. Somit spricht alles für einen Transport in der gleichen Größenordnung.

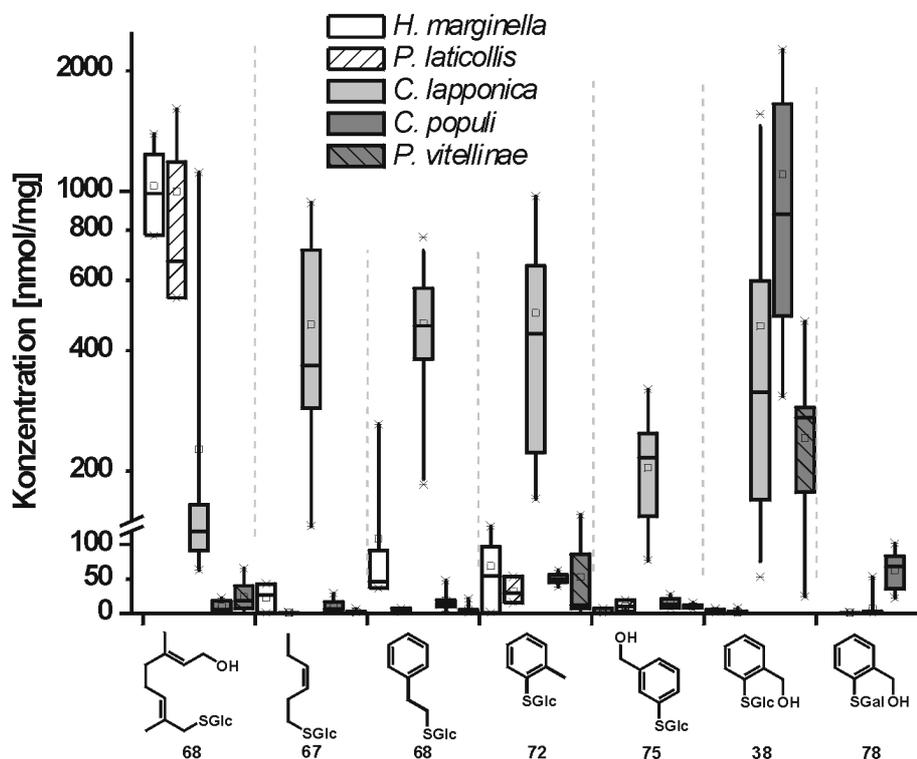


Abbildung 5.9: Übersicht über den Thioglycosidtransport bei allen getesteten Spezies. Die Graphik zeigt die gemessenen Konzentrationen (LC-MS) an verschiedenen Thioglycosiden im Sekret der Larven 48 h nach Fütterungsbeginn.

Der selektive Transport thioanaloger Verbindungen von in der Natur bedeutenden Metaboliten ist aus der Graphik deutlich zu entnehmen. Spezies, die *de novo* Synthese zur Gewinnung von Wehrsubstanzen

betreiben, können nur das Thioglucosid von 8-Hydroxygeraniol in größeren Mengen transportieren. Das entsprechende *O*-Glucosid ist ein wichtiger Metabolit bei der Biosynthese von Iridoiden (Abb. 2.7). Bei den Spezies, die natürlicherweise Salicin sequestrieren, wird nur Thiosalicin **38** in größerer Menge im Drüsenreservoir angereichert. Alle gefütterten Glucoside werden von *C. lapponica* aufgenommen und ins Sekret transportiert. Auch hier handelt es sich um glucosidisch gebundene, mögliche Metabolite der Biosynthese von Abwehrverbindungen, da diese Spezies ein breites Spektrum glucosidisch gebundener Blatt-Alkohole der Wirtspflanze aufnehmen kann und dann für eigene Wehrsubstanzen verwendet, wobei das Aglycon im Sekret in Form von Butyraten nachweisbar ist.

Keine Spezies vermag Galactoside aufzunehmen. Derartige Zucker spielen allerdings auch keine Rolle bei biosynthetischen Prozessen zur Gewinnung von Wehrsubstanzen; weder bei der *de novo* Synthese noch bei der Sequestration treten solche Verbindungen auf.

Als Ergebnis kann also festgehalten werden, daß Blattkäferlarven ein selektives Transportsystem besitzen, das Glucoside erkennt, woraus auf einen Glucosidtransporter geschlossen werden kann. Spielt nur ein Metabolit zur Gewinnung von Wehrverbindungen eine Rolle (*H. marginella*, *P. laticollis*, *C. populi* und *P. vitellinae*), wird auch das zugehörige Aglycon als Kriterium für eine Passage ins Reservoir eingesetzt. Bei *C. lapponica* werden sehr viele verschiedene Glucoside zur Biosynthese von Estern zugelassen, entsprechend ist hier nur das richtige Glycon (Glucose), nicht aber das Aglycon für einen Transport entscheidend.

Aus den archetypischen Spezies, die *de novo* Synthese betreiben, haben sich Sequestrierer wie *C. populi* und *P. vitellinae* entwickelt. Für diesen Schritt haben sich Transportproteine, die bei Spezies mit autogener Biosynthese für den Transport von glucosidischen Metaboliten vorhanden sind, von einem Substrat (Glucosid von 8-Hydroxygeraniol **14**) an eine neue Verbindung (Salicin **18**) anpassen müssen. Der Vergleich zwischen *P. laticollis* und *P. vitellinae* ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da beide Spezies auf denselben Wirtspflanzen (Salicaceae) zu finden sind. Umgekehrt verhält es sich bei *C. lapponica*. Diese Spezies kommt auf verschiedenen Phanerophyten vor (Salicaceae und Betulaceae). Diese Tiere verfügen über ein Transportsystem, das ein breites Spektrum verschiedener glucosidisch gebundener Metabolite als Substrat zuläßt. Hierdurch wird ein Wirtswechsel deutlich begünstigt, da die Larven nicht mehr nur auf einen einzigen Metaboliten (Salicin **18**) angewiesen sind. *de novo* Synthetisierer sind diesbezüglich von ihren Futterpflanzen (*H. marginella*: Ranunculaceae; *P. laticollis*: Salicaceae) nicht so abhängig wie Sequestrierer, da ihr Transportsystem unabhängig von Metaboliten in gefressenen Blätter nur Verbindung **14** transportieren muß. Für diese Tiere sollte es leichter möglich sein den Wirt zu wechseln. Tatsächlich kommen *de novo* Produzenten auf vielen verschiedenen Pflanzenfamilien vor, im Gegensatz zu Sequestrierern, deren Wirtspflanzen sich auf wenige Familien beschränken [89].

5.1.10 Konkurrenz-Fütterungsexperimente von Thioglycosiden bei *C. lapponica* (Quey)

Fütterung auf verschiedenen Wirtspflanzen

Weitere Experimente sollten klären, ob die Wirtspflanze einen Einfluß auf die Transportrate der Thioglycoside hat. Dazu wurde der Transport nach Fütterung auf einer salicinreichen Pflanze (*Salix caprea x alba*) und auf einer salicinarmen Pflanze (*Salix caprea*) bestimmt⁵ [114, 154–156].

Die Fütterungsexperimente auf verschiedenen Futterpflanzen zeigen innerhalb der Meßgenauigkeit keine Unterschiede. Die Anwesenheit von Salicin im Blatt hat somit nur eine untergeordnete Bedeutung für die Aufnahme und den Transport von Thioglycosiden bei den gewählten Versuchsbedingungen. Dies bedeutet, daß die auf die Blätter aufgetragenen Konzentrationen an Versuchssubstanzen ausreichen, um mögliche Konkurrenzeffekte zwischen natürlich im Blatt vorkommenden Glucosiden und den gefütterten Thioglycosiden zu überdecken.

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte durch T-Tests nach logarithmischer Transformation, bei denen die importierten Mengen einer bestimmten Substanz nach Fütterung auf den verschiedenen Pflanzen verglichen wurden, da aufgrund der inhomogenen Varianzen eine ANOVA nicht möglich war. Die T-Tests haben für alle Substanzen außer dem Hexenylderivat keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Transportes von fünf verschiedenen Thioglycosiden ergeben (Tab. 5.9). Allerdings sind die t-Werte recht niedrig, was die Annahme zuläßt, daß die Auswahl der Futterpflanze vermutlich keinen großen Einfluß hat. Kleinere Unterschiede, die zu leicht erhöhtem oder erniedrigtem Transport einzelner Verbindungen führen, sind wahrscheinlich, da Untersuchungen der Zusammensetzung des Wehrsekretes, nach Fütterung auf verschiedenen Pflanzen, auch quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen gezeigt haben [5, 157].

Tabelle 5.9: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Fütterungsexperimente von *C. lapponica* nach Fütterung mit verschiedenen Thioglycosiden auf *Salix caprea* und *Salix caprea x alba*. Für die Verbindungen **72** und **38** sind Werte für die Annahme nicht gleicher Varianzen angegeben.

	66	67	68	72	38
N (<i>S. caprea</i>)	2	5	5	2	7
N (<i>S. caprea x alba</i>)	9	10	10	8	9
t	-2,472	4,162	-0,243	0,461	1,082
df	9	13	13	8	14
p	0,035	0,001	0,812	0,659	0,315

⁵Salicinhaltige Weiden können von solchen mit wenig Salicin sehr einfach im Selbstversuch unterschieden werden. Salicin schmeckt sehr bitter, dagegen schmecken Blätter von *S. caprea* (wenig Salicin) eher grasartig.

Gleichzeitige Fütterung zweier Thioglycoside

Ziel dieser Experimente sollte sein, einen Hinweis auf einen oder mehrere Transporter zu finden. Dazu mußten gleiche Mengen konkurrierender Substrate auf die Blätter imprägniert werden. Erwartet wurden folgende Ergebnisse: Bei einem einzigen Transporter sollte bei gleicher Gesamttransportleistung der Transport der einzelnen Verbindungen zurückgehen. Bei mehreren Transportern sollte es sich genau umgekehrt verhalten, nämlich möglicherweise Anstieg der Gesamttransportleistung bei unverändertem Import einzelner Substanzen.

Die Konkurrenzexperimente zeigen keine deutlichen Effekte (Abb. 5.10), wenn die Referenzen, bei denen nur eine Verbindung verfüttert worden ist, mit den Einzelwerten der Konkurrenzexperimente verglichen werden.

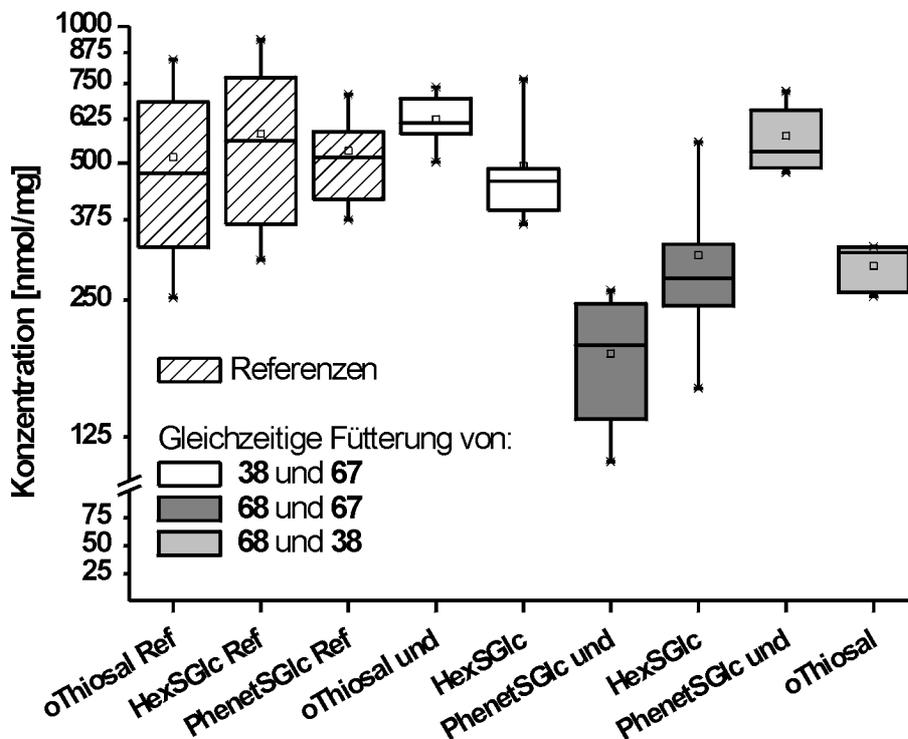


Abbildung 5.10: Gleichzeitige Fütterung zweier Thioglycoside bei Larven von *C. lapponica* auf Blättern von *Salix caprea*. Die Graphik zeigt die gemessenen Konzentrationen (LC-MS) an verschiedenen Thioglycosiden im Sekret der Larven 48 h nach Fütterungsbeginn.

Die statistische Auswertung mittels T-Tests mit den transformierten Daten zeigt jedoch deutlich, daß die gleichzeitige Fütterung von Thiosalicin **38** zusammen mit einem Schwefelderivat von Blatt-Alkoholglycosiden (**68** und **67**) keinen signifikanten Einfluß auf die Transportrate der Verbindungen hat. Allerdings gibt es signifikante Unterschiede bei der gleichzeitigen Fütterung von zwei Blatt-Alkoholderivaten im Vergleich zur Referenz. Die statistischen Daten sind in der Tabelle 5.10 zusammengefaßt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß mindestens zwei verschiedene Transporter in den Tieren

Tabelle 5.10: Statistik der Konkurrenzfütterung zweier Thioglycoside bei Larven von *C. lapponica* nach 48 h auf Blättern von *Salix caprea*. Die Werte bezeichnen den Vergleich des Transports der Einzelsubstanz (N=5) mit den Referenzen (**38** N=9; **67** und **68** N=10) durch T-Test. Mit * gekennzeichnet sind Verbindungen, bei denen keine Gleichheit der Varianzen beim T-Test angenommen werden konnte.

	38* und 67		68 und 67		38* und 68	
t	-1,660	-0,650	-7,066	2,787	2,980	-0,720
df	10,728	13	13	13	10,114	13
p	0,126	0,527	0,000	0,15	0,14	0,484

vorhanden sind. Ein Transporter sorgt für den Salicintransport, der andere für den Import von glycosidisch gebundenen Blatt-Alkoholen. Theoretisch ebenfalls denkbar ist lediglich ein Transporter mit verschiedene Affinitäten für die unterschiedlichen Substrate, wie z. B. bei Multidrug Efflux Proteinen [158]. Hierbei wird das Salicinderivat am schnellsten durch den Körper der Larven geschleust. Weitere Experimente, wie z. B. kinetische Messungen des Importes, zur Erzielung exakterer Aussagen scheiterten am Mangel an Tieren.

5.1.11 Transportphänomene bei Chrysolidenlarven

Die Fütterungsexperimente zeigen deutlich, daß Spezies, die zu unterschiedlichen Subtribus gehören, unterschiedliche Transportfähigkeiten für glycosidisch gebundene Metabolite ihrer Wirtspflanzen besitzen. Allen Spezies ist gemein, daß sie nur thioanalogue Substrate natürlicher Metabolite für einen Transport vom Darm in das Wehrreservoir akzeptieren. Sowohl *de novo* Produzenten als auch Sequestrierer sind zum Transport von ausgewählten Glucosiden in der Lage. Der Transport verläuft aktiv, vor allem von der Hämolymphe ins Reservoir, gegen den Konzentrationsgradienten. Im Reservoir werden die Glucoside hydrolysiert und zu den Wehrverbindungen oxidiert [99, 107–110] oder acyliert [112].

Das Auftreten neuer Verbindungen im Sekret von Blattkäferlarven ist von mehreren Faktoren abhängig. In erster Instanz sind die in der Wirtspflanze enthaltenen Metabolite die Voraussetzung für einen Transport von Glycosiden. So variiert die Zusammensetzung des Sekretes von *Chrysolida vigintipunctata*-Larven je nach Wirtspflanze [114]. Bei Fütterung auf salicinreichen Pflanzen findet sich fast ausschließlich Salicylaldehyd im Drüsensekret, bei Fütterung auf salicinarmen Pflanzen werden verschiedene Blatt-Alkohole im Sekret detektiert. Alle Lokaltypen von *C. lapponica* sind in der Lage, Salicin aufzunehmen, Salicylaldehyd findet sich nur in den finnischen und französischen Populationen im Drüsensekret, nicht aber bei tschechischen Larven, die auf salicinfreien Birken leben. Für *G. viridula* kann beispielsweise unter normalen Umständen keine Sequestrierung von in *Rumex* enthaltenen Metaboliten festgestellt werden, weil keine passenden Glycoside (Glucosid von 8-Hydroxygeraniol **14**) in den Blättern präsent sind. Die hohe Selektivität des aktiven Transportsystems ist für die Auswahl passender Glucoside verantwortlich. Doch läßt dieses System auch Variationen in kleinerem Rahmen zu, damit veränderte Konditionen nicht zu einem Zusammenbruch der Produktion von Wehrsubstanzen führen, wenn diese nicht durch die ener-

getisch aufwendigere *de novo* Synthese aufgefangen werden kann. Andernfalls würde die Evolution der Larven durch Erhöhung des Selektionsdruckes in einer „evolutiven Sackgasse“ enden [89]. Veränderte Konditionen bedeutet hier Änderungen in den Inhaltsstoffen der gefressenen Blätter, einen Wirtspflanzenwechsel oder Veränderungen der Pflanze selber.

Ebenso wichtig wie die hohe Selektivität der Transporter ist die niedrige Spezifität der Glucosidase [108]. Die Rückgewinnung von Glucose mag ein Vorteil sein [159], doch wesentlich wichtiger ist die Freisetzung vieler verschiedener Aglyca, die weiterverarbeitet werden und dann erst ihre Wirksamkeit gegen Feinde unter Beweis stellen können.

Das Beispiel *C. lapponica* zeigt deutlich, warum genau diese Umstände von großer Wichtigkeit sind. Der hohe prädativ Druck durch Larven von der Schwebfliege *Parasyrphus nigratarsis* [51] zwingt die Larven zu einer anderen Wehrchemie, da die Schwebfliegenlarve sich nach der Wehrsubstanz Salicylaldehyd orientiert, die genau wie Iridoide gegen andere Arthropoden und gegen Mikroorganismen hochwirksam ist [100, 132]. In den Blättern der gefressenen Weiden finden sich noch andere Glucoside [112], die von *C. lapponica* ebenfalls aufgenommen werden können, da die Selektivität des Transportsystems etwas „aufgeweicht“ worden ist. Die niedrige Spezifität der Glucosidase im Sekret ermöglicht aber erst die Hydrolyse dieser Verbindungen, wodurch das Aglycon einer weiteren Transformation unterworfen werden kann, nämlich der Bildung von Estern. Erst jetzt können diese Verbindungen ihre Wirkung auch gegen andere Fraßfeinde zeigen. *C. lapponica* ist teilweise von Salicaceae auf Betulaceae gewechselt [88], die kein Salicin mehr enthalten [113, 160], wodurch auch kein Salicylaldehyd mehr entstehen kann, der *P. nigratarsis* anlocken würde. Diese Larven verteidigen sich nur noch mit Butyraten. Gegen Generalisten wie Ameisen zeigen auch diese Verbindungen eine gute Wirkung, doch bieten sie keinen guten Schutz gegen Mikroorganismen [61, 132].

Die Evolution der Wechselwirkungen von Pflanze-Herbivore-Prädator ist somit ein dynamischer Prozeß der Anpassung und Gegenanpassung auf allen trophischen Ebenen [5]. Eine zentrale Rolle spielen dabei sekundäre Metabolite der Wirtspflanzen, die eigentlich zur Abwehr von phytophagen Insekten entwickelt [156], von einigen spezialisierten Spezies selbst zu Abwehrzwecken gegen Fraßfeinde eingesetzt werden. In einigen Salicaceen wird sogar die Produktion von Salicylaten und aromatischen Aminosäuren bei Schädlingsbefall angeregt [157], wodurch Blattkäferlarven wie *P.vitellinae* gewissermaßen ihre eigene Verteidigung durch sequestriertes Salicin in den Pflanzen induzieren.

5.2 Fluoreszenzmarkierung von Transportern

Mit Verbindung **76** (Abb. 5.11) ist ein fluoreszentes Glucosid synthetisiert worden, mit dessen Hilfe untersucht werden sollte, in welchen Darmabschnitten die Aufnahme von Glycosiden stattfindet und ob Wehrsubstanzen durch die Drüsen ins Reservoir transportiert werden oder auf direktem Wege dorthin gelangen.

Nach Verfütterung der fluoreszenten Verbindung wurden Larven seziiert und Darm und Drüsenreser-

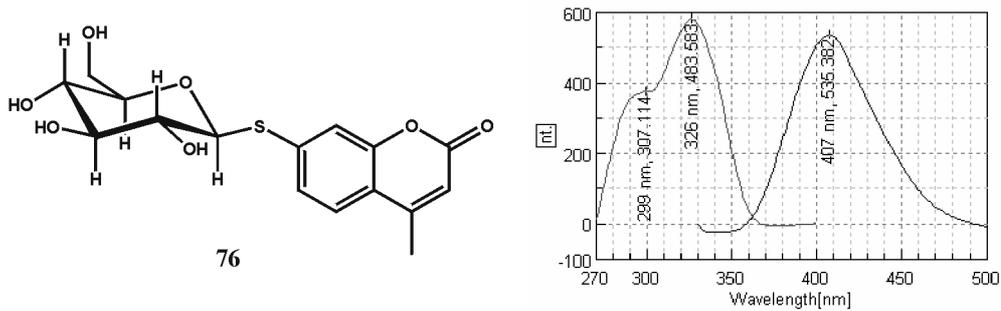


Abbildung 5.11: Fluoreszenzmarker **76** und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{max,ex} = 326nm$, $\lambda_{max,em} = 407nm$).

voire unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenzmarkers ($\lambda_{max,ex} = 326$ nm) konnte leider nicht erreicht werden, da kein passender Filter vorhanden war, die Objektive sind nur für einen geringen Prozentsatz des emittierten Lichts durchlässig ($\lambda_{max,em} = 407$ nm, Lichtdurchlässigkeit des Objektivs $\lambda > ca. 420$ nm), wodurch diese Versuche ohne Ergebnisse blieben. Auch Untersuchungen mit Hilfe von konfokaler Laserspektroskopie⁶ lieferten keine Resultate (Abb. 5.12), die auf den gefütterten Fluoreszenzmarker hingewiesen hätten. Wahrscheinlich handelt es sich bei den fluoreszenten Verbindungen im Reservoir um Derivate flavinoider Verbindungen, da die Anregungs- und Emmisionswellenlängen mit denen typischer Flavine wie FAD ($\lambda_{max,ex} = 370$ nm, $\lambda_{max,em} = 450$ nm) übereinstimmen [161].

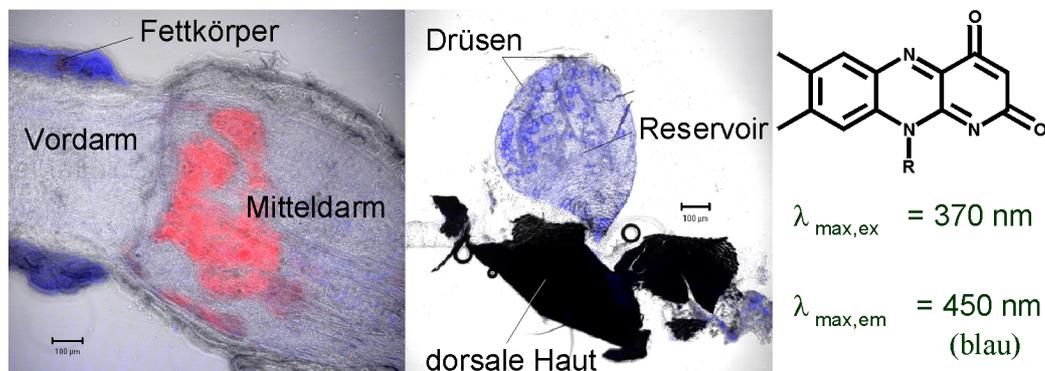


Abbildung 5.12: Mikroskopische Aufnahmen des Darmes (links) und eines Drüsenreservoirs von *C. lapponica* 48 h nach Fütterungsbeginn mit Fluoreszenzmarker **76**. Fluoreszierende Bereiche im Darm werden durch Inhaltsstoffe in der Nahrung verursacht. Im Darm selber oder dem umgebenden Gewebe ist keine Fluoreszenz zu finden, die auf die gefütterte Substanz schließen läßt. Die Fluoreszenz im Drüsenreservoir wird wahrscheinlich durch Flavine verursacht, auch hier ist der gefütterte Fluoreszenzmarker nicht zu erkennen.

Zur Wiederholung dieser Versuche sind passende Geräte erforderlich. Der Fluoreszenzmarker **76** kann weiterhin für solche Experimente genutzt werden, in denen beispielsweise Proteine aus dem Darm isoliert werden. Nach Trennung auf einem Gel wird untersucht, welches Protein möglicherweise fluoreszent wird, da das markierte Glycosid im Transportprotein eingelagert wird.

⁶Diese Arbeiten sind mit Hilfe von Andrea Hartmann im IMB, Jena zusammen mit Antje Burse durchgeführt worden.

5.3 Bestimmung des Ortes der Biosynthese bei *de novo* Synthetisierern

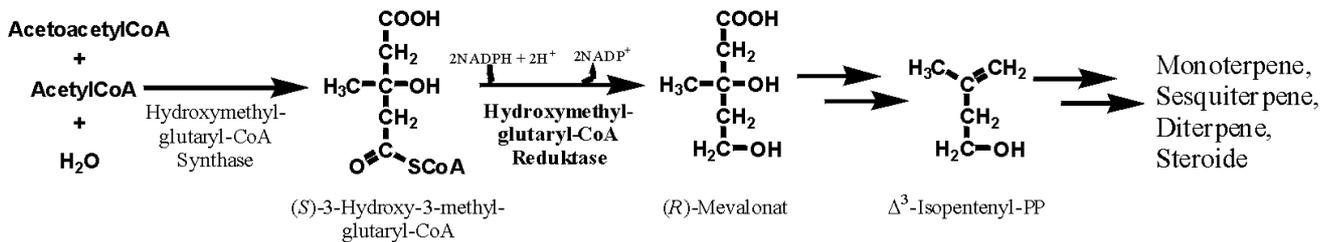


Abbildung 5.13: Biosynthese von Terpenen via dem Mevalonsäureweg. Ein wichtiges Enzym ist die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in Mevalonat umwandelt. Aus diesem werden über Isopentenyl-PP verschiedene Terpene und Steroide biosynthetisiert.

Zur Lokalisierung des Ortes, an dem die Biosynthese von terpenoiden Metaboliten bei *de novo* Synthetisierern stattfindet, wurden Gewebeproben von Darm, Malpighischen Gefäßen, Fettkörper und Kopf von *P. cochleariae* Larven einer semiquantitativen PCR unterworfen. Hierbei wurde der Transkriptlevel der HMG-CoA-Reduktase (Abb. 5.13) in den unterschiedlichen Geweben verglichen. Es zeigte sich ein besonders hoher Level im Fettkörper, der die Vermutung nahelegt, daß dort die Biosynthese von terpenoiden Vorstufen stattfindet⁷ (Abb. 5.14).

Bei LC-MS Untersuchungen von Fettkörper, Malpighischen Gefäßen, Kopf und Darm ließ sich nur im Fettkörper das Glucosid von 8-Hydroxygeraniol **14** nachweisen, womit die Biosynthese dort lokalisiert werden kann (Abb. 5.14).

Dies bedeutet, daß auch *de novo* Synthese betreibende Spezies auf ein Transportsystem für glucosidisch gebundene Metabolite angewiesen sind, um die terpenoide Zwischenstufe vom Fettkörper in die Drüsenreservoirs zu transportieren. Vermutlich verhindern die Insekten durch die Glucosylierung des Terpens, daß dieses unkontrolliert durch den Körper diffundiert.

5.4 Charakterisierung der Butyryltransferase von *C. lapponica*

5.4.1 Nachweis der Enzymaktivität

Zur Klärung des Problems, ob die Ester (Abb. 2.7, Abb. 2.8) im Reservoir entstehen und ob es sich dabei um Transformationen eines Enzyms handelt, wurden mehrere Versuche unternommen, die eindeutig auf die Anwesenheit eines Enzyms schließen lassen. Die Inkubation des in Puffer (pH=6,5) gelösten Sekretes mit 1-Heptanol, einer Verbindung, die in der pflanzlichen Nahrung nicht vorkommt, führte nach 24 h zur Bildung von zwei Heptylestern, die als Isobutyrat und 2-Methylbutyrat von 1-Heptanol identifiziert werden konnten. Diese Aktivität blieb nach dem Einfrieren erhalten, auch über einen längeren Zeitraum

⁷Persönliche Mitteilung von Antje Burse.

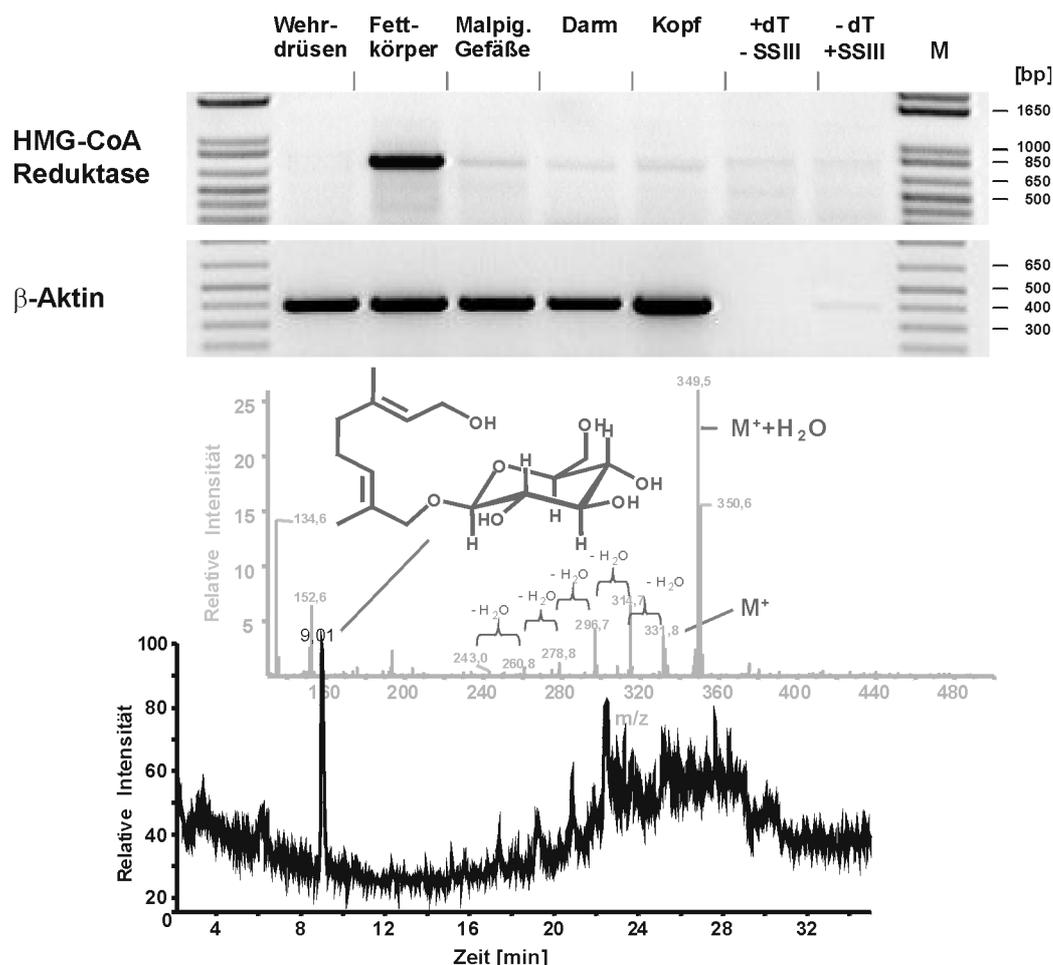


Abbildung 5.14: Semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR von verschiedenen Körperteilen (A. Burse) und HPLC-MS Chromatogramm mit Massenspektrum vom Fettkörper von *P. cochleariae*.

Aus den Ergebnissen der RT-PCR ist nur im Fettkörper eine höhere Transkription für die HMG-CoA Reduktase zu entnehmen. Alle anderen Körperteile zeigen eine deutlich reduzierte Transkription.

Nur im Fettkörper konnte durch HPLC-MS 8-Hydroxygeraniol nachgewiesen werden. In allen anderen analysierten Geweben, konnte dieses terpenoide Glucosid nicht detektiert werden. Beide Befunde zusammengenommen lassen darauf schließen, daß terpenoide Vorstufen (8-Hydroxygeraniol **14**) von Wehrverbindungen (Iridoiden **17** im Fettkörper biosynthetisiert werden.

von zwei Jahren bei -20°C , verlor sich jedoch nach Aufkochen des in Puffer gelösten Sekretes oder Zugabe von Protease.

5.4.2 Bestimmung der Substratspezifität

Welche Alkohole oder andere Verbindungen von dem Enzym akzeptiert werden, haben einfache Experimente klar zeigen können. Aliquotiertes Sekret konnte mit verschiedenen Substraten 24 h reagieren, die Substanzen wurden anschließend mit LC-MS oder GC-MS auf Esterbildung untersucht, außerdem mit Verbindung **68** eine Kinetik der Esterbildung gemessen. Tabelle 5.11 zeigt, mit welchen Substraten welches Ergebnis erzielt werden konnte. Die angefertigten Kinetiken lassen auf einen recht schnellen Umsatz schließen, da die Esterkonzentration für den Umsatz primärer Alkohole nach ca. 4 h nur noch wenig angestiegen ist. Eine Reaktionszeit von 24 h sollte damit ausreichend für den vollständigen Umsatz der Reaktion sein. Die Bestimmung der Enzymkonstanten scheiterte daran, daß die Konzentration an

butyrylübertragendem Cofaktor nicht bestimmt werden konnte (Abschn. 5.4.3).

Tabelle 5.11: Veresterung von Alkoholen mit Sekret von *C. lapponica*. Die Thioglycoside wurden mit LC-MS untersucht, alle anderen Substanzen mit GC-MS. + bedeutet gefundene Isobutyryl- und 2-Methylbutylester, - bedeutet kein Hinweis auf die Bildung von Estern.

getestetes Substrat	Esterbildung
68	+
1-Heptanol	+
2-Heptanol	+
3-Heptanol	+
2-Ethyl-1,3-hexandiol	+
3-Ethyl-3-pentanol	-
Phenol- <i>d</i> ₆	-
1-Heptylamin	-

Aus Tabelle 5.11 kann geschlossen werden, daß alle primären und sekundären Alkohole, einschließlich beider Hydroxygruppen des Diols, eine Umsetzung zu Estern zeigen. Keine Reaktivität zeigen tertiäre und aromatische Alkohole oder andere Funktionalitäten, was schon von Hilker et al. [111] vermutet worden ist. Die Unterschiede in der Reaktivität primärer Alkohole im Vergleich zu sekundären scheinen nicht wesentlich zu sein, da die gleichzeitige Umsetzung jeweils im Überschuß zu Peaks ähnlicher Integration im GC-MS führt.

Im Sekret von *C. lapponica* finden sich allerdings keine Ester von Salicylalkohol [111, 112], was vermuten läßt, daß nicht jeder primäre oder sekundäre Alkohol als Substrat akzeptiert wird (Tab. 5.11). Möglicherweise gelangt der *ortho*-phenolische Rest nicht ins aktive Zentrum der Transferase.

5.4.3 Bestimmung des butyrylübertragenden Cofaktors

In ersten Experimenten reagierten Puffer, Sekret und 1-Heptanol; nach Hinzufügen verschiedener Substrate (Cofaktoren) unter den gleichen Bedingungen erfolgte schließlich nach 24 Stunden die Bestimmung der Konzentration an Estern. Eine Änderung der Konzentration hätte auf das richtige Substrat hingedeutet. In späteren Versuchen ist gereinigtes Enzym anstelle des Rohsekretes in Puffer mit 1-Heptanol mit verschiedenen Substraten getestet worden. Als Substrate dienten Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure, die korrespondierenden CoA-Ester, D₈-Valin in Kombination mit und ohne ATP, MgCl₂ und CaCl₂. Kein einziges Versuchsergebnis hat auf eine Esterbildung hingedeutet. Stichprobenartiger Zusatz von Fraktion < 5 kDa aus der Enzymreinigung resultierte immer in Bildung von beiden Heptylestern, was den Schluß zuläßt, daß kein methodischer Fehler, der zur Inhibierung der Enzymaktivität führt, bei der Vorgehensweise vorliegt. Welche Verbindung letztendlich für die Übertragung des Butyrylrestes verantwortlich ist, blieb ungeklärt.

5.4.4 Charakterisierung und Isolierung des Enzyms

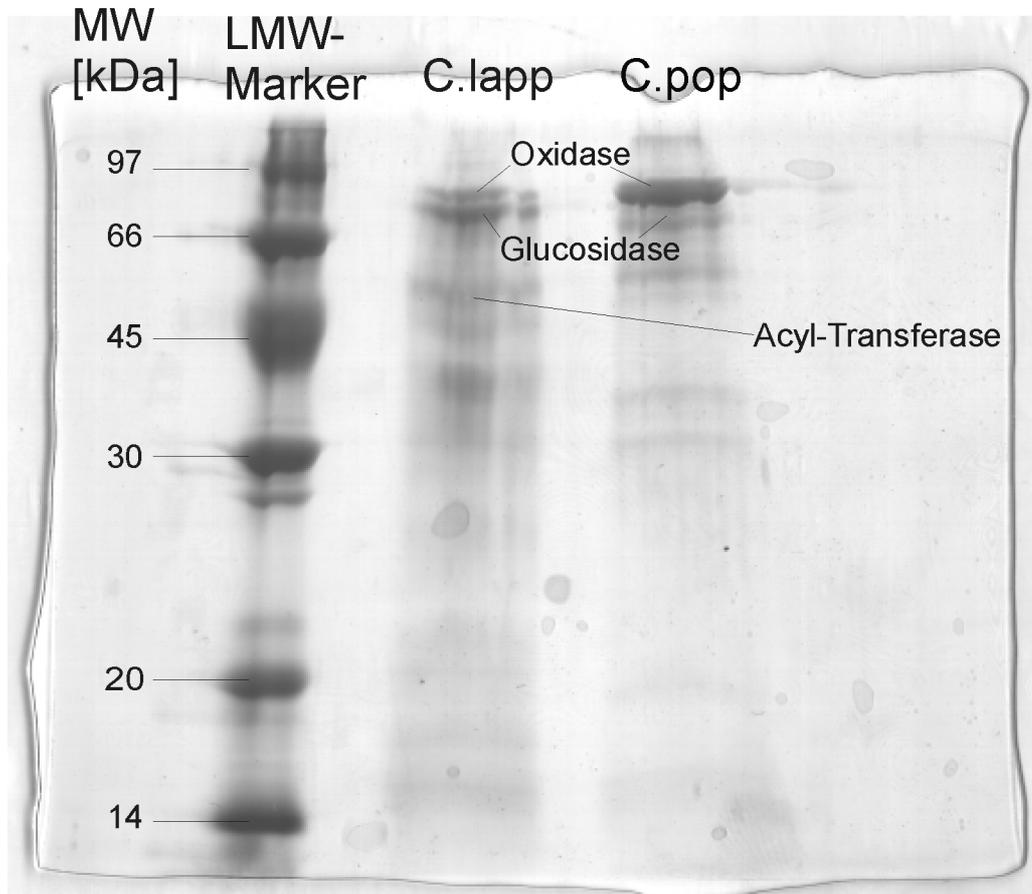


Abbildung 5.15: 12% SDS-PAGE / Laemmli der Sekrete von *C. lapponica* (*C.lapp*) und *C. populi* (*C.pop*). Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l der Fraktionen > 5 kDa in Puffer. Färbung mit Coomassie-Blau.

Bei der Anfertigung eines SDS-Gels (Abb. 5.15) zeigt sich deutlich, wie wenige Enzyme im Wehrsekret selbst vorhanden sind. Die beiden ausgeprägten Banden bei ca. 80 kDa deuten auf bereits bestimmte und charakterisierte Glucosidase und Oxidase hin [104, 106–108, 110], wie sie auch im Sekret von *C. populi* vorkommen und durch ESI MS/MS-Sequenzierung der Proteine bestätigt werden konnten⁸, während die Banden im Bereich von 50 kDa im Sekret von *C. populi* nicht vorkommen. Die hier gefundenen Sequenzen zeigen Übereinstimmungen mit einem Luciferin-Reaktivierenden Enzym⁹ (LRE) [162–166], wie es in Glühwürmchen *Photinus pyralis* vorkommt und Oxyluciferin in 2-Cyano-6-hydroxybenzothiazol und Thioglycolsäure umwandelt.

Tatsächlich zeigen Versuche mit 1-Heptanol und der selbst nicht aktiven Fraktion < 5 kDa des Sekretes von *C. lapponica* in Puffer pH=6,5 nach einer Größenausschlußchromatographie (Abb. 5.16) Aktivität einer Fraktion bei ca. 50 kDa. Diese Fraktion wurde für Experimente mit aufgereinigtem Enzym verwendet.

⁸Die *de novo* Sequenzierungen wurden von Axel Mithöfer in München durchgeführt.

⁹Mündliche Mitteilung von D. Haeckel nach Datenbankvergleichen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus.

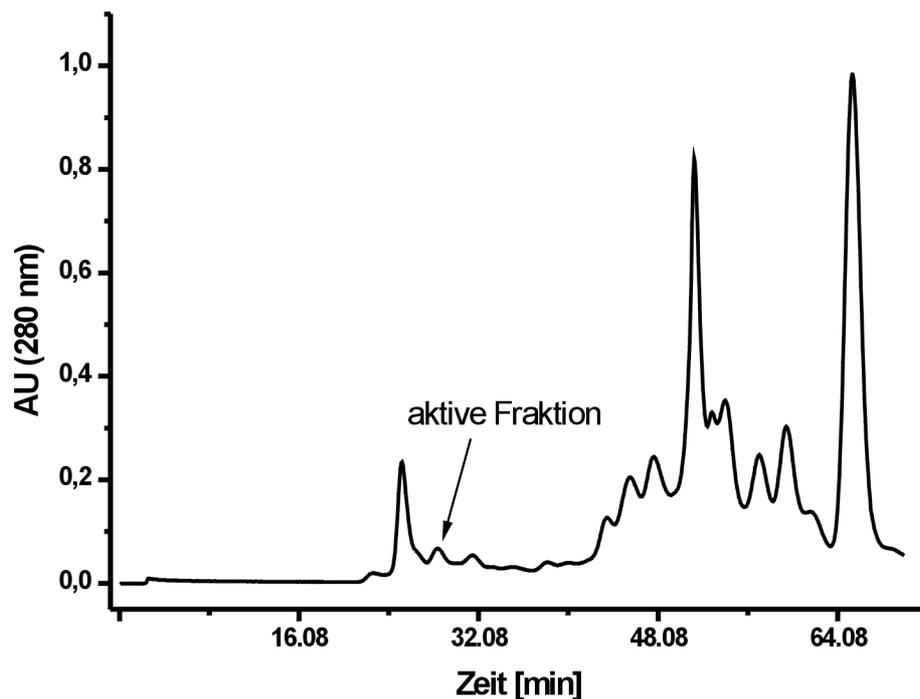


Abbildung 5.16: Größenausschlußchromatographie der Fraktion > 5 kDa des Sekretes von *C. lapponica*. Bis Retentionszeiten von ca. 40 min finden sich Proteine, danach erscheinen die niedermolekularen Bestandteile der Probe. Die markierte Fraktion (RT ca. 29 min) hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und katalysiert in Puffer pH=6,5 zusammen mit der Fraktion < 5 kDa und 1-Heptanol die Bildung von Butyraten.

5.5 Glucosidasekinetik mit Sekret von *C. populi*

Im Sekret von *C. populi* sind im wesentlichen zwei Enzyme bekannt: eine Glucosidase und eine Oxidase. Die hohe Selektivität und Stereochemie der Oxidase *de novo* synthetisierender Spezies ist hinlänglich untersucht worden [104, 107], ebenso die Oxidaseeigenschaften von *C. populi* [110]. Die Glucosidase von *de novo* Synthese betreibenden Spezies hat sich in Experimenten als weniger selektiv gezeigt [108], ein ähnliches Resultat liefert die Kinetik der Glucosidaseaktivität des Sekretes von *C. populi*. Die Enzyme im Sekret sind in der Lage, sowohl Salicin **18** als auch das Glucosid von 8-Hydroxygeraniol **14** zu hydrolysieren. In der Abbildung 5.17 ist deutlich zu erkennen, daß Salicin schneller gespalten wird als das terpenoide Glucosid.

Dies ist ein Hinweis auf eine in allen Spezies eventuell vorhandene ähnliche Glucosidase. Möglicherweise können alle Tiere alle *O*-Glucoside hydrolysieren, sollten diese ins Reservoir gelangen.

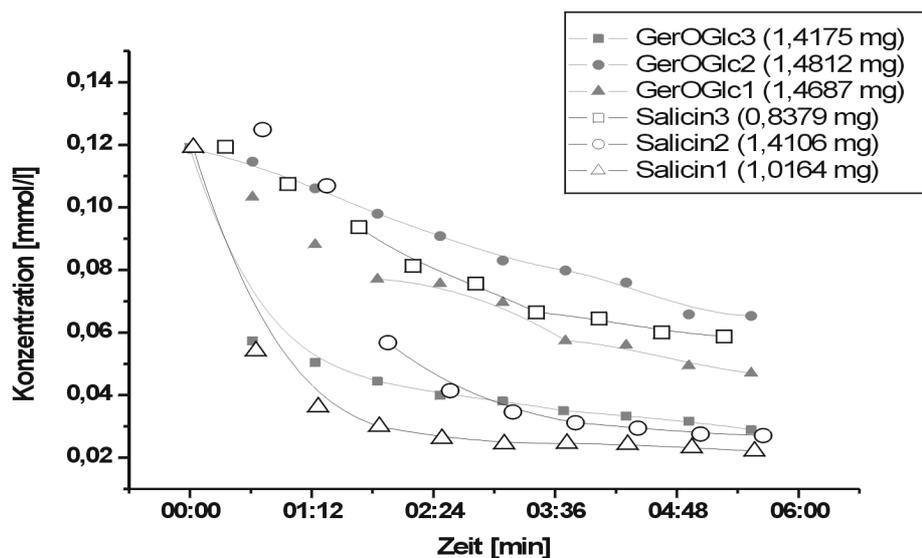


Abbildung 5.17: Kinetik der Glucosidspaltung mit Sekret von *C. populi*. Sekret der Larven reagiert in Pufferlösung mit Salicin **18** oder Verbindung **14** (GerOGlc), die Abnahme des Substrates wird mittels LC-MS ermittelt. Die Hydrolyse des natürlichen Substrates (Salicin) verläuft schneller, dennoch ist Hydrolyse des terpenoiden Glucosides möglich.

5.6 Isotopenmarkierte Verbindungen zur Aufklärung des Ursprungs von Wehrsubstanzen

Das Wehrsekret von *C. lapponica* enthält sehr viele verschiedene Verbindungen, deren Ursprung noch nicht lückenlos geklärt ist. Die Verbindungen werden teilweise *de novo* synthetisiert und teilweise sequenziert. Die Markierung möglicher Metabolite sollte den Ursprung der einzelnen Komponenten klären.

5.6.1 Fütterung isotopenmarkierter Verbindungen

Die Butyrylreste von einigen Wehrverbindungen im Sekret der Larven von *C. lapponica* werden aus Aminosäuren gebildet [112]. Der Ursprung der Alkohole liegt vermutlich in den Wirtspflanzen oder teilweise im Abbau von Fettsäuren [112, 167, 168]¹⁰. Die Markierungsexperimente sollten klären, ob die Larven auch in der Lage sind, aus Aminosäuren die passenden Alkohole, wie beispielsweise Phenylethanol, zu bilden. Die Abbildung 5.19 zeigt einen möglichen Biosyntheseweg, der aus Aminosäuren die gewünschten Alkohole bilden könnte, wie er z. B. aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist [169]. Hierbei werden über den Ehrlich-Biosyntheseweg Aminosäuren durch Transaminierung in α -Ketosäuren überführt, aus denen nach Decarboxylierung die korrespondierenden Alkohole oder Aldehyde entstehen. Eine Oxidation der Aldehyde kann auch zu entsprechenden Carbonsäuren führen.

Mit ¹³C- und deuteriummarkiertem Phenylalanin imprägnierte Blättern wurden an die Tiere verfüt-

¹⁰Auch von typischen *de novo* Synthese betreibenden Spezies sind acetylierte Verbindungen in Spuren im Sekret bekannt [98], deren Ursprung in Fettsäuren zu vermuten ist.

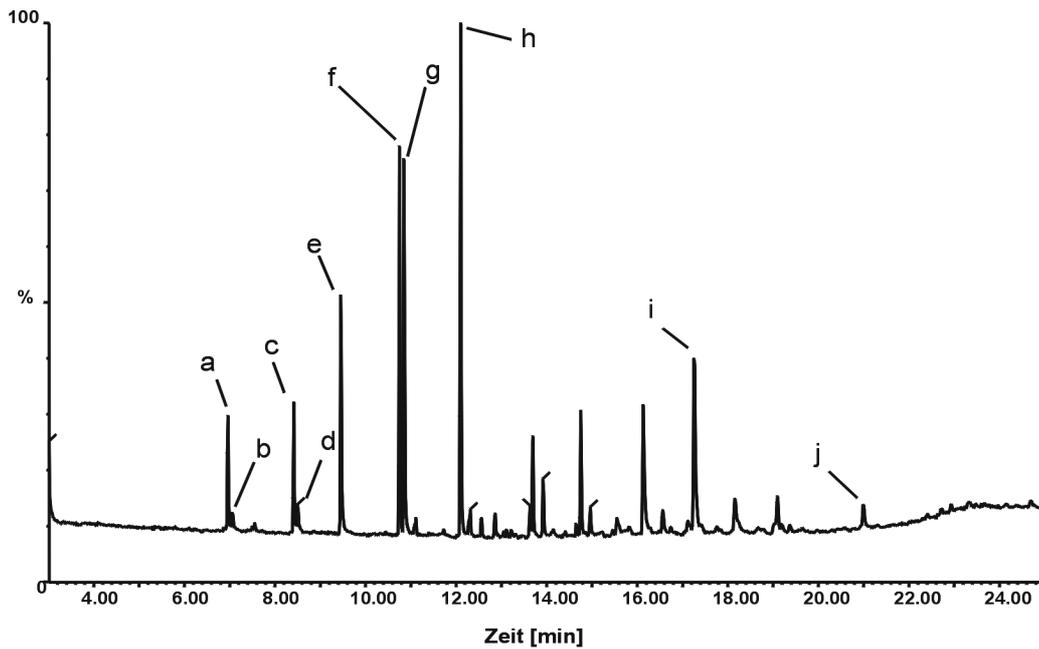


Abbildung 5.18: GC-Chromatogramm eines Hexanextraktes des Sekretes von *C. lapponica* nach Fütterung der Larven auf *S. caprea*. a: (3Z)-Hexenylisobutyrat; b: Hexylisobutyrat; c: (3Z)-Hexenyl-2-methylbutyrat; d: Hexyl-2-methylbutyrat; e: Benzylisobutyrat; f: Benzyl-2-methylbutyrat; g: 2-Phenylethylisobutyrat; h: 2-Phenylethyl-2-methylbutyrat; i: Methylpalmitat; j: Linolensäuremethylester.

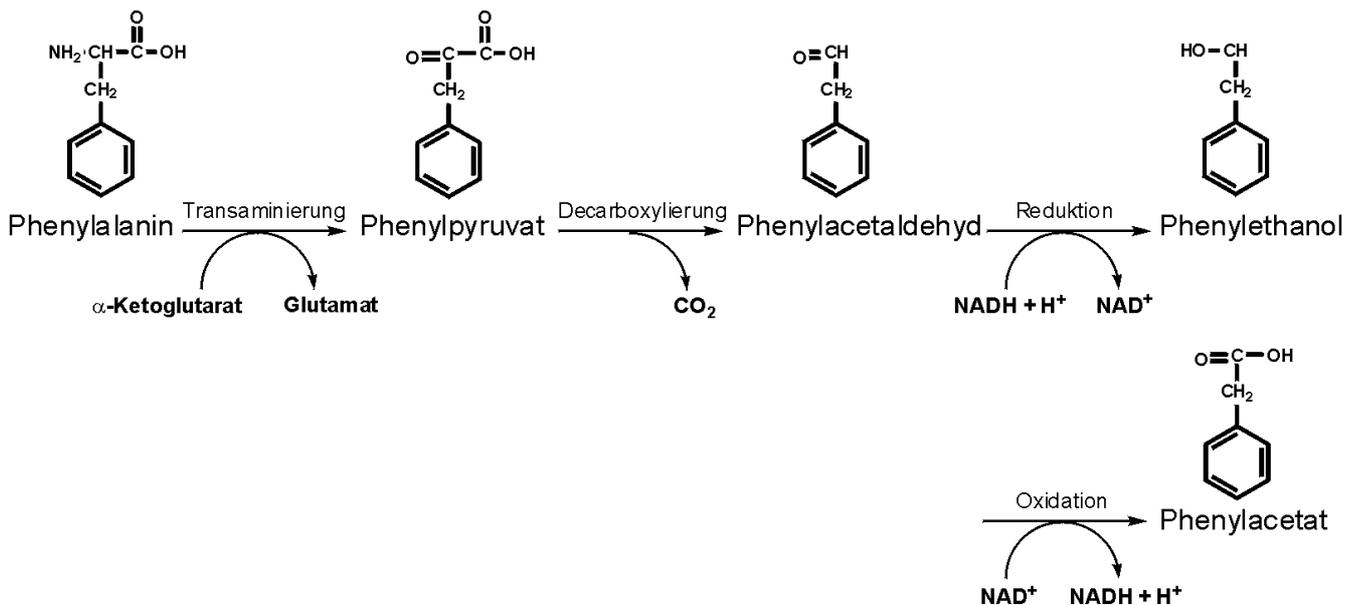


Abbildung 5.19: Katabolismus von Phenylalanin via Ehrlich-Biosyntheseweg. In einem ersten Schritt wird die Aminosäure transaminiert, wodurch die α -Ketocarbonsäure (Phenylpyruvat) entsteht. Nach Decarboxylierung kann durch NADH zum Phenylethanol reduziert bzw. mit NAD^+ zum Phenylacetat oxidiert werden.

tert und die Substanzen des Sekretes mit GC-MS und Gaschromatography-Combustion-Isotope Ratio-Massspectrometry (GC-C-IRMS) untersucht¹¹. Schon die Fütterungsexperimente mit deuteriummarkiertem Phenylalanin ließen auf eine hohe Einbaurate der ringmarkierten Aminosäure in Verbindungen mit Phenylethylrest schließen (Abb. 5.20). Diese ersten Befunde wurden durch die Isotopenverhältnismessungen des β -C markierten Phenylalanins zusätzlich bestätigt, da sich $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von ca. 2000 ergeben haben, im Vergleich zum natürlichen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von ca. -30.

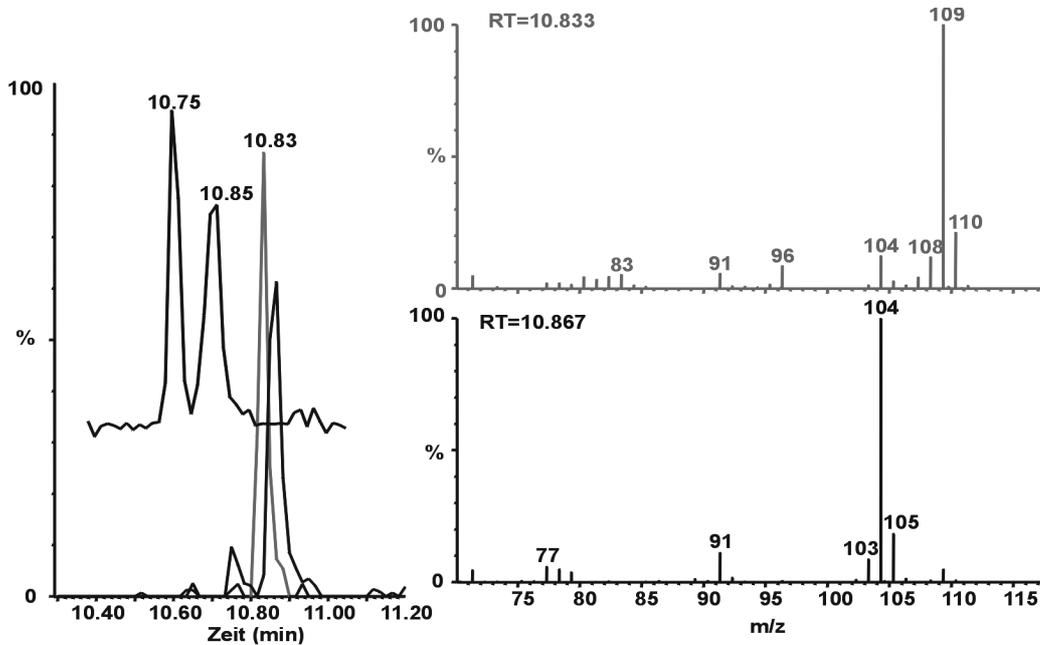


Abbildung 5.20: Peaks und MS-Spuren 105 und 110 mit Spektrum von Phenylethylisobutyrat aus dem Chromatogramm des Sekretes von *C. lapponica* in Hexan nach Fütterung von L-Phenylalanin- d_5 . Das obere Spektrum zeigt deutlich eine Verschiebung um 5 Masseneinheiten, die auf die fünf Deuteriumatome im Ring der Phenylethylgruppe zurückzuführen ist.

Diese Experimente haben klar gezeigt, daß die Larven von *C. lapponica* in der Lage sind, alle phenylethanolhaltigen Substanzen auch vollständig in eigener Regie herzustellen vermögen. Damit gewinnen die Tiere eine gewisse Unabhängigkeit von ihrer Wirtspflanze, was einen Wirtspflanzenwechsel deutlich erleichtert. Trotzdem sind sie immer noch in der Lage, pflanzliche Metabolite aufzunehmen. Ein mögliches Szenario wäre die Auf- oder Abregulierung der Sequestration oder der *de novo* Synthese je nach Angebot der Metaboliten in der Wirtspflanze. Für die Iridoide produzierende Spezies *G. viridula* sollten Untersuchungen klären, ob diese Spezies Metaboliten aus der Wirtspflanze aufnimmt, obwohl sie eigentlich *de novo* Synthese betreibt [170]; Tatsächlich finden sich dort Anzeichen für Sequestrierung unter bestimmten Umständen¹².

An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob auch Sequestrierer wie *C. populi* und *P. vitellinae* in der Lage sind, *de novo* Synthese zu betreiben; deshalb auch hier Fütterungsexperimente mit markierten Aminosäuren. Erste Versuche mit *C. populi* mit deuteriertem und β - ^{13}C -markiertem Phenylalanin waren nicht erfolgreich, da Salicin keinen Isotopeneinbau zeigte und die winzigen Peaks der anderen Verbindungen zu

¹¹Messungen am GC-C-IRMS wurden von Astrid Sjøe und Stefan Bartram durchgeführt.

¹²Mündliche Mitteilung von Astrid Sjøe.

klein waren, um einen Einbau festzustellen. Erst Versuche mit *P. vitellinae* bestätigten die Vermutung, daß auch Sequestrierer in der Lage sind, *de novo* Synthese zu betreiben, da sich nach Fütterung mit Algal Amino Acid Mix $^{13}\text{C}^{\text{TM}}$ (Phenylalanin: 4,9 %) eine deutliche Isotopenmarkierung beim Phenylethanol-Peak und beim Phenylacetaldehyd-Peak zeigte. Bei dieser Mischung sind alle Kohlenstoffatome der Aminosäuren durch das schwerere Isotop ersetzt. Der höherer Grad der Markierung wiegt den Effekt der kleineren Konzentration des Phenylalanins deutlich auf, da immer noch annähernd molare Konzentrationen auf die Blätter imprägniert werden konnten und die Larven diese fraßen. Bei Versuchen mit *C. lapponica* zeigten im wesentlichen dieselben Peaks eine Markierung wie bei Fütterung von reinem, markiertem Phenylalanin. Fütterungsexperimente mit der Aminosäuremischung an *C. populi* resultierten schließlich auch im deutlichen Einbau in das wenig vorhandene Phenylethanol. Alle getesteten Spezies des Subtribus Chryso-melina sind bis zu einem gewissen Grad in der Lage, *de novo* Synthese und Sequestrierung zu betreiben. Allerdings können nur bestimmte Substanzen autogen hergestellt werden. Salicylaldehyd kann z. B. nur Aufnahme von Salicin aus der Futterpflanze gewonnen werden. Die Sequestrierung dient damit zur Akquirierung von Substanzen, die durch vorhandene Proteine leicht aufgenommen und modifiziert werden können. Die *de novo* Synthese gewährt den Tieren mehr Unabhängigkeit von der Wirtspflanze und könnte so beispielsweise Wirtswechsel erleichtern.

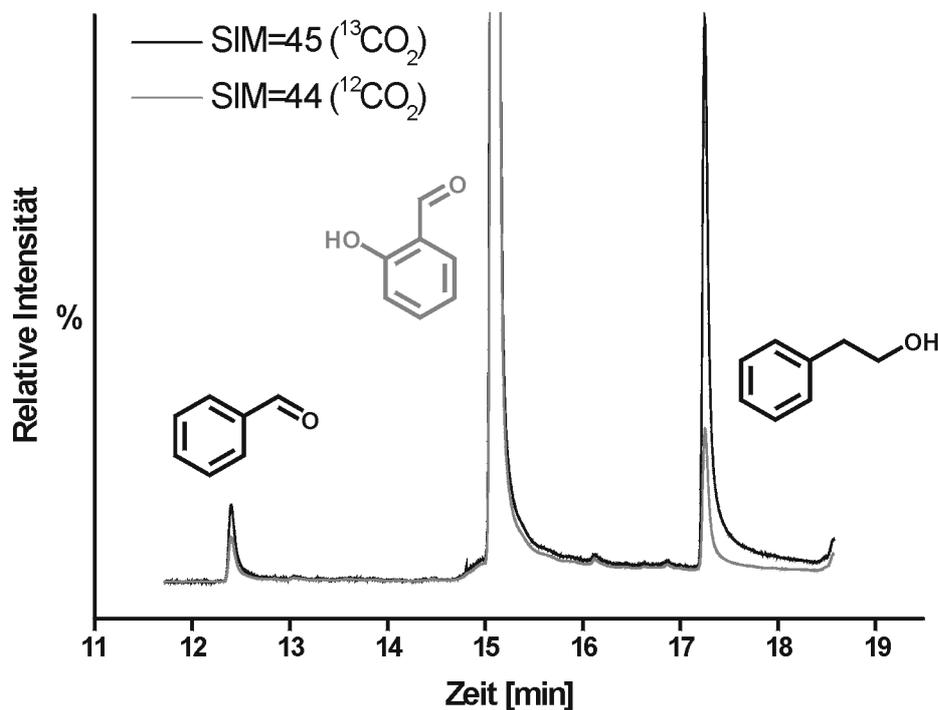


Abbildung 5.21: Ionenspuren 44 und 45 der GC-C-IRMS Messungen von *P. vitellinae* nach Fütterung von ^{13}C -markierten Aminosäuren. Bereiche mit parallelem Verlauf der grauen und schwarzen Kurve kennzeichnen das Vorliegen des natürlichen Verhältnisses von ^{12}C zu ^{13}C (ca. 100:1). Starker Anstieg der schwarzen Kurve kennzeichnet Isotopeneinbau aus den gefütterten Aminosäuren. Dies läßt auf *de novo* Synthese von Benzaldehyd und Phenylethanol schließen. In Salicin werden keine Isotope eingebaut.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Chrysomelide Blattkäferlarven des Subtribus Chrysomelina erwehren sich ihrer Fraßfeinde durch Ausstülpfen von Wehrsekret aus neun paarigen Drüsenreservoirien auf dem Meso- und Metathorax [12, 92–95]. Das Sekret kann, je nach Genus der betreffenden Spezies, sehr unterschiedliche Abwehrsubstanzen enthalten.

Die meisten Spezies der Subtribus Chrysomelina und Phyllodectina synthetisieren ein oder zwei iridoide Monoterpene, ausgehend von Mevalonsäure, *de novo* [101]. Einige Spezies, insbesondere aus dem Genus *Chrysomela*, nehmen glucosidisch gebundene, sekundäre Metabolite ihrer Wirtspflanzen auf und benutzen diese für die eigene Verteidigung [99, 107, 109, 110]. Oftmals wird Salicin von auf Weiden (Salicaceae) lebenden Spezies aufgenommen und durch Hydrolyse und Oxidation im Reservoir in den aktiven Salicylaldehyd überführt [109].

Spezies der sogenannten *C. interrupta*-Gruppe sequestrieren Glucoside von Blatt-Alkoholen ihrer Wirtspflanzen und verestern diese nach Hydrolyse mit aus Aminosäuren *de novo* synthetisierten Carbonsäuren. Bei diesen Spezies finden sich sehr viele verschiedene Wehrsubstanzen im Sekret [111, 112].

Bei Betrachtung der Biosynthesen der chemisch deutlich unterschiedlichen Verbindungen fällt auf, daß einige ähnliche Schritte in allen drei Fällen vorhanden sind. Es kann immer eine glucosidisch gebundene Vorstufe aus der Nahrung vom Darm ins Drüsenreservoir transportiert werden, wobei die Zellmembranen vom Darm zur Hämolymphe und von der Hämolymphe zum Drüsenreservoir passiert werden müssen.

Im Reservoir selber findet sich immer eine Glucosidase, wodurch das Aglycon freigesetzt wird, das dann durch eine Oxidase in ein Aldehyd, oder durch eine Transferase in einen Ester transformiert wird. Die Glucoside dienen dabei als wasserlösliche „Transportvehikel“ und polares Element, das Eindiffusion in Körperzellen verhindert.

Die Biosynthese der verschiedenen Substanzen bei Blattkäferlarven hängt also im wesentlichen von drei verschiedenen Faktoren ab: der Wirtspflanze, deren Blätter verschiedene, glucosidische Metabolite beinhalten, dem involvierten Transportsystem, das für die Aufnahme dieser Metabolite sorgt, und den beteiligten Enzymen, die zur Bildung der Wehrverbindungen aus den transportierten Substanzen führen.

Transport bei chrysolmeliden Blattkäferlarven Der Transportmechanismus dieser Tiere wurde durch Thioglycoside untersucht, da bei diesen Verbindungen lediglich die Brücke zwischen Glycon und Aglycon durch eine Thiobrücke ersetzt ist, wodurch diese Verbindungen ihre strukturelle und chemische Ähnlichkeit zu den natürlichen *O*-Glycosiden behalten, nicht giftig für die Insektenlarven sind, aber im Gegensatz zu den natürlichen Pendants nicht durch hydrolysierende Enzyme, wie Glucosidasen, gespalten werden können. Als weitere Vorteile erweisen sich die gute Detektier- und Quantifizierbarkeit mittels LC-MS und die unproblematische und schnelle Synthese (analog Koenigs-Knorr bzw. Mitsunobu) dieser Verbindungen.

Transportuntersuchungen

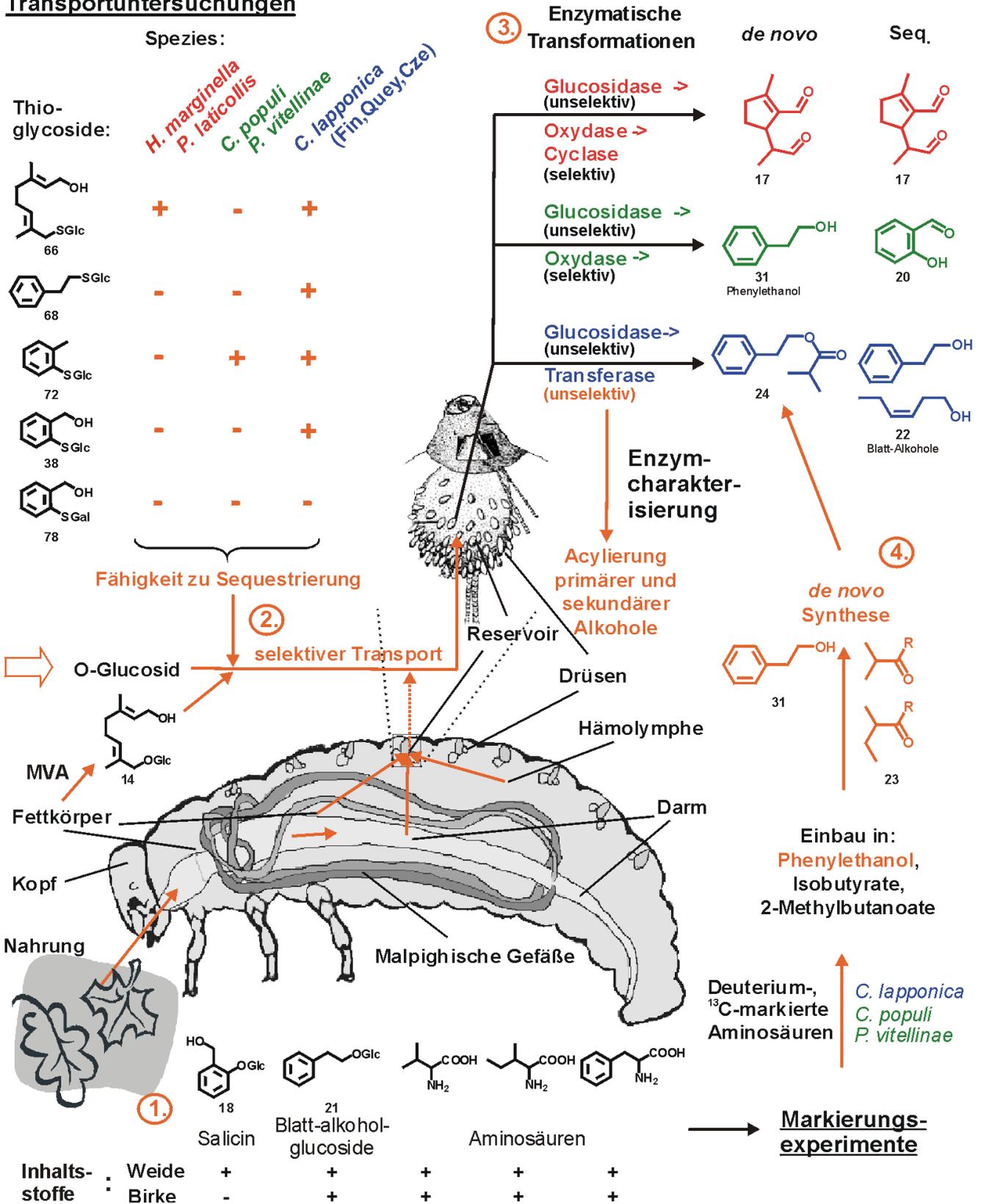


Abbildung 6.1: Gesamtübersicht über die Diversität der Wehrchemie von Blattkäferlarven. Neue Erkenntnisse sind orange dargestellt. Vier Faktoren bestimmen maßgeblich, wie verschiedene Abwehrsubstanzen in Chrysomelidenlarven entstehen:
1. Die mit der Nahrung aufgenommenen Blatt-Alkoholglucoside bestimmen insbesondere bei sequestrierenden Spezies die Zusammensetzung des Wehrsekretes (Abschn. 90). Wenn beispielsweise kein Salicin in der Futterpflanze (Birke) vorhanden ist, kann kein Salicylaldehyd im Reservoir gebildet werden.

2. Transportuntersuchungen mittels Thioglycosiden haben gezeigt, daß glucosidisch gebundene Metabolite aus der Nahrung selektiv vom Darm, über die die Hämolymphe ins Drüsenreservoir transportiert werden (Abschn. 5.1.7-90); die Verbindung **14** wird höchstwahrscheinlich im Fettkörper *de novo* synthetisiert (Abschn. 5.3) und von dort ins Reservoir transportiert.

3. Alle im Reservoir befindlichen Glucoside werden durch Glucosidasen hydrolysiert [96] (Abschn. 5.5). Selektivere Oxidasen und Cyclasen (*H. marginella*, *P. laticollis*, *C. populi*, *P. vitellinae*) transformieren nur wenige Substrate zu Wehrverbindungen wie Iridoiden **17** und Salicylaldehyd **20** (Abschn. 2.3), dagegen führt eine unselektive Transferase (*C. lapponica*), die alle primären und sekundären Alkohole als Substrat akzeptiert (Abschn. 5.4.2), zur Veresterung sehr vieler Blatt-Alkohole zu den entsprechenden Butyraten.

4. Makierungsexperimente mit deuterierten und ^{13}C -markierten Aminosäuren haben zeigen können, daß auch sequestrierende Spezies wie *C. populi* und *P. vitellinae* in der Lage sind, Phenylethanol *de novo* zu synthetisieren (Abschn. 5.6). Alle Spezies sind somit zu *de novo* Synthese und Sequestrierung fähig, allerdings in deutlich unterschiedlichem Ausmaß.

Nach Fütterung von Larven mit verschiedenen Thioglycosiden, die insbesondere Thioanalogue der natürlich vorkommenden Metabolite und deren Derivate und damit alle drei Kategorien von Wehrverbindungen (Iridoide, phenolische Aldehyde und Blatt-Alkoholester) darstellen, konnte bei den Tieren ein selektives Transportsystem festgestellt werden. Allen Spezies war gemein, nur die thioanalogue Verbindungen ihrer natürlich verwendeten Metabolite zu transportieren. *de novo* Synthese betreibende Spezies (*H. marginella* und *P. laticollis*) transportieren nur das Thioglucosid von 8-Hydroxygeraniol in signifikant größerer Menge, d. h., es findet sich ein um 1-3 Zehnerpotenzen größerer Import ins Reservoir als bei den anderen Substanzen. Das natürlich vorkommende *O*-Glucosid wird, ausgehend von Mevalonsäure, höchstwahrscheinlich im Fettkörper biosynthetisiert. Spezies, die auf Salicaceae leben (*C. populi* und *P. vitellinae*), von ihren Wirtspflanzen Salicin aufnehmen und dieses in Salicylaldehyd überführen, transportieren nur Thiosalicin in größerer Menge. Larven von *C. lapponica*, die zur *C. interrupta*-Gruppe gehören, nehmen sehr viele verschiedene Thioglycoside auf, die allesamt als mögliche Thioanalogue von Blatt-Alkoholen bezeichnet werden können. Keine Spezies ist in der Lage, Galactoside zu transportieren.

Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß die Tiere über ein hochselektives, aktives, aber nicht spezifisches Transportsystem für glucosidisch gebundene Metabolite (Glucosidtransporter) verfügen, weshalb nur bestimmte Verbindungen für die weitere Prozessierung im Reservoir zugelassen werden.

Dieses Transportsystem könnte aus membrangebundenen, hocheffizienten Transportproteinen, aus Glucosetransportern entstanden, im Darm und in den Drüsen bestehen. Die genaue Lokalisation (z. B. durch Fluoreszenzmarkierung) dieser Proteine im Tier, und auch die Bestimmung von einem oder mehreren der involvierten Transportertypen (z. B. mittels molekularbiologischer Ansätze durch *in situ*-Hybridisierung oder cDNA-Banken) wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Charakterisierung der Butyryl-Transferase bei *C. lapponica* Von den bei der Biosynthese involvierten Enzymen zeigt die Glucosidase im Sekret der Larven niedrige Spezifität, wodurch das Enzym auch in der Lage ist, andere Glucoside außer den natürlich transportierten zu hydrolysieren. Die Oxidase dagegen hat eine hohe Substratspezifität und oxidiert keine anderen Alkohole. Diese beiden Enzyme sind bereits gut charakterisiert und beschrieben [101, 108]. Nichts ist dagegen über das esterbildende Enzym bei *C. lapponica* bekannt.

Mit Inkubationsexperimenten, bei denen das Sekret oder das isolierte Enzym der Larven mit Puffer und verschiedenen Substanzen versetzt worden ist, konnte die Substratspezifität bestimmt werden. Die Transferase verestert alle getesteten primären und sekundären Alkohole zu Butanoaten der betreffenden Substrate. Tertiäre und phenolische Alkohole werden nicht als Ausgangsmaterial akzeptiert, ebenso wenig werden andere funktionelle Gruppen wie Thiole und Amine transformiert. Leider ist es nicht gelungen, die im Sekret vorliegende aktivierte Form der Buttersäurereste zu bestimmen. Diese stammen aus Aminosäuren (Isoleucin und Valin) und könnten durch oxidative Desaminierung und Decarboxylierung entstehen [116].

In weiteren Arbeiten sollte diese Frage durch chemische Analyse und Bestimmung der Substanzen des Sekretes zu beantworten sein.

Die Isolierung des Enzyms durch Größenausschlußchromatographie war erfolgreich. Zudem haben Sequenzanalysen mittels ESI-MS gezeigt (Banden aus SDS-Gelen ausgeschnitten), daß das Enzym Ähnlichkeiten zu einem Luciferin-Reaktivierendem Enzym (LRE) hat.

Sequestrierung bei *de novo* Synthetisierern — *de novo* Synthese bei Sequestrierern Spezies, die monoterpenoide Iridoide produzieren, können auch deren Vorstufe (Glucosid von 8-Hydroxygeraniol) sequestrieren. Von einigen Spezies des Genus *Chrysomela* ist nur eine Befähigung zur Sequestrierung angenommen worden. Dagegen produzieren Larven der *C. interrupta*-Gruppe Wehrsubstanzen aus sequestrierten Blatt-Alkoholglucosiden und aus körpereigenen Aminosäuren *de novo* (s. o.). Die allgemeine Fähigkeit zur *de novo* Synthese scheint „wiederentdeckt“ worden zu sein. Inwieweit die Befähigung zur Eigenproduktion von Wehrsubstanzen im Genus *Chrysomela* vorhanden ist, konnte erfolgreich durch Fütterung von deuterium- und ¹³C-markierten Aminosäuren, und deren Einbau in den Wehrverbindungen gezeigt werden.

C. lapponica ist in der Lage, Phenylethanol vor allem aus Phenylalanin zu gewinnen und damit Wehrsubstanzen, wie Phenylethylbutanoate, komplett selber zu produzieren; zudem gelang der Nachweis der *de novo* Synthese von Benzoaten und anderen Benzoylderivaten. Auch die Spezies, für die nur Sequestrierung angenommen worden ist (*C. populi* und *P. vitellinae*), zeigen, wenn auch geringe, Eigenproduktion von Phenylethanol und Benzaldehyd. Isotopeneinbau in Salicin konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß im gesamten Subtribus Chrysomelina die Befähigung zur *de novo* Synthese vorhanden ist. Unter welchen Voraussetzungen und in welchem Verhältnis die Larven Wehrsubstanzen eigenständig produzieren, bleibt zu klären.

Entstehung der chemischen Diversität von Wehrsubstanzen Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeichnen ein diffizileres und differenzierteres Bild der Entstehung neuer Wehrsubstanzen in chrysomeliden Blattkäferlarven als die bisher bekannten Modelle (Abschn. 2.3 ff.).

Als erstes kann festgestellt werden, daß die *de novo* Synthese sich nicht nur auf archetypische Vertreter der Chrysomeliden beschränkt, die an der Basis der Phylogenie (Abb. 2.5) zu finden sind, sondern ein generelles Merkmal im Subtribus *Chrysomela*, genauso wie die Sequestrierung keine evolutive Erneuerung innerhalb des Subtribus, sondern alle Spezies dazu befähigt sind. Beide Modi sind ubiquitär bei den getesteten Arten vorhanden.

Möglichst einfache Veränderungen der bestehenden Biosynthese ermöglichen neue Abwehrsubstanzen, nämlich zum einen durch Veränderung der Selektivität des Transporters für glycosidische Metabolite, wodurch das Substratspektrum von Blatt-Alkoholen über phenolische Verbindungen, hin zu Terpenoiden stark verändert werden kann, zum anderen durch veränderte Spezifitäten und Transformationen der involvierten Enzyme im Reservoir.

Diese flexiblen Mechanismen ermöglichen es den Blattkäfern auf erhöhten Selektionsdruck, sei es durch ein verändertes Wirtspflanzenspektrum oder durch prädativen Druck, angemessen und schnell zu

reagieren, nämlich durch den Import neuer Sekundärstoffe der Wirtspflanzen und diese dann zu neuen Abwehrverbindungen zu transformieren.

Das Zusammenspiel der einzelnen Wirkmechanismen, die zur Diversität der Wehrchemie bei Blattkäferlarven führen, zeigt zusammenfassend die Abbildung 6.1 auf Seite 50.

III Experimenteller Teil

7 Synthesen

7.1 Verwendete Chemikalien

Acros	Phenylethylalkohol Triphenylphosphin
Aldrich	Azodicarbonsäurediisopropylester Benzylmercaptan Cer(IV)sulfat Chloro(1,5-cyclooctadien)Iridium(I)dimer Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) 2-Ethyl-1,3-hexandiol 3-Ethyl-3-pentanol Geranylacetat 1-Heptanol 2-Heptanol (+/-)-3-Heptanol Heptylamin Isobuttersäure 2-Methylbuttersäure Methylthiosalicylat Molybdato-phosphorsäure Natriumsulfat Novozym 435 (immobilized) 2-Oxobuttersäure Phenol- d_6 L-Phenylalanin- β - ^{13}C Tetrabrommethan Thioessigsäure 1-Thio- β -D-glucose tetraacetat Thioharnstoff Thiophenol Trimethylphosphin
CIL Cambridge Isotope Laboratories, Inc	L-Phenylalanin-ring- d_5 L-Valin- d_8
Deutero GmbH	Dimethylsulfoxid- d_6
Fluka	Acetobromo- α -D-glucose Amberlite IRC-50

	Amberlite IRC-86 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin (ADDP) Benzylalkohol DMAP 4-(Dimethylamino)-pyridin Lithiumaluminiumhydrid 7-Mercapto-4-methylcoumarin Molekularsieb Typ 4A O-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)- hydroxylaminhydrochlorid Pyridin tert.-Butylhydroperoxid-Lösung THF, Tetrahydrofuran
Isotec Inc	Algal amino acid mixture ¹³ C
Lancaster	2-Mercaptobenzylalkohol 4-Methylumbelliferon m-Thiokresol o-Thiokresol p-Thiokresol
Merck	Aceton Acetonitril Chloroform Chloroform- <i>d</i> ₁ Deuteriumoxid Dichlormethan Diethylether Ethanol Ethylacetat Hexan Kaliumbromid Magnesiumsulfat Methanol Methylbutyrat Natriummethylat Petrolether (40/60) Quecksilber(II)acetat Vinylacetat
Sigma	Acetobromo- α -D-galactose Benzoyl CoenzymA Isobutyryl CoenzymA (\pm)-3-Methyl-2-oxovaleriansäure Natriumsalz Natriumorthovanadat
Toronto	Methyl 3-mercaptobenzoat Methyl 4-mercaptobenzoat

7.2 Synthesvorschriften

Alle Reaktionen werden mit getrockneten Lösungsmitteln unter Argon als Schutzgas durchgeführt. Angegebene Ausbeuten beziehen sich auf, entsprechend den Angaben, gereinigte Substanzen.

In der Literatur [171–196] werden spektroskopische Daten für die Verbindungen **49**, **50**, **51**, **52**, **57**, **61**, **62**, **73**, **77**, **84**, **85** und **87** angegeben. Vielfach werden nur die Schmelzpunkte und der spezifische Drehwert aufgeführt. Spektroskopische Daten werden im Folgenden nicht aufgeführt, wenn in der Literatur NMR- oder MS-Daten zu finden sind, die eine eindeutige Identifizierung der entsprechenden Verbindung zulassen.

7.2.1 Oxidation von Geranylacetat mit Selendioxid

(2E,6E)-8-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl acetat 60 Zu einer Suspension von 375 mg (3,2 mmol) Selendioxid in 30 ml Dichlormethan werden 3 ml (14 mmol) Geranylacetat **65** und 3 ml (16,5 mmol) einer 5,5 M wasserfreien Lösung von *t*-Butylhydroperoxid in Nonan gegeben. Nach dreistündigem Rühren des Gemisches bei Raumtemperatur wird abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene gelbe Öl wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen.

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Et₂O:PE 1: 1, R_f =0,25). Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [129].

Ausbeute: 1,545 g (7,29 mmol; 52%).

7.2.2 Allgemeine Synthesvorschriften zur Darstellung von geschützten Glycosiden

Kupplung nach Koenigs-Knorr

Geschützte phenolische Glycoside (**53**, **54**, **55**, **50**, **51**, **51**, **52**, **57**, **56**) wurden durch eine modifizierte Koenigs-Knorr-Kupplung dargestellt.

824 mg (2 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glukopyranosylbromid (Acetobrom- α -D-glucose) und 560 μ l (4 mmol) Triethylamin werden in 4 ml Acetonitril gelöst. Bei Zugabe von 2 mmol phenolischen Aglycons färbt sich das Reaktionsgemisch gelb. Nach 2 h Rühren bei RT werden 50 ml Chloroform zugegeben und 3 Mal mit Wasser gewaschen.

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus EtOH. Das Produkt fällt in Form weißer Nadeln aus. Bei nichtkristallisierbaren Substanzen erfolgte Reinigung durch MPLC (RP-18 Lichroprep, MeOH:H₂O 1: 1) oder HSCCC (Wasser 7: Methanol 13: Chloroform 8).

2-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 53 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [129].

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	1,648 g (4 mmol)
Triethylamin	1,120 ml (8 mmol)
Methyl-2-mercaptobenzoat	606 μ l (4 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 1,684 g (3.37 mmol; 84 %).

3-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 54 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μ l (4 mmol)
Methyl-3-mercaptobenzoat	336 mg (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 917 mg (1,84 mmol; 93%). Schmelzpunkt: 96°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 8,14 (t, $J=1,6$, 1H); 7,97 (dt, $J_1=7,8$; $J_2=1,3$, 1H); 7,67 (ddd, $J_1=7,9$; $J_2=1,6$; $J_3=1,3$, 1H); 7,38 (t, $J=7,8$, 1H); 5,21 (t, $J=9,4$, 1H); 5,03 (t, $J=9,8$, 1H); 4,96 (dd, $J_1=9,8$; $J_2=9,4$, 1H); 4,72 (d, $J=10,1$, 1H); 4,22 (dd, $J_1=12,3$; $J_2=5,1$, 1H); 4,15 (dd, $J_1=12,3$; $J_2=2,4$, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,73 (ddd, $J_1=10,0$; $J_2=5,2$; $J_3=2,3$, 1H); 2,08 (s, 3H); 2,05 (s, 3H); 2,00 (s, 3H); 1,97 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 170,6; 170,1; 169,3; 169,2; 166,2; 137,2; 133,8; 132,4; 131,0; 129,4; 128,9; 85,5; 75,9; 73,9; 69,9; 68,1; 62,1; 52,3; 20,7; 20,6; 20,5; 20,5. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2950; 1746; 1722; 1437; 1367; 1292; 1254; 1226; 1128; 1092; 1048; 917; 820; 753; 684. **MS** (70 eV) m/z (%): 467(4); 332(10); 331(57); 170(10); 169(100); 168(5); 145(6); 139(8); 137(7); 127(20); 115(6); 110(5); 109(62); 97(7); 81(5). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{S}$ 467,101194; gef.: 467,101577. **UV** λ_{max} [nm]: 253.

4-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 55 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μ l (4 mmol)
Methyl-4-mercaptobenzoat	336 mg (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 625 mg (1,25 mmol; 63%). Schmelzpunkt: 123°C. **¹H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 7,90 (dt, J₁=8,7; J₂=1,9, 2H); 7,44 (dt, J₁=8,7; J₂=1,9, 2H); 5,19 (t, J=9,4, 1H); 5,00 (t, J=9,7, 1H); 4,97 (dd, J₁=10,1; J₂=9,3, 1H); 4,76 (d, J=10,1, 1H), 4,18 (dd, J₁=12,4; J₂=5,5, H); 4,12 (dd, J₁=12,3; J₂=2,4, 1H); 3,85 (s, 3H); 3,72 (ddd, J₁=10,1; J₂=5,3; J₃=2,5, 1H); 2,03 (s, 3H); 2,01, (s, 3H); 1,97 (s, 3H); 1,93 (s, 3H). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 170,1; 169,3; 169,2; 166,4; 138,6; 130,9; 130,0; 129,4; 85,0; 76,0; 73,8; 69,8; 68,1; 62,1; 52,2. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2958; 2870; 1754; 1722; 1597; 1440; 1379; 1289; 1222; 1120; 1077; 1048; 981; 919; 818; 757; 690. **MS** (70 eV) m/z (%): 67(3); 332(8); 331(39); 271(5); 170(7); 169(100); 168(5); 145(7); 139(9); 137(7); 127(16); 115(5); 109(59); 97(7). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₂₁H₂₃O₁₀S 467,101194 ; gef.: 467,102913. **UV** λ_{max} [nm]: 276.

Phenyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 49 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [181, 183, 188].

Ansatz:

Acetobrom-α-D-glucose	2,472 g (6 mmol)
Triethylamin	1,680 ml (12 mmol)
Thiophenol	615 μl (6 mmol)
Acetonitril	12 ml

Ausbeute: 2,421 g (5,5 mmol; 92%).

2-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 50 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [191, 193].

Ansatz:

Acetobrom-α-D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μl (4 mmol)
o-Thiokresol	242 mg (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 772 mg (1,7 mmol; 85 %).

3-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 51 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [193].

Ansatz:

Acetobrom-α-D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μl (4 mmol)

m-Thiokresol	248 mg (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 757 mg (1,67 mmol; 83 %).

4-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 52 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur [175, 176, 187, 193, 197].

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μl (4 mmol)
p-Thiokresol	246 mg (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 764 mg (1,68 mmol; 84%).

4-Methyl-2-Oxo-2H-chromen-7-yl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'- β -D-glucopyranosid 57 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur [191, 193].

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μl (4 mmol)
4-Methylumbelliferon	344 mg (2 mmol)
Acetonitril	8 ml

Ausbeute: 608 mg (1,2 mmol; 60%).

4-Methyl-2-Oxo-2H-chromen-7-yl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 56 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Acetobrom- α -D-glucose	822 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μl (4 mmol)
7-Mercapto-4-Methylcoumarin	384 mg (2 mmol)
Acetonitril	8 ml

Ausbeute: 860 mg (1,65 mmol; 82%). ¹**H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 7,49 (d, J=8,4, 1H); 7,46 (d, J=1,8, 1H); 7,29 (dd, J₁=8,28; J₂=1,8, 1H); 6,26 (d, J=1,1, 1H); 5,24 (dd, J₁=9,4; J₂=9,4, 1H); 5,05 (dd, J₁=9,8; J₂=9,7, 1H); 5,01 (dd, J₁=9,8; J₂=9,6, 1H); 4,82 (d, J=10,1, 1H); 4,23 (dd, J₁=12,3; J₂=4,9, 1H); 4,19 (dd, J₁=12,4; J₂=2,8, 1H); 3,80 (ddd, J₁=10,1; J₂=4,9; J₃=3,0, 1H); 2,41 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 2,06 (s, 3H); 2,02 (s, 3H); 1,97 (s, 3H). ¹³**C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 170,7; 170,0; 169,3; 169,2; 160,1; 153,5; 151,7; 137,5; 126,7; 124,6; 119,3; 118,7; 115,2; 84,7; 76,1; 73,7; 69,6; 68,0; 62,1; 20,7; 20,7; 20,7; 20,5; 18,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3447; 3077; 2943; 1748; 1604; 1438; 1366; 1222; 1167; 1034; 951; 913; 857; 818. **MS** (70 eV) m/z (%): 332(9); 331(52); 235(5); 205(5); 193(14); 192(33); 191(31); 170(10); 169(100); 164(14); 163(29). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₂₄H₂₆O₁₁S : 522,119584; gef.: 522,120331. **UV** λ_{max} [nm]: 297; 325.

2-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-galactopyranosid 58 Synthese entsprechend obiger Vorschrift, wobei anstelle von Acetobrom- α -D-glucose Acetobrom- α -D-galactose verwendet wurde. Das Produkt ist wenig stabil und darf nicht zur Trockene einrotiert werden.¹

Ansatz:

Acetobrom- α -D-galactose	824 mg (2 mmol)
Triethylamin	560 μ l (4 mmol)
Methyl-2-mercaptobenzoat	300 μ l (2 mmol)
Acetonitril	4 ml

Ausbeute: 499 mg (1,0 mmol; 50%). Schmelzpunkt: 158°C. ¹**H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 7,89 (dd, J₁=7,8; J₂=1,5, 1H); 7,65 (dd, J₁=8,0; J₂=0,8, 1H); 7,45 (td, J₁=7,8; J₂=1,6, 1H); 7,30 (td, J₁=7,6; J₂=1,0, 1H); 5,47 (dd, J₁=3,3; J₂=0,7, 1H); 5,36 (t, J=10,0, 1H); 5,10 (dd, J₁=9,9; J₂=3,4, 1H); 4,87 (d, J=10,1, 1H); 4,19 (dd, J₁=11,6; J₂=7,3, 1H); 4,13 (dd, J₁=11,3; J₂=5,9, 1H); 4,02 (td, J₁=6,5; J₂=0,8, 1H); 3,90 (s, 3H); 2,17 (s, 3H); 2,05 (s, 3H); 2,04 (s, 3H); 1,99 (s, 3H). ¹³**C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 170,4; 170,2; 170,1; 169,3; 166,8; 136,8; 132,1; 130,8; 129,4; 126,3; 84,9; 74,5; 72,1; 67,2; 66,9; 61,8; 52,2; 20,8; 20,7; 20,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2974; 2882; 1752; 1708; 1470; 1440; 1373; 1280; 1251; 1222; 1144; 1110; 1080; 1056; 954; 920; 750. **MS** (70 eV) m/z (%): 331(100); 229(7); 170(10); 169(95); 167(13); 137(10); 136(22); 127(28); 109(58); 81(9). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₁₄H₁₉O₉ 331,102908 ; gef.: 331,103165. **UV** λ_{max} [nm]: 255; 307.

Mitsunobu-Kupplung

Zur Darstellung von geschützten, alkyl-substituierten Thioglycosiden wurde eine Mitsunobu-Kupplung eingesetzt.

¹Synthese von Eva Petterson durchgeführt.

1,870 g (7,4 mmol) im Ölpumpenvakuum getrocknetes ADDP werden in 40 ml absolutem THF gelöst und unter Eiskühlung werden 7,4 ml (7,4 mmol) einer 1 M Lösung von Trimethylphosphan in THF gegeben. Die orangefarbene Lösung wird eine halbe Stunde bis zur Entfärbung zu einem schwachen Gelb gerührt. 1,82 g (5 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-thio- α -D-glucopyranose **59** werden nach Trocknung im Ölpumpenvakuum zusammen mit 779 mg (3,7 mmol) 8-Hydroxygeranylacetat **15** in 20 ml THF gelöst und bei Raumtemperatur zu der Reaktionsmischung gegeben. Das Gemisch wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und mit Petrolether das entstandene Hydrazid ausgefällt. Nach erneutem Abfiltrieren, wird das Lösungsmittel wieder im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird nun in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE:PE 3:6, $R_f=0,17$). Es bleibt ein schwach gelbes Öl zurück.

(2E,6E)-8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 64 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur [105].

Ansatz:

ADDP	2,124 g (8 mmol)
1 M Trimethylphosphan-Lsg.	8 ml (8 mmol)
1-thio- β -D-glucose tetraacetat	1,888 g (5,2 mmol)
8-Hydroxygeranylacetat 15	837 mg (4 mmol)

Ausbeute: 1,755 g (3,15 mmol; 79%).

(3Z)-Hex-3-en-1-yl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 63

Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

ADDP	504 mg (2 mmol)
1 M Trimethylphosphan-Lsg.	2 ml (2 mmol)
1-thio- β -D-glucose tetraacetat	472 mg (1 mmol)
(<i>Z</i>)-3-Hexenol 34	100 mg (1 mmol)

Ausbeute: 366 mg (0,82 mmol; 82%). Schmelzpunkt: 66°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 5,44-5,15 (m, 2H); 5,09 (td, $J_1=9,4$; $J_2=1,6$, 1H); 4,91 (td, $J_2=9,9$; $J_3=0,7$, 1H); 4,78 (ddd, $J_1=10,0$; $J_2=9,4$; $J_3=1,0$, 1H); 4,40 (dd, $J_1=10,0$; $J_2=5,6$, 1H); 4,11 (ddd, $J_1=12,4$; $J_2=5,0$; $J_3=2,1$, 1H); 4,01 (ddd, $J_1=12,3$; $J_2=1,9$; $J_3=1,5$,

1H); 3,60 (dddd, $J_1=10,0$; $J_2=5,0$; $J_3=2,4$; $J_4=1,2$, 1H); 2,60-2,44 (m, 2H); 2,22-2,03 (m, 2H); 1,83 (s, 3H); 1,82 (q, $J=7,5$, 3H); 1,81 (s, 3H); 1,78 (s, 3H); 1,76 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 170,1; 169,7; 169,0; 168,9; 133,3; 126,2; 83,2; 75,7; 73,7; 69,7; 68,2; 62,0; 29,6; 27,4; 25,2; 20,3; 20,3; 20,2; 20,2; 13,9. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3011; 2962; 2877; 1745; 1483; 1375; 1303; 1256; 1229; 1092; 1043; 978; 916; 879; 835. **MS** (70 eV) m/z (%): 331(31); 211(10); 169(100); 145(7); 139(9); 127(24); 115 (15); 109(67); 103(5); 97(6); 81(7); 55(10). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{S}$ 446,161055; gef.: 446,160927. **UV** λ_{max} [nm]: 256.

2-Phenylethyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 61 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

ADDP	1,514 g (6 mmol)
1 M Trimethylphosphan-Lsg.	6 ml (6 mmol)
1-thio- β -D-glucose tetraacetat	1,421 g (3 mmol)
Phenylethanol 31	366 mg (3 mmol)

Ausbeute: 366 mg (1,65 mmol; 55%, einer karamelartigen Substanz). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7,32-7,25 (m, 2H); 7,24-7,16 (m, 3H); 5,18 (t, $J=9,4$, 1H); 5,05 (t, $J=9,7$, 1H); 5,02 (t, $J=9,6$, 1H); 4,43 (d, $J=9,9$, 1H); 4,22 (dd, $J_1=11,9$; $J_2=5,0$, 1H); 4,12 (dd, $J_1=12,3$; $J_2=2,4$, 1H); 3,64 (ddd, $J_1=10,0$; $J_2=5,0$; $J_3=2,3$, 1H); 3,10-2,84 (m, 4H); 2,04 (s, 3H); 2,02 (s, 3H); 2,00 (s, 3H); 1,98 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 170,6; 170,2; 169,4; 169,3; 140,0; 128,5; 128,4; 126,5; 83,5; 76,0; 73,9; 69,9; 68,5; 62,2; 36,3; 31,2; 20,7; 20,7; 20,6; 20,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3047; 2964; 2922; 2849; 1738; 1643; 1373; 1257; 1227; 1092; 1037; 912; 802. **MS** (70 eV) m/z (%): 393(14); 381(9); 348(5); 331(21); 293(26); 281(9); 275(8); 243(8); 231(15); 219(13); 193(8); 181(26); 170(6); 169(48); 143(7); 131(23); 127(6); 119(24); 109(18); 105(5); 100(5); 69(100). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$ 331,102908 ; gef.: 331,103966. **UV** λ_{max} [nm]: 252.

Benzyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 62 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur [172, 183, 185, 189].

Ansatz:

ADDP	1,008 g (4 mmol)
1 M Trimethylphosphan-Lsg.	4 ml (4 mmol)
1-thio- β -D-glucose tetraacetat	944 mg (2,6 mmol)
Benzylalkoholol 32	216 mg (2 mmol)

Ausbeute: 626 mg (1,38 mmol; 69%).

7.2.3 Entschützungen und Reduktionen

Zur Entschätzung der acylierten Glycoside werden zwei verschiedene Methoden angewendet, abhängig davon, ob das Aglycon eine Carboxygruppe trägt, die zum Alkohol reduziert werden muß. Die Verbindungen **53**, **54** und **55** werden deshalb mit Lithiumaluminiumhydrid entschätzt und reduziert. Alle anderen Glycoside werden alkalisch mit Methanolat verseift.

Entschätzung und Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

In einem 50 ml Zweihalskolben werden 15 ml Tetrahydrofuran vorgelegt. Dann werden 120 mg (3,2 mmol) Lithiumaluminiumhydrid zugegeben. Unter Eiskühlung wird langsam eine Lösung von 500 mg (1 mmol) geschütztem Glycosid in 15 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Anschließend wird die Reaktion erhitzt und 2 Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen werden dann nacheinander unter Eiskühlung 0,15 ml Wasser, 0,15 ml 15 % ige Natronlauge und 0,45 ml Wasser zugegeben. Der dabei entstehende weiße Niederschlag wird abfiltriert und mehrfach mit Methanol gewaschen.

Die Reinigung erfolgt über MPLC auf einer RP-18 Säule mit einem 2:3 Gemisch aus Wasser und Methanol oder mittels HSCCC (Wasser 7: Methanol 13: Chloroform 8; $S_F=0,7$).

2-Hydroxymethyl-phenyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid (Thiosalicin) 38 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit spektroskopischen Daten aus der Literatur [129].

Ansatz:

2-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 53	500 mg (1 mmol)
Lithiumaluminiumhydrid	120 mg (3,2 mmol)

Ausbeute: 147 mg (0,49 mmol; 50%).

3-Hydroxymethyl-phenyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 75 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

3-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 54	500 mg (1 mmol)
Lithiumaluminiumhydrid	120 mg (3,2 mmol)

Ausbeute: 119 mg (0,4 mmol; 40%, einer karamelartigen Substanz). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ [ppm]: 7,60 (s, 1H); 7,55 (d, $J=7,8$, 1H); 7,30 (dd, $J_1=7,9$; $J_2=7,7$, 1H); 7,24 (d, $J=7,8$, 1H); 4,69 (d, $J=9,8$, 1H); 4,52 (s, 2H); 3,78 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=2,1$, 1H); 3,60 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=5,8$, 1H); 3,42 (t, $J=9,2$, 1H); 3,38 (ddd,

$J_1=9,8$; $J_2=6,0$; $J_3=2,1$, 1H); 3,30 (t, $J=9,4$, 1H); 3,24 (t, $J=9,4$, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ [ppm]: 142,7; 133,6; 131,9; 131,4; 130,7; 128,2; 88,4; 81,2; 78,5; 73,0; 70,6; 64,7; 62,1. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3100 ; 2925; 2853; 1269; 1120; 1016. **MS** (70 eV) m/z (%): 302(2); 162 (6); 145(14); 141(8); 140(100); 139(5); 127(9); 123(7); 109(5); 107(7); 97(5); 91(9); 87(14); 85(20); 79(7); 77(11); 73(17). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{S}$: 302,082410; gef.: 302,082123. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 251.

4-Hydroxymethyl-phenyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 74

Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

4-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra- O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 55	475 mg (0,95 mmol)
Lithiumaluminiumhydrid	120 mg (3,2 mmol)

Ausbeute: 165 mg (0,55 mmol; 57%). Schmelzpunkt: 77°C. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ [ppm]: 7,46 (d, $J=8,2$, 2H); 7,27 (d, $J=8,2$, 2H); 4,67 (d, $J=10,1$, 1H); 4,52 (s, 2H); 3,78 (dd, $J_1=12,4$; $J_2=1,7$, 1H); 3,60 (dd, $J_1=12,4$; $J_2=5,6$, 1H); 3,41 (t, $J=9,0$, 1H); 3,37 (ddd, $J_1=10,0$; $J_2=5,9$; $J_3=1,0$, 1H); 3,29 (t, $J=9,6$, 1H); 3,23 (dd, $J_1=9,5$; $J_2=9,6$, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ [ppm]: 142,9; 134,5; 133,9; 130,8; 89,9; 82,6; 79,9; 74,4; 72,0; 66,0; 63,5. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3100 ; 2893; 2449; 2363; 1489; 1405; 1275; 1035; 860; 800. **MS** (70 eV) m/z (%): 302(3); 145(14); 142(5); 141(8); 140(100); 139(5); 127(10); 123(9); 122(7); 111(8); 109(4); 107(13); 97(6); 91(8); 87(12); 85(21); 79(8); 78 (4); 77(12); 73(17); 71(3); 69(9); 61(10); 60(9); 57(6). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{S}$: 302,082410; gef.: 302,082756. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 252.

2-Hydroxymethyl-phenyl-1'-thio- β -D-galactopyranosid 78

Synthese entsprechend obiger Vorschrift²

Ansatz:

2-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra- O-acetyl-1'-thio- β -D-galactopyranosid 58	500 mg (1 mmol)
Lithiumaluminiumhydrid	120 mg (3,2 mmol)

Ausbeute: 165 mg (0,55 mmol; 57%). Schmelzpunkt: 158°C. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 7,78 (dd, $J_1=7,7$; $J_2=1,3$, 1H); 7,49 (dd, $J_1=7,5$; $J_2=1,3$, 1H); 7,35 (td, $J_1=7,5$; $J_2=1,3$, 1H); 7,30 (td, $J_1=7,5$; $J_2=1,5$, 1H); 4,89 (d, $J=13,1$, 1H); 4,79 (d, $J=12,9$, 1H); 4,51 (d, $J=9,8$, 1H); 3,91 (dd, $J_1=3,6$; $J_2=0,8$, 1H); 3,79 (dd, $J_1=11,5$; $J_2=6,8$, 1H); 3,73 (dd, $J_1=11,3$; $J_2=5,2$, 1H); 3,60 (t, $J=9,4$, 1H); 3,56 (dd, $J_1=5,4$; $J_2=1,0$, 1H); 3,55 (dd, $J_1=5,8$; $J_2=0,6$, 1H); 3,51 (dd, $J_1=9,2$; $J_2=3,2$, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 144,8; 135,2; 133,6; 129,6; 129,2; 90,8; 80,7; 76,3; 71,1; 70,5; 63,8; 62,7. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3100 ; 2940;

²Synthese von Eva Petterson durchgeführt.

2917; 2886; 1417; 1130; 1085; 1045; 1009; 950; 860; 820; 802; 758. **MS** (70 eV) *m/z* (%): 302(15); 140(71); 123(33); 122(100); 121(41); 91(46); 85(28); 77(22); 73(55); 69(16); 61(21); 57(24). **HR-MS** *m/z* [M⁺]: ber. für C₁₃H₁₈O₆S : 302,082410; gef.: 302,082154. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 250.

2-Mercaptobenzylalkohol 88 Synthese entsprechend obiger Vorschrift³. Diese Synthese dient zur Herstellung des Thioaglycons. Entsprechend ist hier kein Glycosid eingesetzt worden, sondern Methylthiosalicylat, wobei der Ester zum Alkohol reduziert wird.

Ansatz:

Methylthiosalicylat	336 mg (2 mmol)
Lithiumaluminiumhydrid	240 mg (6,4 mmol)

¹**H-NMR** (CD₃OD) δ [ppm]: 7,89 (d, 1H); 7,65 (d, 1H); 7,45 (t, 1H); 7,30 (t, 1H); 4,71 (s, 2H). ¹³**C-NMR** (CD₃OD) δ [ppm]: 142,8; 135,9; 131,7; 129,3; 127,5; 127,3; 62,9. **MS** (70 eV) *m/z* (%): 140 (19); 138 (11); 137 (7); 123 (13); 122 (100); 121 (72); 109 (8); 78 (25); 77 (29). **HR-MS** *m/z* [M⁺]: ber. für C₇H₈OS : 141,0374 ; gef.: 141,0297. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 269.

Entschützungen mit Methanolat

0,73 mmol des geschützten Glycosids werden in 10 ml Methanol gelöst, 0,5 ml (3 mmol) einer 30%igen Natriummethanolat-Lsg. werden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit einem Ionentauscher (Amberlite IRC 50 oder Amberlite IRC86) neutralisiert und abfiltriert.

Die Reinigung erfolgt über MPLC auf einer RP-18 Säule mit einem 2:3 Gemisch aus Wasser und Methanol oder mittels HSCCC (Wasser 7: Methanol 13: Chloroform 8; S_F=0,8).

(2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid

66 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur [105].

Ansatz:

(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl -2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetyl-1'-thio-β-D- glucopyranosid 64	1,6 g (2,875 mmol)
30%-ige NaOMe-Lsg.	0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 720 mg (2,07 mmol; 72%).

³Synthese von Eva Petterson durchgeführt.

(3Z)-Hex-3-en-1-yl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 67 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

(3Z)-Hex-3-enyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- 325 mg (0,73 mmol)1'-thio- β -D-glucopyranosid **63**

30%-ige NaOMe-Lsg. 0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 133 mg (0,48 mmol; 67%). Schmelzpunkt: 65°C. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 5,80-5,55 (m, 2H); 4,67 (dd, $J_1=9,8$; $J_2=4,5$, 1H); 4,03 (d, $J=12,5$, 1H); 3,88 (dd, $J_1=12,2$; $J_2=4,3$, 1H); 3,65-3,57 (m, 3H); 3,48 (td, $J_1=9,5$; $J_2=1,6$, 1H); 2,94-2,91(m, 2H); 2,57-2,46 (m, 2H); 2,25-2,12 (m, 2H); 1,11 (t, $J=7,5$, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 134,2; 127,4; 85,7; 80,2; 77,7; 72,8; 69,9; 61,3; 30,2; 27,7; 20,7; 14,1. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3416; 2942; 2832; 1637; 1458; 1261; 1112; 1032; 804. **MS** (70 eV) m/z (%): 278(2); 234(1); 229(1); 205(2); 198(4); 187(3); 169(5); 163(13); 162(18); 145(78); 127(53); 117(18); 116(43); 115(100); 103(13); 99(14); 97(21); 91(27); 87(92); 85(90); 83(18); 82(22); 81(12); 73(65); 71(18); 69(34); 67(17); 61(39); 60(30); 57(41); 55(43). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{S}$: 278,118796; gef.: 278,118609. **UV** λ_{max} [nm]: 256.

2-Phenylethyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 68 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Phenethyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- 773 mg (1,65 mmol)1'-thio- β -D-glucopyranosid **61**

30%-ige NaOMe-Lsg. 0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 476 mg (1,58 mmol; 96%, eines gelben Öles). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 7,24-7,17 (m, 4H); 7,17 (tt, $J_1=6,8$; $J_2=1,8$, 1H); 4,37 (d, $J=9,5$, 1H); 3,87 (dd, $J_1=11,9$; $J_2=2,1$, 1H); 3,62 (dd, $J_1=11,9$; $J_2=5,5$, 1H); 3,37-3,37 (m, 1H); 3,31 (t, $J=8,7$, 1H); 3,27 (ddd, $J_1=9,5$; $J_2=6,0$; $J_3=2,4$, 1H); 3,21 (dd, $J_1=9,8$; $J_2=8,5$, 1H); 2,99-2,84 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ [ppm]: 141,2; 129,3; 129,2; 127,1; 85,6; 80,4; 77,8; 73,0; 70,1; 61,5; 36,2; 31,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: > 3100; 3026; 2923; 1499; 1453; 1350; 1273; 1050; 885; 822; 698. **MS** (70 eV) m/z (%): 300(3); 282(3); 264(2); 251(2); 223(3); 163(10); 162(10); 145(58); 138(57); 127(37); 116(56); 105(100); 104(61); 91(58); 87(43); 85(69); 73(61); 69(23); 61(31); 60(30); 57(35). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{S}$: 300,103146; gef.: 300,102707. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 259.

Benzyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 69 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Benzyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- 325 mg (0,7 mmol)

1'-thio- β -D-glucopyranosid 62

30%-ige NaOMe-Lsg.

0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 190 mg (0,68 mmol; 96%, einer karamelartigen Substanz). **$^1\text{H-NMR}$** (D_2O) δ [ppm]: 7,28-7,19 (m, 4H); 7,18-7,12 (m, 1H); 4,11 (d, $J=9,4$, 1H); 3,83 (d, $J=13,1$, 1H); 3,74 (d, $J=13,4$, 1H); 3,66 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=2,2$, 1H); 3,49 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=5,5$, 1H); 3,21-3,18 (m, 1H); 3,17-3,10 (m, 3H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (D_2O) δ [ppm]: 138,1; 129,3; 128,8; 127,8; 84,1; 79,9; 77,4; 72,3; 69,7; 61,1; 33,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3428; 2924; 1640; 1546; 1460; 1070; 869; 773. **MS** (70 eV) m/z (%): 286(3); 268(4); 250(3); 195(4); 145(45); 124(59); 116(20); 110(17); 91(100); 85(49); 73(45); **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$: 286,087496; gef.: 286,087578. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 258.

4-Tolyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 70 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

4-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-

459 mg (1,01 mmol)

1'-thio- β -D-glucopyranosid 52

30%-ige NaOMe-Lsg.

0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 274 mg (0,96 mmol; 96%). Schmelzpunkt: 148°C. **$^1\text{H-NMR}$** (CD_3OD) δ [ppm]: 7,37 (d, $J=8,2$, 2H); 7,14 (d, $J=8,2$, 2H); 4,59 (d, $J=9,8$, 1H); 3,77 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=2,1$, 1H); 3,59 (dd, $J_1=12,4$; $J_2=5,6$, 1H); 3,40 (t, $J=8,9$, 1H); 3,33 (ddd, $J_1=9,8$; $J_2=5,5$; $J_3=2,1$, 1H); 3,27 (t, $J=9,6$, 1H); 3,21 (q, $J=9,0$, 1H); 2,22 (s, 3H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (CD_3OD) δ [ppm]: 139,0; 133,8; 131,4; 130,8; 89,9; 82,2; 79,9; 73,9; 71,6; 63,1; 21,4. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3200; 3021; 2912; 2878; 2641; 1488; 1438; 1388; 1322; 1239; 1211; 1178; 1079; 1045; 868; 807. **MS** (70 eV) m/z (%): 286(6); 145(8); 127(6); 124(100); 123(10); 97(5); 91(22); 87(10); 85(15); 73(13); 69(7); 61(8); 57(9). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$: 286,087496; gef.: 286,087404. **UV** λ_{max} [nm]: 201; 250.

3-Tolyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 71 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

3-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-

476 mg (1,05 mmol)

1'-thio- β -D-glucopyranosid 51

30%-ige NaOMe-Lsg.

0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 297 mg (1,04 mmol; 99%). Schmelzpunkt: 91°C. **$^1\text{H-NMR}$** (CD_3OD) δ [ppm]: 7,36 (s, 1H); 7,30 (d, $J=7,6$, 1H); 7,13 (t, $J=7,6$, 1H); 7,02 (d, $J=7,6$, 1H); 4,54 (d, $J=10,1$, 1H); 3,82 (dd, $J_1=12,2$;

$J_2=1,8$, 1H); 3,62 (dd, $J_1=12,2$; $J_2=5,5$, 1H); 3,35 (t, $J=8,7$, 1H); 3,28 (ddd, $J_1=9,2$; $J_2=5,9$; $J_3=1,9$, 1H); 3,25 (dd, $J_1=9,3$; $J_2=8,7$, 1H); 3,18 (dd, $J_1=9,8$; $J_2=8,9$, 1H); 2,22 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 140,1; 135,3; 133,4; 130,0; 129,3; 89,7; 82,3; 79,9; 74,1; 71,7; 63,2; 21,6. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3100; 2908; 1586; 1473; 1419; 1375; 1280; 1214; 1123; 1067; 890; 828; 772; 688. **MS** (70 eV) m/z (%): 286(4); 145(10); 127(8); 126(5); 125(10); 124(100); 123(6); 97(5); 91(21); 87(10); 85(18); 73(13); 69(7); 61(9); 57(9). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$: 286,087496; gef.: 286,087410. **UV** λ_{max} [nm]: 203; 250.

2-Tolyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 72 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

2-Tolyl-2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetyl- 1'-thio- β -D-glucopyranosid 50	450 mg (0,99 mmol)
30%-ige NaOMe-Lsg.	0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 278 mg (0,97, mmol; 98%, einer karamelartigen Substanz). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 7,52 (dd, $J_1=7,2$; $J_2=1,7$, 1H); 7,21 (dd, $J_1=7,8$; $J_2=1,4$, 1H); 7,18 (td, $J_1=7,2$; $J_2=1,9$, 1H); 7,15 (td, $J_1=7,4$; $J_2=1,8$, 1H); 4,69 (d, $J=10,1$, 1H); 3,78 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=2,1$, 1H); 3,60 (dd, $J_1=12,5$; $J_2=5,5$, 1H); 3,35 (t, $J=8,7$, 1H); 3,48 (ddd, $J_1=9,6$; $J_2=5,5$; $J_3=2,1$, 1H); 3,45 (d, $J_1=6,1$, 1H); 3,43 (dd, $J_1=8,5$; $J_2=7,6$, 1H); 2,42 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 140,0; 135,2; 132,7; 131,1; 128,2; 127,7; 89,3; 82,0; 79,7; 74,2; 71,4; 62,9; 21,1. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: >3100; 2925; 1589; 1466; 1363; 1272; 1228; 1108; 1045; 921; 884; 825; 737; 680. **MS** (70 eV) m/z (%): 286(3); 145(12); 124(100); 97(6); 91(21); 87(13); 85(22); 73(15); 69(9); 61(10); 57(12). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$: 286,087496; gef.: 286,087761. **UV** λ_{max} [nm]: 210; 247.

Phenyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 73 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur [181].

Ansatz:

Phenyl-2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetyl- 1'-thio- β -D-glucopyranosid 49	2,421 g (5,5 mmol)
30%-ige NaOMe-Lsg.	1 ml (6,4 mmol)

Ausbeute: 941 mg (3,45 mmol; 63%).

4-Methyl-2-Oxo-2H-chromen-7-yl-1'- β -D-glucopyranosid 77 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten aus der Literatur [177, 180].

Ansatz:

4-Methyl-2-Oxo-2*H*-chromen-7-yl-2',3',4',6'-tetra- 570 mg (1,1 mmol)

O-acetyl- β -D-glucoopyranosid **57**

30%-ige NaOMe-Lsg. 0,5 ml (3,2 mmol)

Ausbeute: 173 mg (0,51 mmol; 46%).

Das Produkt ist nicht stabil und verfärbt sich an der Luft braun.

4-Methyl-2-Oxo-2*H*-chromen-7-yl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid **76** Synthese entsprechend obiger
Vorschrift.

Ansatz:

4-Methyl-2-Oxo-2*H*-chromen-7-yl-2',3',4',6'-tetra- 850 mg (1,62 mmol)

O-acetyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid **56**

30%-ige NaOMe-Lsg. 1 ml (6,4 mmol)

Ausbeute: 570 mg (1,61 mmol; 99%). ¹**H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 6,79 (d, J=7,7, 1H); 6,67 (d, J=1,8, 1H); 6,56 (dd, J₁=7,7; J₂=2,0, 2H); 5,81 (d, J=1,3, 1H); 3,82 (dd, J₁=12,4; J₂=2,1, 1H); 3,64 (dd, J₁=12,5; J₂=5,7, 1H); 3,45 (t, J=8,9, 1H); 3,42 (ddd, J₁=9,6; J₂=5,8; J₃=2,0, 1H); 3,34 (t, J=9,6, 1H); 3,29 (dd, J₁=9,8; J₂=8,7, 1H); 1,93 (d, J=1,3, 3H). ¹³**C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 177,2; 147,7; 132,8; 131,6; 129,7; 124,3; 122,3; 116,6; 87,9; 80,5; 78,1; 72,5; 70,1; 61,4; 24,3. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3429; 2924; 2856; 1717; 1604; 1460; 1382; 1320; 1053; 917; 879; 825; 772; 578. **MS** (70 eV) m/z (%): 355(21); 341(7); 281(73); 267(10); 216(14); 207(30); 191 (100); 177(20); 166(61); 164(38); 153(41); 151(37); 150(30); 147(25); 129(19). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₁₀H₇O₂S : 191,016676; gef.: 191,016087. **UV** λ_{max} [nm]: 299, 326.

Fluoreszenz $\lambda_{max,Em}$ [nm]: 407.

7.2.4 Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Butyraten

Zur Herstellung von Referenzestern wurden primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole mit Isobuttersäure und 2-Methylbuttersäure in Gegenwart von DMAP und DCC umgesetzt.

Zu 10 mmol Carbonsäure in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan werden unter Rühren 80 mg DMAP und 15 mmol Alkohol gegeben. Bei 0°C werden dann 2,3 g (11 mmol) DCC in 10 ml Dichlormethan zugegeben und 5 min. gerührt. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der entstandene Harnstoff abfiltriert und das Gemisch mit 0,5 N Salzsäure und ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (CH₂Cl₂, R_f=0,4).

Heptylisobutyrat 82 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

1-Heptanol	0,6 ml (4,24 mmol)
Isobuttersäure	0,1 ml (1,06 mmol)
DMAP	95 mg (0,78 mmol)
DCC	230 mg (1,11 mmol)

Ausbeute: 190 mg (1,02 mmol; 96%). Schmelzpunkt: flüssig. **¹H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 4,03 (t, J=6,7, 2H); 2,50 (sept. , J=7,0, 1H); 1,59 (quint. , J=7,0, 2H); 1,36-1,19 (m, 8H); 1,13 (d, J=7,0, 6H); 0,86 (t, J=7,0, 3H). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 177,2; 64,4; 34,0; 31,7; 28,9; 28,6; 25,9; 22,5; 19,0; 14,0. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2931; 2858; 1736; 1470; 1343; 1192; 1158; 1078. **MS** (70 eV) m/z (%): 186(11); 144(46); 142(38); 100(13); 98(37); 89(50); 83(22); 82(13); 71(35); 70(29); 69(20); 62(29); 57(100); 56(86); 55(63). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₁₁H₂₂O₂ : 186,161980 ; gef.: 186,161682. **UV** λ_{max} [nm]: 253.

Heptan-2-yl-isobutyrat 83 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

2-Heptanol	1,42 ml (10 mmol)
Isobuttersäure	0,23 ml (2,5 mmol)
DMAP	110 mg (0,9 mmol)
DCC	572 mg (2,75 mmol)

Ausbeute: 210,3 mg (1,13 mmol; 45%). Schmelzpunkt: flüssig. **¹H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 4,86 (tq, J₁=6,4; J₂=6,4, 1H); 2,48 (sept. , J=7,0, 1H); 1,59-1,50 (m, 1H); 1,49-1,38 (m, 1H); 1,36-1,19 (m, 6H); 1,16 (d, J=6,2, 3H); 1,13 (dd, J₁=7,0; J₂=2,5, 6H); 0,85 (t, J=7,0, 3H). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 176,8; 70,5; 35,9; 34,2; 31,6; 25,0; 22,5; 19,9; 19,0; 18,9; 13,9. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2977; 2934; 2867; 1734; 1470; 1386; 1331; 1263; 1196; 1162; 1124; 1071; 948; 754; 728. **MS** (70 eV) m/z (%): 170(15); 149(22); 141(17); 115(11); 98(24); 85(31); 83(13); 77(20); 71(49); 70(13); 69(15); 57(100); 56(22); 55(33). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₇H₁₅O₁ : 115,112290; gef.: 115,112404. **UV** λ_{max} [nm]: 253.

3-Ethylpentan-3-yl-isobutyrat 84 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

3-Ethyl-3-pentanol	1,42 ml (10 mmol)
Isobuttersäure	0,23 ml (2,5 mmol)
DMAP	27,5 mg (0,23 mmol)
DCC	572 mg (2,75 mmol)

Ausbeute: 1,7 mg (0,01 mmol; <1%). Schmelzpunkt: flüssig. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 2,47 (sept. , $J=7,0$, 1H); 1,82 (q, $J=7,5$, 6H); 1,14 (d, $J=7,0$, 6H); 0,81 (t, $J=7,5$, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 173,2; 87,8; 35,4; 31,3; 18,7; 7,9. IR (NaCl-Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2932; 2855; 2120; 1814; 1728; 1451; 1387; 1359; 1198; 1136; 1021; 890; 646. **MS** (70 eV) m/z (%): 170(11); 157(44); 149(23); 99(70); 98(64); 87(30); 83(16); 77(11); 72(16); 71(100); 70(17); 69(51); 57(99); 56(15); 55(41). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$: 1186,161980; gef.: 186,892. **UV** λ_{max} [nm]: 286.

Heptyl-2-methylbutanoat 85 Synthese entsprechend obiger Vorschrift. Identifizierung durch Vergleich mit MS-Daten aus der Literatur [179].

Ansatz:

1-Heptanol	1,06 ml (7,5 mmol)
2-Methylbuttersäure	0,27 ml (2,5 mmol)
DMAP	17,5 mg (0,59 mmol)
DCC	572 mg (2,75 mmol)

Ausbeute: 500,8 mg (2,49 mmol; 99%).

Heptan-2-yl-2-methylbutanoat 86 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

2-Heptanol	1,06 ml (7,5 mmol)
2-Methylbuttersäure	0,27 ml (2,5 mmol)
DMAP	17,5 mg (0,14 mmol)
DCC	572 mg (2,75 mmol)

Ausbeute: 190 mg (1,02 mmol; 41%). Schmelzpunkt: flüssig. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 4,87 (sext. t, $J_1=6,3$; $J_2=0,7$, 1H); 2,29 (sext. , $J=6,9$, 1H); 1,64 (qd, $J_1=7,4$; $J_2=6,2$, 1H); 1,59-1,49 (m, 1H); 1,48-1,36 (m, 2H); 1,35-1,20 (m, 6H); 1,17 (d, $J=6,2$, 3H); 1,10 (dd, $J_1=7,0$; $J_2=0,7$, 3H); 0,87 (t, $J=7,5$, 3H); 0,85 (t, $J=6,9$, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 176,4; 70,5; 41,4; 35,9; 31,6; 26,8; 25,0; 22,5; 20,0; 20,0; 16,7; 16,6; 13,9; 11,6. IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2969; 2933; 2865; 2737; 2362; 2121; 1734; 1624; 1579; 1462; 1380; 1337; 1299; 1265; 1188; 1167; 1123; 1080; 1026; 969; 930; 860; 803; 752; 720. **MS** (70 eV) m/z (%): 163(12); 103(24); 99(14); 98(28); 85(59); 83(21); 81(14); 70(10); 69(11); 57(100); 56(38); 55(43). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_1$: 115,112290 ; gef.: 115,112217. **UV** λ_{max} [nm]: 253.

3-Ethylpentan-3-yl-2-methylbutanoat 87 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

3-Ethyl-3-pentanol	1 ml (7,1 mmol)
2-Methylbuttersäure	0,27 ml (2,5 mmol)
DMAP	25 mg (0,2 mmol)
DCC	572 mg (2,75 mmol)

Ausbeute: 6,3 mg (0,03 mmol; 2%). Schmelzpunkt: flüssig. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 2,29 (sext., $J=6,9$, 1H); 1,76 (q, $J=7,5$, 2H); 1,73-1,31 (m, 6H); 1,14 (d, $J=6,9$, 3H); 1,12-1,04 (m, 3H); 0,90 (t, $J=7,5$, 3H); 0,85-0,81 (m, 3H); 0,74 (t, $J=7,5$, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 172,3; 87,6; 42,0; 26,8; 26,2; 15,8; 11,3; 7,6. IR (NaCl-Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2970; 2880; 1815; 1727; 1461; 1383; 1264; 1193; 1135; 1037; 871. **MS** (70 eV) m/z (%): 200(19); 167(17); 149(44); 113(10); 112(10); 111(10); 103 (14); 99(11); 97(17); 85(51); 84(10); 83(23); 81(10); 71(45); 70(15); 69(29); 57 (100); 56(13); 55(32). **HR-MS** m/z [M^+]: ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$: 200,177630; gef.: 200,178368.

7.2.5 Umesterung zur Darstellung von Vinylbutyraten

Vinylbutyrat sind durch Umesterung von Vinylacetat synthetisiert worden. Als Katalysator für diese Reaktion dient Quecksilber(II)acetat [141, 142].

Ein mit Rückflußkühler bestückter 50 ml Zweihalskolben wird mit 10 mmol Carbonsäure, 15 ml (160 mmol) Vinylacetat, 66 mg (4% w/w) Quecksilber(II)acetat und 10 ml THF gefüllt. Nach 30 min. Rühren unter Argon werden 2 μl (0,04 mmol) Schwefelsäure zugegeben und die gerührte Reaktionsmischung auf 40°C erhitzt. Nach 12 Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von Natriumacetat im Überschuß beendet. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösungsmittels und des überschüssigen Vinylacetats wird der Ester in Diethylether aufgenommen und zuerst mit Natriumhydrogencarbonat-Lsg., dann mit Kochsalzlösung extrahiert, filtriert und über Natriumsulfat getrocknet. Reinigung erfolgt durch Rektifikation bei vermindertem Druck.

Vinylisobutyrat Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Vinylacetat	15 ml (160 mmol)
Isobuttersäure	881 mg (10 mmol)
Quecksilberacetat	66 mg (0,2 mmol)
Schwefelsäure	2 μl (0,04 mmol)

Ausbeute: 105,6 mg (0,9 mmol; 9%). Schmelzpunkt: flüssig. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7,22 (dd, $J_1=13,9$; $J_2=6,2$, 1H); 4,82 (dt, $J_1=14,0$; $J_2=1,7$, 1H); 4,50 (ddd, $J_1=6,2$; $J_2=1,6$; $J_3=1,6$, 1H); 2,55 (quint., $J=7,0$, 1H); 1,15 (d, $J=7,1$, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 174,1; 141,4; 97,4; 33,8; 18,1. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$

[cm⁻¹]: 3124; 3091; 2978; 2939; 2879; 1754; 1647; 1471; 1388; 1372; 1345; 1292; 1242; 1216; 1186; 1148. **MS** (70 eV) m/z (%): 114(45); 97(23); 87(17); 73(16); 72(15); 71(100); 57(16); 55(23). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₆H₁₀O₂: 114,068080; gef.: 114,068127. **UV** λ_{max} [nm]: 286.

Vinyl-2-methylbutanoat Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Vinylacetat	15 ml (160 mmol)
2-Methylbuttersäure	1020 mg (10 mmol)
Quecksilberacetat	80 mg (0,25 mmol)
Schwefelsäure	2 μl (0,04 mmol)

Ausbeute: 111 mg (0,9 mmol; 9%). Schmelzpunkt: flüssig. ¹H-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7,27 (dd, J₁=14,0; J₂=6,3, 1H); 4,86 (dt, J₁=14,0; J₂=1,4, 1H); 4,55 (dt, J₁=6,3; J₂=1,6, 1H); 2,43 (quint., J=7,0, 1H); 1,70 (dt, J₁=13,7; J₂=7,4, 1H); 1,50 (tt, J₁=13,9; J₂=7,4, 1H); 1,17 (d, J=7,0, 3H); 0,91 (t, J=7,5, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 173,7; 141,3; 97,4; 40,8; 26,5; 16,3; 11,5. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3089; 2972; 2939; 2880; 1818; 1751; 1647; 1463; 1374; 1296; 1225; 1172; 1147; 1009; 951; 872; 807; 748; 703. **MS** (70 eV) m/z (%): 128(17); 115(9); 103(7); 85(100); 84(8); 73(18); 71(33); 69(19); 57(79); 56(7); 55(37); 54(10). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₇H₁₂O₂: 128,083730; gef.: 128,083807. **UV** λ_{max} [nm]: 261.

7.2.6 Regioselektive Acylierung von Glycosiden

Verschiedene Glycoside und Thioglycoside werden selektiv in 6-Position des Kohlenhydrates acyliert. Dazu werden die Glycoside in Gegenwart einer *Candida antarctica*-Lipase (Novozym 435) und Vinylestern in organischen Lösungsmitteln umgesetzt [142].

0,35 mmol Glycosid werden in 8 ml eines 1:1 Gemisches aus Pyridin und Tetrahydrofuran gelöst. 0,13 ml (1,4 mmol) Vinylester und 50 mg *candida antarctica*-Lipase B (Novozym 435) werden zugegeben und das Reaktionsgemisch 48 h bei 37°C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml Methanol beendet, das Enzym abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung erfolgt mittels HSCCC (Chloroform 7: Methanol 13: Wasser 8).

2-Hydroxymethyl-phenyl-6'-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 79 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Vinylacetat	0,13 ml (1,4 mmol)
Salicin 18	100 mg (0,35 mmol)
Novozym 435	50 mg

Ausbeute: 96 mg (0,28 mmol; 80%). Schmelzpunkt: 159°C. **¹H-NMR** (DMSO) δ [ppm]: 7,36 (d, $J=6,7$, 1H); 7,18 (td, $J_1=7,6$; $J_2=1,2$, 1H); 7,02 (d, $J=8,6$, 1H); 7,00 (t, $J=7,7$, 1H); 5,4 (s(br), 1H); 5,3 (s(br), 2H); 5,0 (s(br), 1H); 4,79 (d, $J=7,5$, 1H); 4,62 (d, $J=14,3$, 1H); 4,34 (d, $J=14,3$, 1H); 4,26 (dd, $J_1=11,7$; $J_2=1,9$, 1H); 4,08 (dd, $J_1=11,8$; $J_2=6,8$, 1H); 3,57 (ddd, $J_1=9,5$, $J_2=6,9$, $J_3=2,2$, 1H); 3,30-3,22 (m, 2H); 3,20-3,14 (m, 1H); 2,00 (s, 3H). **¹³C-NMR** (CD₃OD) δ [ppm]: 170,2; 154,3; 131,5; 127,6; 127,1; 121,8; 114,7; 101,1; 76,2; 73,5; 73,2; 69,9; 63,4; 58,1; 20,5. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3397; 2883; 1744; 1604; 1493; 1457; 1366; 1239; 1079; 1040; 841; 763; 636; 603. **MS** (70 eV) m/z (%): 343(9); 279(19); 231(10); 181(17); 167(26); 149(71); 131 (15); 119(10); 88(11); 86(63); 84(100); 79(38); 71(13); 70(13); 69(51); 57(25); 55(13); 52(25); 51(43). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₈H₁₃O₆ : 205,071213; gef.: 205,071854. **UV** λ_{max} [nm]: 261.

2-Methyl-phenyl-6'-O-(2-Methylpropanyl)-1'-thio- β -D-glucopyranosid 80 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Vinylisobutyrat	40 μ l (0,35 mmol)
72	33 mg (0,12 mmol)
Novozym 435	12,5 mg

Ausbeute: 15,3 mg (0,04 mmol; 37%, einer karamelartigen Substanz). **¹H-NMR** ((CD₃)₂SO) δ [ppm]: 7,46 (dd, $J_1=5,0$; $J_2=4,1$, 1H); 7,18 (dd, $J_1=4,6$, $J_2=4,6$, 1H); 7,12 (ddd, $J_1=9,3$; $J_2=3,6$; $J_3=3,6$, 2H); 5,37 (d, $J=6,4$, 1H); 5,26 (d, $J=5,5$, 1H); 5,22 (d, $J=5,0$, 1H); 4,65 (d, $J=10,1$, 1H); 4,32 (dd, $J_1=11,9$; $J_2=1,4$, 1H); 3,95 (dd, $J_1=11,9$; $J_2=7,3$, 1H); 3,48 (ddd, $J_1=8,5$; $J_2=7,8$; $J_3=0,7$, 1H); 3,24 (td, $J_1=8,7$; $J_2=5,0$, 1H); 3,10 (tt, $J_1=9,1$; $J_2=6,3$, 1H); 2,28 (s, 3H); 2,16 (tt, $J_1=7,0$; $J_2=4,1$, 1H); 1,06 (d, $J=12,8$, 3H); 1,05 (d, $J=12,8$, 3H). **¹³C-NMR** ((CD₃)₂SO) δ [ppm]: 176,1; 137,4; 134,3; 130,0; 129,4; 126,5; 126,4; 86,4; 78,0; 77,6; 72,6; 70,1; 64,0; 33,4; 20,4; 18,9. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3408; 1722; 1634; 1410; 1296; 1200; 1042; 900; 810; 750; 579. **MS** (APCI) m/z (%): 374(4, M + NH₄); 357(3, M + H); 339(26, (M + H) - H₂O); 321(7, (M + H) - 2 \times H₂O); 303(12, (M + H) - 3 \times H₂O); 233(100, Glycon); 215(6, Glycon - H₂O); 197(3, Glycon - 2 \times H₂O); 179(1, Glycon - 3 \times H₂O). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für [C₁₇H₂₄O₆S + H] : 357,4445; gef.: 357,3250. **UV** λ_{max} [nm]: 255.

(3Z)-Hex-3-en-1-yl-6'-O-(2-Methylpropanyl)-1'-thio- β -D-glucopyranosid 81 Synthese entsprechend obiger Vorschrift.

Ansatz:

Vinylisobutyrat	40 μ l (0,35 mmol)
67	33 mg (0,12 mmol)
Novozym 435	12,5 mg

Ausbeute: 1,3 mg (0,004 mmol; 4%, einer karamelartigen Substanz). **¹H-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 5,55-5,45 (m, 1H); 5,38-5,32 (m, 1H); 4,50 (dd, J₁=12,2; J₂=4,4, 1H); 4,35 (d, J=9,6, 1H); 4,29 (dd, J₁=12,4; J₂=2,3, 1H); 3,59 (t, J=8,8, 1H); 3,48 (ddd, J₁=9,7; J₂=4,5, J₃=2,4, 1H); 3,38 (td, J₁=8,5, J₂=0,9, 2H); 2,72 (q, J=7,9, 2H); 2,62 (quin, J=7,0, 1H); 2,39 (q, J=7,2, 2H); 2,06 (quin, J=7,2, 2H); 1,19 (dd, J₁=7,0, J₂=3,4, 6H); 0,97 (t, J=7,5, 3H). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ [ppm]: 178,1; 133,9; 126,2; 86,3; 78,1; 77,4; 72,3; 69,7; 63,1; 34,0; 30,3; 27,9; 20,7; 19,1; 14,2. **IR** (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3394; 2967; 1733; 1637; 1467; 1352; 1200; 1163; 1081; 980; 885; 833. **MS** (70 eV) m/z (%): 348(1); 233(31); 215(67); 203(14); 169(49); 145(25); 127(39); 115(49); 89(29); 71(100); 55(37). **HR-MS** m/z [M⁺]: ber. für C₁₆H₂₈O₆S : 348,160661 ; gef.: 348,163345. **UV** λ_{max} [nm]: 256.

8 Analytik

8.1 Spektroskopie

NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500 Bruker Avance 400
IR-Spektrometer	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
HR-MS-Spektrometer	Micromass MassSpec Micromass Quattro II
MALDI-TOF-MS	Micromass Q-Tof 1.5
UV-Spektrometer	JASCO V-550UV/VIS Spektrophotometer
Polarimeter	JASCO P-1030 Polarimeter
Kristallstruktur	Nonius KappaCCD Diffraktometer

8.2 Chromatographie

LC-MS	Agilent HP1100 mit Finnigan LCQ
LC-Säulen	GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 μ m, 125*2mm GROM-SIL 120 ODS-7 ph, 4 μ m, 125*2mm
GC-MS	Finnigan MAT Magnum (Ionenfalle) ThermoQuest trace GC-MS 2000 (Quadrupol)
GC-C-IRMS	Micromass IsoPrime
GC-Säulen	Alltech EC-5; Länge: 15m; ID: 0,25mm; Film:

	0,25 μm
Säulenchromatographie	Merck, Kieselgel 60 (0,0963-0,200mm)
MPLC (Reversed Phase)	Merck, LiChroprep [®] RP-18 (40-63 μm)
DC	Merck, PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂ 45, Schichtdicke 2mm
HSCCC	Triple Coil, P.C. inc
Größenausschluß- chromatographie	Amersham, SMART System, Superdex 75

8.3 Optische Geräte

Mikroskop	Zeiss Axioskop
Stereomikroskop	Zeiss Stemi 2000-C
Schmelzpunktbestimmung	Büchi Melting Point B-540

8.4 Waagen

Präzisionswaagen	Mettler Toledo PB3002-S
Analysenwaagen	Sartorius BP 210 S Sartorius BP 211 D
Mikrowaage	Mettler-Toledo UMX-2

8.5 Parameter für die Chromatographie

8.5.1 LC-MS Parameter für die Untersuchung von Thioglycosiden und CoAs

Alle quantitativen Bestimmungen von Thioglycosiden erfolgten mit den aufgeführten Voreinstellungen. Der HPLC-Lauf wurde durch gleichzeitige UV-Messungen bei 3 verschiedenen Wellenlängen verfolgt.

Injektionsvolumen	3-30 μl
Maximaldruck	350 bar
UV-Detektor	224 nm 254 nm 280 nm

Thioglycoside:

Laufmittel	A: Wasser mit 0,5 % Essigsäure B: Acetonitril mit 0,5 % Essigsäure
Flußrate	0,25 ml/min

CoAs:

Laufmittel	A: Wasser mit 0,5 % Trifluoressigsäure B: Acetonitril mit 0,5 % Trifluoressigsäure
Flußrate	0,2 ml/min

Tabelle 8.1: HPLC-Gradienten für die Untersuchung von Thioglycosiden und CoAs

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0,0	5,0
17,0	100,0
25,0	100,0
25,1	5,0
35,0	5,0

Es wurden bei der MS stets APCI Messungen im Positiv-Ionenmodus durchgeführt. Dabei wurden das Massenspektrometer auf die jeweiligen Verbindungen abgestimmt („getuned“). Insgesamt fanden vier verschiedene sogenannte „Tunings“ Verwendung: Eine allgemeine Maschineneinstellung für Thioglycoside, welche die jeweiligen $[M + H_2O]^+$ -Ionen als intensivste liefern sollte (**38**, **75**, **74**, **78**: 320; **68**: 318; **72**, **71**, **70**, **69**: 304; **73**: 290. Bei dem (3Z)-Hex-3-enyl-Derivat **67** wurde das $[M - H_2O]^+$ -Ion (**67**: 264) als intensivstes beobachtet, ebenso für das 8-Hydroxygeranylderivat (**66**: 331), für das ein eigenes „Tuning“ erstellt wurde. Weitere eigene Einstellungen wurden für das fluoreszente Thioglycosid (**76**: 355) und alle untersuchten Coenzymester (Benzoyl CoenzymA: 872, Isobutyryl CoenzymA: 838) verwendet. Die Untersuchungen umfaßten die Massenbereiche 50-500 für alle Thioglycoside und 50-2000 für die CoAs.

8.5.2 GC-MS Parameter für die Untersuchung flüchtiger Verbindungen

Als Trägergas diente bei allen Messungen Helium (3 ml/min). Außerdem wurde immer ohne Split gearbeitet, die Messung begann 3 min nach Injektion.

Tabelle 8.2: Voreinstellung der APCI-Ionisierung für die Untersuchung von Thioglycosiden und CoAs

	Thioglycoside	CoAs
Kapillar-Temp. [°C]	180	250
Verdampfer-Temp. [°C]	470	
Reaktandgas-Flußrate [?]	85	85
Hilfsgas-Flußrate [?]	40	20
Quellenspannung [kV]	6	7,7
Quellenstrom [μ A]	6,5	100

Tabelle 8.3: Gradienten der GC-MS Messungen zur Untersuchung flüchtiger Verbindungen

Rampe [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
	50	2
10	200	0
30	280	1

8.5.3 ESI-MS Parameter

ESI-Messungen wurden unter Nutzung einer medium nano ES-Kapillare (Protona, Dänemark) durchgeführt.

Die Kapillarspannung (650-800 V) regelt die Probenflußrate; die Kegelspannung betrug 45 V; Desolvationsgas kam nicht zum Einsatz.

Für die MS-Spektren wurden 25 scans (2 pro Sekunde) durchgeführt und gemittelt. Im MS/MS-Modus fand Argon als Kollisionsgas mit einer Energie zwischen 16 und 42 eV Verwendung. Bei der Ermittlung der Spektren kam electrospray positive ion mode (ESI+) zum Einsatz, und die Bearbeitung der Daten erfolgte mit MASSLynxTM 3.5. Peptidsequenzen sind manuell berechnet worden.

9 Biologische Experimente

9.1 Zuchtbedingungen

Alle Spezies werden für Versuche unter konstanten Bedingungen in Weinschränken bei 18°-20°C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden gehalten.

Von Jacques Pasteels (Brüssel) gesammelte oder angezüchtete Spezies wurden als Eier oder junge Larven auf dem Postweg aus Brüssel zugestellt. Die Zuchtbedingungen in Brüssel und Jena können unter-

schiedlich sein. In Tabelle 9.1 sind die Konditionen in Jena angegeben.

Phaedon cochleariae läßt sich in ganzjähriger Kultur auf käuflichem Chinakohl (*Brassica pekinensis*) halten, während alle anderen Spezies an die Vegetationsperioden der Wirtspflanzen gebunden sind. Auch legen die Adulten zu sehr verschiedenen Zeitpunkten im Jahr und dann auch noch unterschiedlich oft Eier, so daß Larven nur in begrenzten Zeiträumen zur Verfügung standen.

Tabelle 9.1: Futterpflanzen, Herkunft und Verfügbarkeit (Larven) der verwendeten Spezies.

Spezies	Futterpflanze	Herkunft	Larven
<i>Chrysomela lapponica</i>			
(Cze)	<i>Betula pendula</i>	Tschechische Republik	Jul.
(Fin)	<i>Salix caprea</i>	Finnland	Jul.
(Quey)	<i>Salix caprea</i>	Queyras, Frankreich	Jul.
	<i>Salix caprea x alba</i>		
<i>Chrysomela populi</i>	<i>Populus canadensis</i>	Turin, Italien	Mai – Okt.
<i>Gastrophysa viridula</i>	<i>Rumex acetosa</i>	Jena	Apr. – Dez.
	<i>Rumex obtusifolia</i>		
<i>Hydrotassa marginella</i>	<i>Ranunculus repens</i>	Treignes, Belgien	Apr.
<i>Phaedon cochleariae</i>	<i>Brassica pekinensis</i>	Labor	ganzjährig
<i>Phratora laticollis</i>	<i>Populus canadensis</i>	Brüssel, Belgien	Apr. – Dez.
<i>Phratora vitellinae</i>	<i>Populus canadensis</i>	Brüssel, Belgien	Apr. – Dez.

9.2 Fütterungsexperimente

Die Fütterung von Thioglycosiden beeinflusst die Entwicklung der Larven nicht nennenswert [129].

Bei allen Fütterungsexperimenten wurden die Larven in mit feuchten Tüchern ausgelegten Kisten gehalten. Die jeweiligen Testsubstanzen wurden dabei als wässrige oder methanolische Lösungen gleichmäßig auf die Blattoberseite der Wirtspflanze (s. Tab. 9.1) aufgebracht; nach Trocknung der Blätter konnten entsprechende Blattkäferlarven im dritten Larvenstadium während bestimmter Zeitintervalle fressen.

Bei der Wahl der Blattgröße und Anzahl der Larven war entscheidend, daß nach der Versuchsdauer höchstens die Hälfte, auf jeden Fall aber ein Rest an imprägnierter Wirtspflanze übrig blieb.

Während der dann folgenden Sekret-Abnahme wurden die Larven mit einer Pinzette festgehalten, die ausgestülpten Sekrettröpfchen sofort mit einem Kapillarröhrchen eingesammelt. Zur Entnahme von Hämolymphe wurde den Larven ein Bein an- oder abgeschnitten und die austretende Hämolymphe in Kapillarröhrchen aufgezogen, die abgenommene Menge an Sekret und Hämolymphe durch Differenzwägung der Kapillarröhrchen bestimmt.

Zur Analyse wurden die Proben, abhängig vom Versuch, in Wasser, Hexan oder einer 1/1 Mischung

aus Wasser und Methanol gelöst bzw. suspendiert, dann bei 10 000 g zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit LC-MS oder GC-C-IRMS untersucht.

9.2.1 Wahlversuch mit imprägnierten und unbehandelten Blättern

Einfach Wahlversuche sollten sicherstellen, daß die Fütterung von Thioglycosiden keinen wesentlichen Einfluß auf das Fraßverhalten der Larven hat. Die Untersuchung umfaßte drei Versuchsreihen über das Fraßverhalten von *C. populi* mit Thiosalicin-imprägnierten Blättern von *Populus canadensis*.

In einer Versuchsreihe durften 10 Larven auf jeweils ca. 35 cm² mit 0,5 ml 25 mM Thiosalicin-Lsg. imprägnierten Blättern und gleicher Menge unbehandelter Blätter 24 Stunden fressen. Hierbei zeigte sich augenscheinlich keine Bevorzugung von behandelten oder unbehandelten Pappelblättern.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden imprägnierte und nicht imprägnierte Blätter in unterschiedlichen Versuchen gefüttert und die gefressenen Blattflächen betrachtet und verglichen. Auch hier fraßen die Larven subjektiv ähnliche Mengen an Blattmaterial.

9.2.2 Fütterung von Thioglycosiden

Es wurden je nach Löslichkeit 10 bzw. 25 mM Lösungen der Thioglycoside, bzw. in einem Versuch das Thioaglycon (Thiosaligenin), in Methanol oder Wasser angesetzt. Bei allen Versuchen sollten die Konzentrationen etwa 0,5 µmol cm⁻² auf den Blättern zu erreichen (s. Tab. 9.2).

Die Sammlung von Sekret und Hämolymphe erfolgte bei der Kinetik nach 2, 4, 8, 16, 32 und 48 Stunden, bei allen anderen Versuchen ausschließlich nach 48 Stunden Fütterung.

Tabelle 9.2: Versuchsbedingungen der Thioglycosid-Fütterungsexperimente für verschiedene Spezies

Spezies	Blattgröße [cm ²]	Larven pro Blatt
<i>Chrysomela lapponica</i>	25	4
<i>Chrysomela populi</i>	35	4
<i>Hydrotassa marginella</i>	35	7
<i>Phratora laticollis</i>	25	6
<i>Phratora vitellinae</i>	25	4

9.2.3 Konkurrierende Fütterung von Thioglycosiden

Larven von *C. lapponica* fanden Verwendung für Fütterungsexperimente, bei denen zum einen der Einfluß der Wirtspflanze auf den Transport, zum anderen der Einfluß der gleichzeitigen Fütterung mehrerer Thioglycoside festgestellt werden sollte. Im ersten Fall konnten Larven auf imprägnierten Blättern von

Salix caprea, einer an Salicin armen Weidenart, und *Salix caprea x alba*, einer Weidenart, deren Salicinhalt recht hoch ist, fressen. Im zweiten Fall geschah das mit Larven auf Blättern von *Salix caprea*, die gleichzeitig mit zwei verschiedenen Thioglycosiden gleicher Konzentration imprägniert worden sind.

9.2.4 Fütterung von isotopenmarkierten Substanzen

Für die Fütterung von L-Phenylalanin-ring- d_5 , L-Phenylalanin- β - ^{13}C und Algal amino acid mixture ^{13}C werden ca. 1 mM Lösungen der betreffenden Substanzen hergestellt, und jeweils 0,5 ml auf ca. 15-20 cm² Blattfläche imprägniert, 5-10 Larven fressen dann 24 Stunden auf den Blättern. Danach wird Sekret wie oben beschrieben gesammelt, in Hexan gelöst und nach Zentrifugation der Überstand mittels GC-MS oder GC-C-IRMS untersucht.

9.3 Charakterisierung des acylierenden Enzyms im Sekret von *C. lapponica*

Zur Untersuchung des Sekretes von *C. lapponica* lassen sich Experimente anstellen, bei denen entweder das Rohsekret (Abschn. 9.3.1) oder das aufgereinigte Enzym (Abschn. 9.4) mit verschiedenen Substanzen inkubiert wird.

Vor den eigentlichen Inkubationsexperimenten fressen die Larven auf Pflanzen mit hohem (*Salix caprea x alba*) und niedrigem (*Salix caprea*) Salicinhalt. Dann werden ca. 1 mg Sekret der jeweiligen Tiere mit Hexan ausgeschüttelt und nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile die organische Phase direkt mittels GC-MS untersucht. Die auf diese Weise aufgenommenen Spektren dienen als Referenzen zur Feststellung von Veränderungen der Zusammensetzung der flüchtigen Substanzen im Sekret nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen.

9.3.1 Experimente mit Rohsekret

Sekret von *C. lapponica* wird gesammelt und in Fraktionen von 0,5 μ l Größe in 200 μ l Mikroinsätze für GC-Probengläschen aliquotiert.

Zum Sekret werden Lösungen von Thioglycosiden in Wasser gegeben; nach einer Reaktionszeit von 24 h werden 40 μ l einer 1/1 Mischung aus Wasser und Methanol zugefügt, nach Abzentrifugieren wird der Überstand mittels LC-MS untersucht.

In weiteren Versuchen wird das Rohsekret mit 10 μ l Puffer (pH=6,5) und 10 μ l gesättigten Lösungen von Alkoholen versetzt, nach 24 Stunden Reaktionszeit mit 20 μ l einer Lösung von 0,01 mg/ml *n*-Bromdecan in Hexan ausgeschüttelt und der Überstand mit GC-MS analysiert.

9.4 Isolierung der Butyryl-Transferase aus dem Sekret von *C. lapponica*

80 μl Sekret von *C. lapponica* wird gesammelt, mit Puffer (20 mM Bis-Tris, pH=6,4; 50 mM NaCl) auf 500 μl verdünnt und eine Trennung nach Bestandteilen >5 kDa und niedermolekularen Bestandteilen durch Ultrazentrifugation mittels Vivaspin (0,5; MWCO 5 kDa; Vivascience) bei 10 000 g vorgenommen.¹ Die Bestandteile mit einem Molekulargewicht <5 kDa werden bei -20°C aufbewahrt, um als Substrate in den Aktivitätstests Verwendung zu finden. Eine Bradford-Proteinbestimmung (Eichkurve: BSA 0-5 mg/ml) wird mit der höhermolekularen Fraktion durchgeführt und diese dann einer Größenausschlußchromatographie (Flußrate: 40 $\mu\text{l}/\text{min}$; UV: 280 nm; Fraktionsgröße: 40 μl ; Puffer: 20 mM Bis-Tris (pH=6,4), 50 mM NaCl) unterzogen. Die Eichung der Größenausschlußsäule erfolgte mit den Eichproteinen BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa). Dies ermöglichte Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Proben. Auf die Sammlung und Vereinigung von Fraktionen gleichen Molekulargewichts folgten Tests auf Funktionalität der einzelnen Fraktionen, ähnlich den Tests mit Rohsekret (Abschn. 9.3.1).

1-10 μl der isolierten Enzymfraktionen werden mit 1 μl des Ultrafiltrates <5 kDa und 10 μl ges. 1-Heptanollösung in Wasser und 10 μl Puffer (50 mM Tris, pH=6,5) versetzt, nach 24 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur und Ausschütteln mit 20 μl einer Lösung von 0,01 mg/ml *n*-Bromdecan in Hexan, wird der Überstand mittels GC-MS untersucht.

9.5 ESI-MS Spektroskopie

Wie in Abschnitt 9.4 beschrieben, geschieht die Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile mit Ultrazentrifugation. Zur Trennung der Proteine wird die Fraktion >5 kDa auf ein Gel (12 % SDS PAGE, Laemmli Gel, Mini Gel Hoefer Apparatur (Amersham), Gel in 10 % Essigsäure zehn Minuten gewaschen) aufgetragen. Zusätzlich zu Sekret von *C. lapponica* erfolgt noch die Aufbringung von Sekret von *C. populi* auf das Gel zum Vergleich von Proteinen. Einzelne Banden werden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels ESI-MS-Spektroskopie untersucht². Hierzu werden die Proteine einer In-Gel Verdauung unterzogen und mit ZipTipTM-Säulen (C-18 RP, Millipore, USA) entsalzt und aufkonzentriert. Die dabei entstandenen Fragmente kleinerer Aminosäuresequenzen werden dann in Datenbanken eingegeben, um übereinstimmende Sequenzen zu anderen bekannten Enzymen zu finden.

¹Diese Arbeiten sind von Rita Büchler getätigt worden.

²Die MALDI-Untersuchungen sind von Axel Mithöfer in München durchgeführt worden.

9.6 Statistik

Die Bearbeitung und statistische Auswertung der experimentellen Daten, gewonnen bei der Verfütterung von Thioglycosiden, erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 12. 0. 1, SPSS inc..

Alle Daten wurden für die statistische Auswertung logarithmisch transformiert, da diese Transformation dazu führt, daß große gemessene Werte mit großen Standardabweichungen und kleine gemessene Werte mit kleinen Standardabweichungen miteinander vergleichbar werden, also die Varianzen homogen werden. Da Messungen nahe der Detektionsgrenze dazu führen, daß die letztendlich gemessenen Werte erheblich schwanken können, was physikalisch keinen Unterschied macht³, statistisch jedoch dazu führt, daß untransformierte Daten in den Varianzen nicht homogen werden, ist zu den Werten noch ein konstanter Wert addiert worden, der in etwa der Detektionsgrenze entspricht. Die Untersuchung erfolgte also mit transformierten Daten (t), die sich aus folgender Gleichung ergeben haben, wobei w die Werte der Daten vor der Transformation sind:

$$t = \ln(w + 1) \quad (\text{Gl. 9.1})$$

Zur Untersuchung der Homogenität der Fehlervarianzen wurde ein Levene [198] Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug $> 5 \%$ zur Akzeptanz der Nullhypothese, daß alle Varianzen unter allen Gruppen gleich sind.

Sich anschließende Untersuchungen der Daten mittels ANOVA oder T-Test sollte aufzeigen, ob die Datengruppen signifikante Unterschiede beinhalten, wobei bei der ANOVA ein S-N-K Post Hoc Test durchgeführt und eine Typ I Quadratsummen Methode als Parameter festgelegt worden ist, die nicht balancierte Stichproben berücksichtigt. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von 5% angenommen. Abweichende Parameter sind bei den jeweiligen Auswertungen im Text angegeben. Die sich jeweils ergebenden F- und t-Werte sind zusammen mit den Stichprobenzahlen (N) und Freiheitsgraden (df) im Ergebnisteil 5.1 (S. 17 ff.) soweit nötig angegeben.

Sollte auch mit mehrfachen Transformationen eine ANOVA nicht möglich gewesen sein, so ist dies bei den entsprechenden Graphiken und dem dazugehörigen Text ebenfalls mit angegeben.

³Konkret ist es unerheblich, ob beispielsweise ein Transport von 0,01 oder 0,00001 bei Verbindung x , im Vergleich zu 1000 bei Verbindung y , gemessen worden ist

A Abkürzungen

Alle physikalischen Basisgrößen und abgeleitete Größen werden mit den international festgelegten Formelzeichen und den zugehörigen Einheiten des internationalen Systems (SI) abgekürzt¹. Ebenso werden Vorsätze für Vielfache und Naturkonstanten mit internationalen Zeichen abgekürzt.

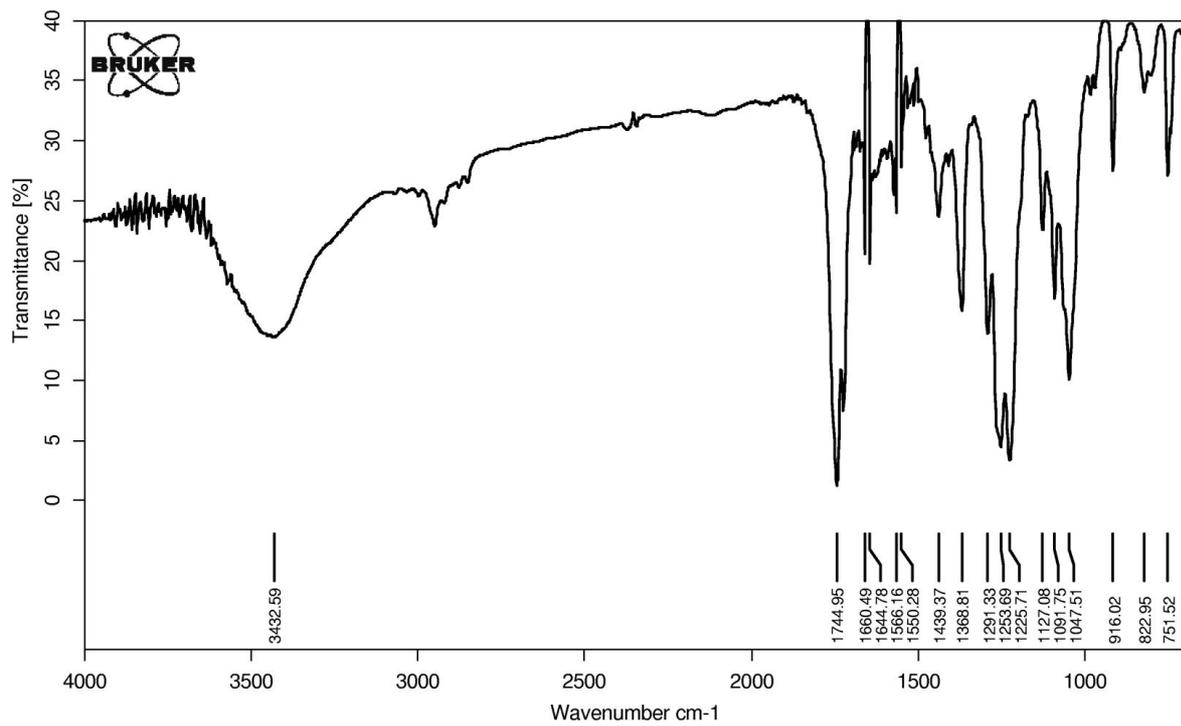
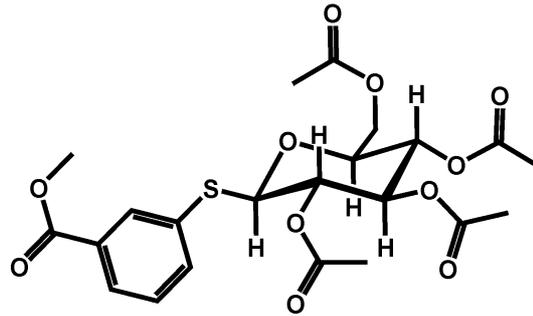
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
abs.	absolut
AcCN	Acetonitril
ADDP	1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin
ANOVA	Analysis of variances
APCI	Atmosphaeric Pressure Chemical Ionisation
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatography
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
df	statistische Freiheitsgrade
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
EE	Ethylacetat (Essigester)
Et ₂ O	Diethylether
FAD	Flavinadenindinucleotid
g	Fallbeschleunigung (9,81 m/s^2)
Gal	Galactose
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectroscopy
ges.	gesättigt
gesch.	geschützt
Glc	Glucose
h	Stunde
HR-MS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
IR	Infrarot

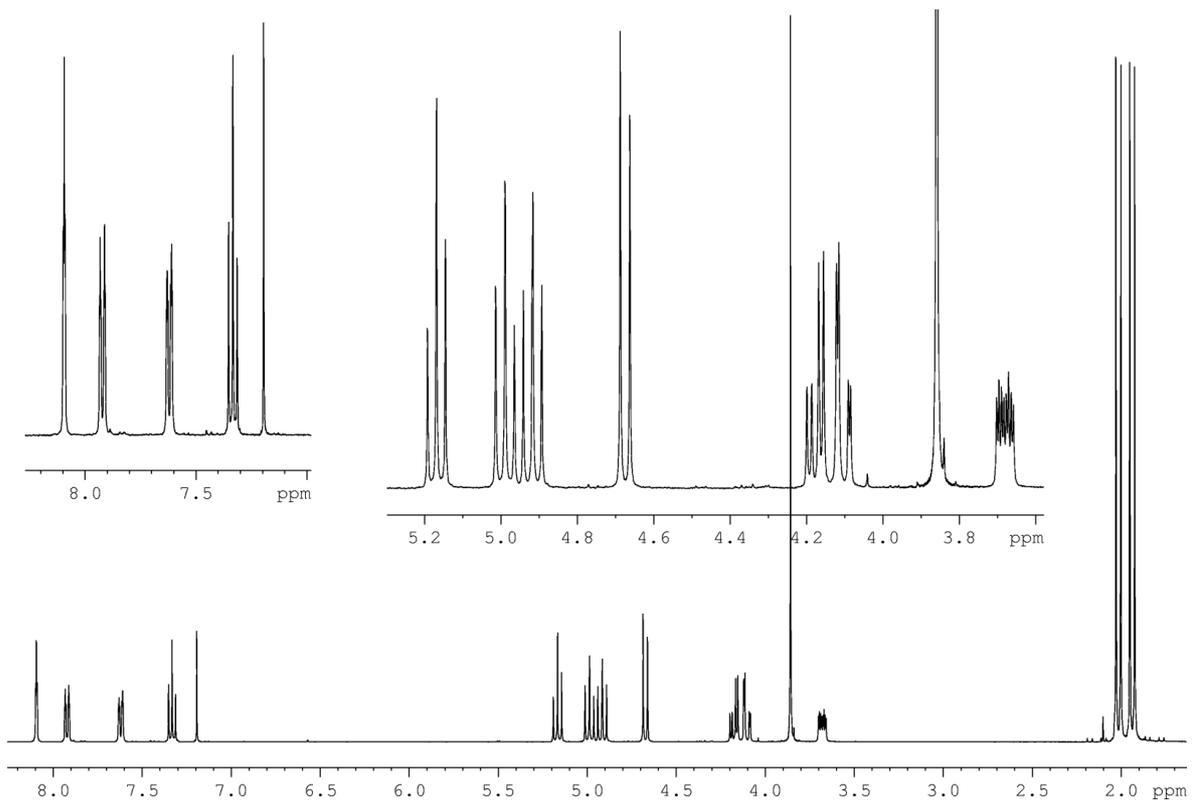
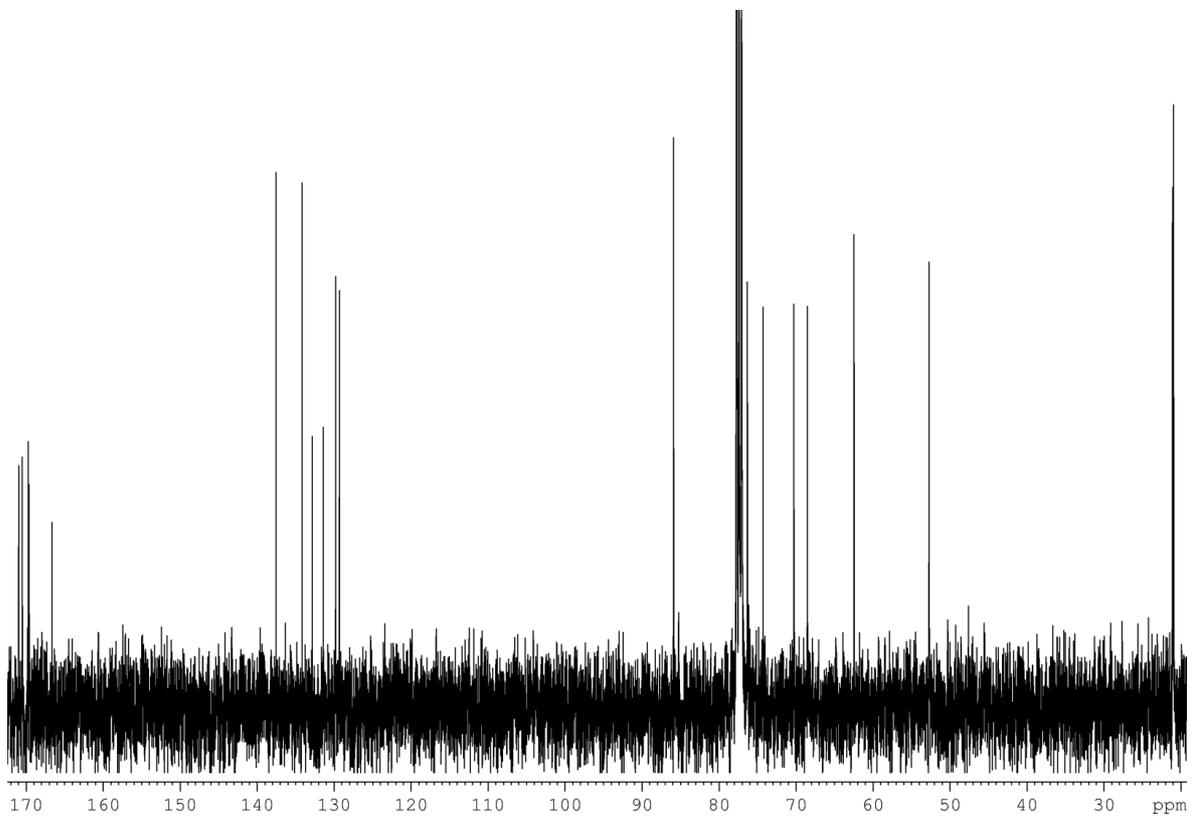
¹Die einzige hier relevante Ausnahme bildet die Angabe von Energien bei der Massenspektroskopie, bei denen das CGS-System Verwendung findet.

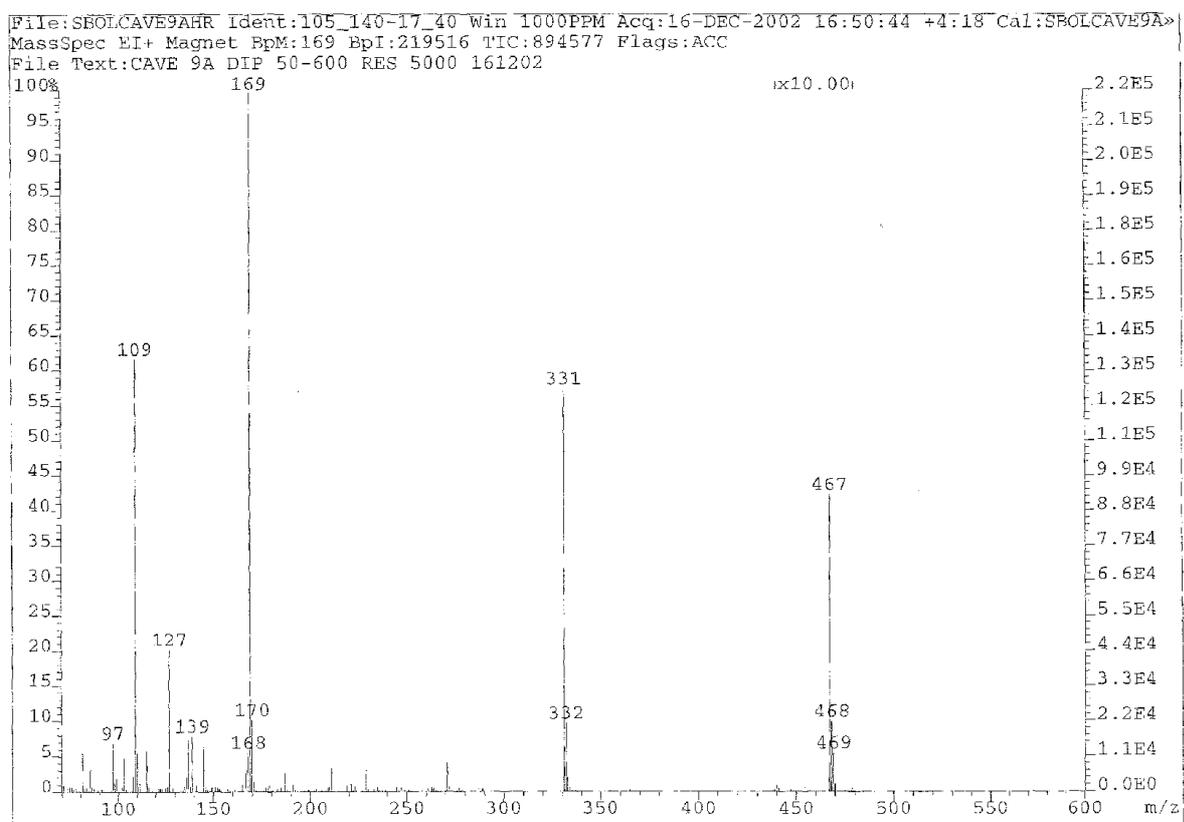
GC-C-IRMS	Gas Chromatography - Combustion - Isotope Ratio MS
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectroscopy
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
Lsg.	Lösung
LM	Lösungsmittel
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectroscopy
MeOH	Methanol
min.	Minuten
MS	Mass Spectroscopy
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
N	Anzahl
NaOMe	Natriummethanolat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PE	Petrolether
phen.	phenolisch
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SIM	Selected Ion Modus
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-N-K	Student-Newman-Keuls
Tab.	Tabelle
TIC	Totalionenstrom (Total Ion Count)
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

B Spektren

Spektren von 3-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 54

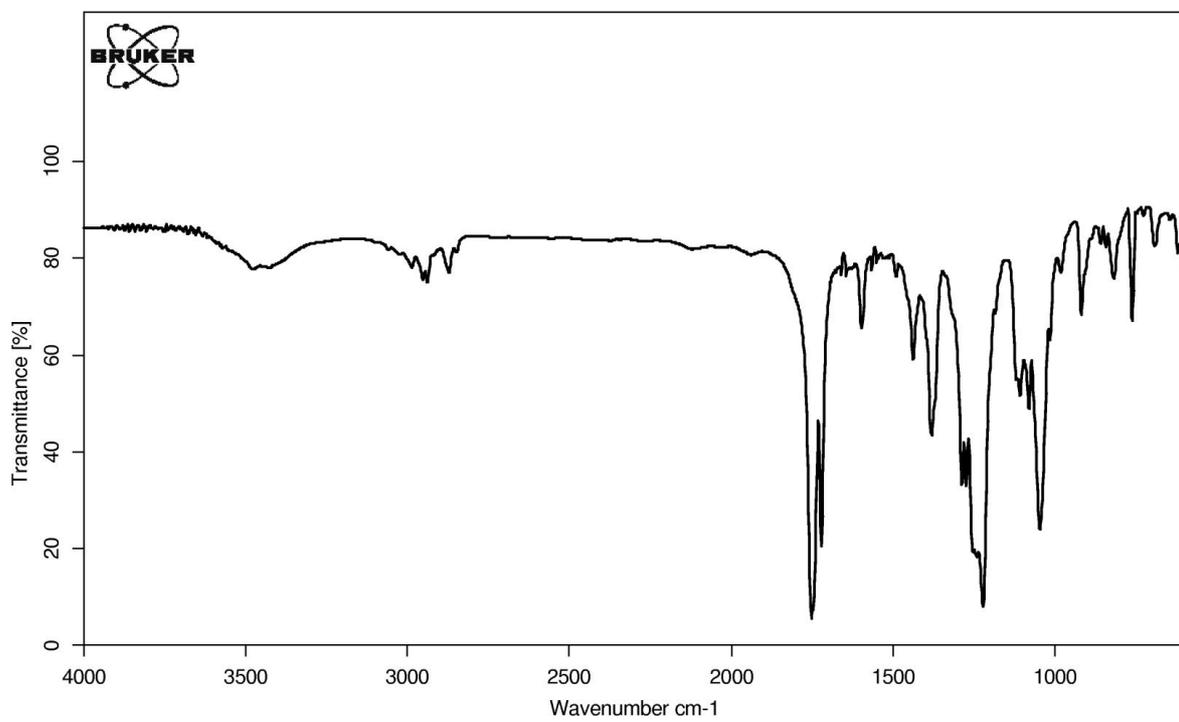
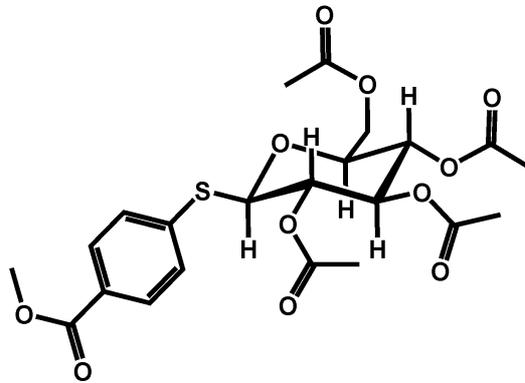


 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

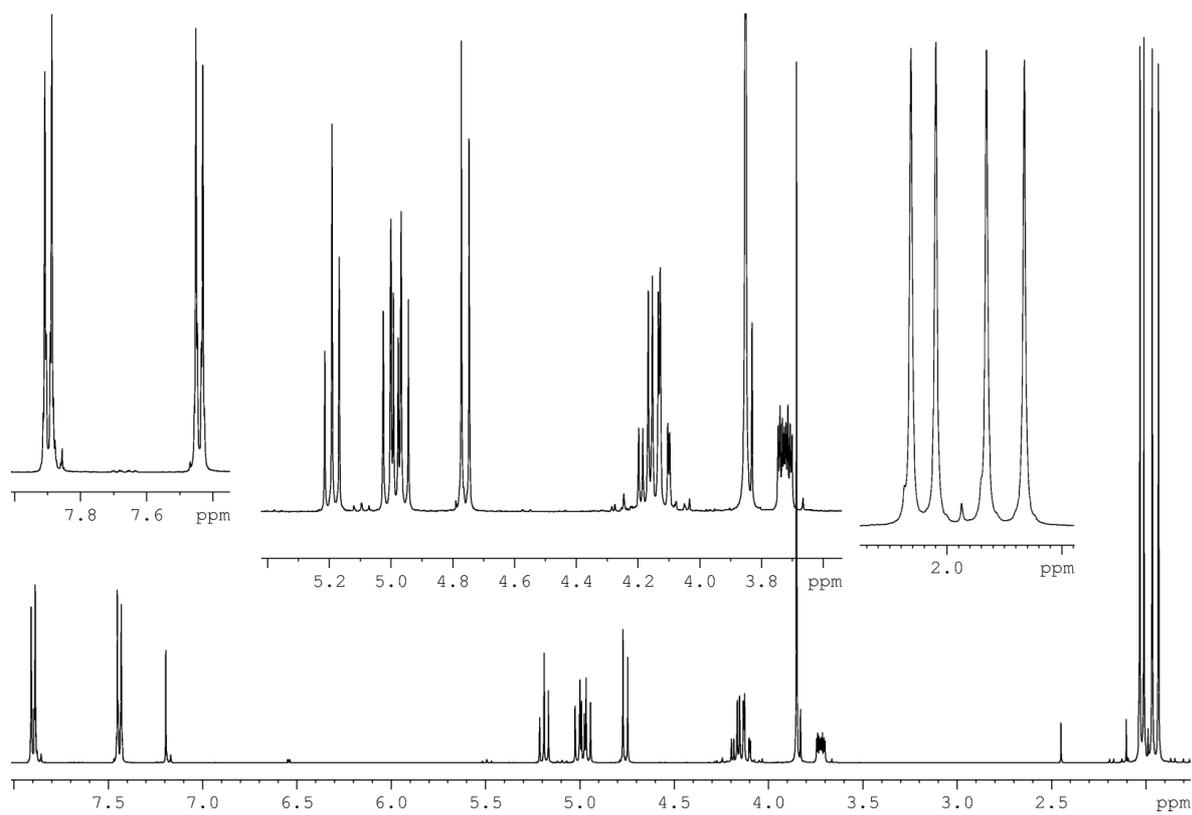
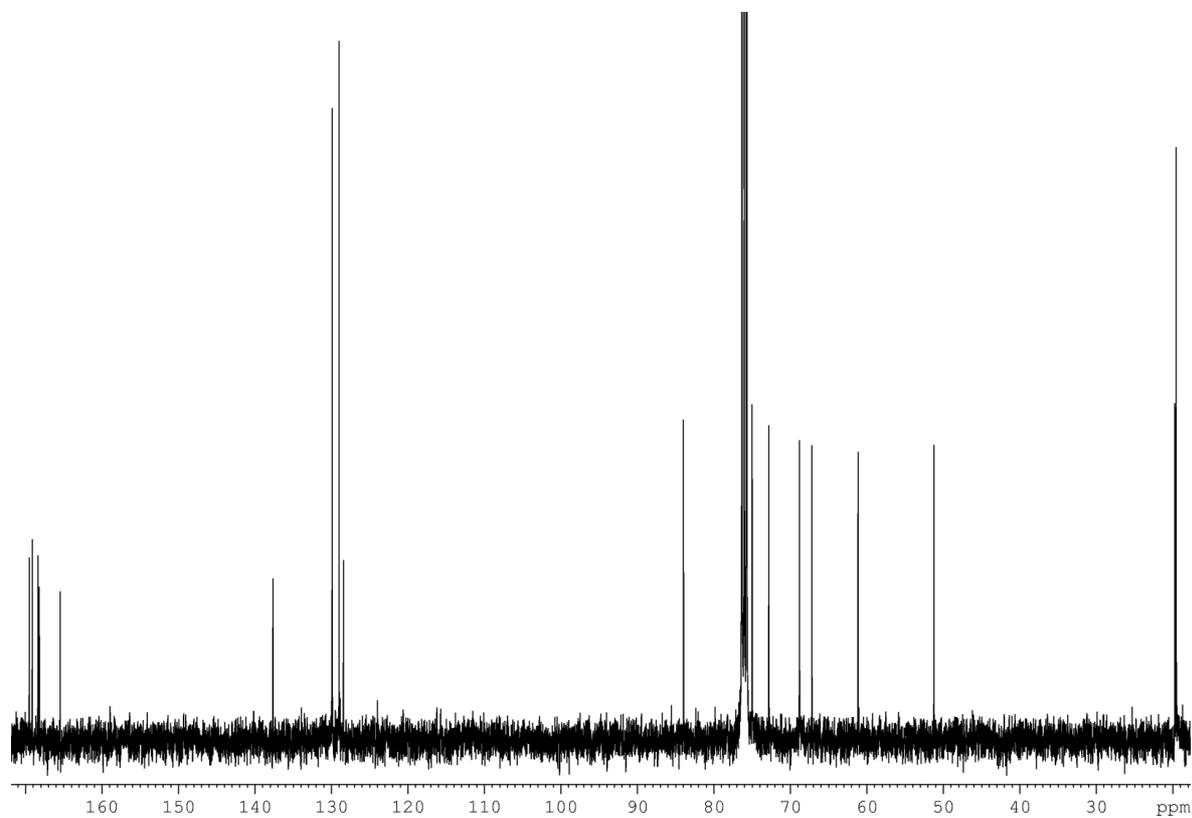


MS-Spektrum

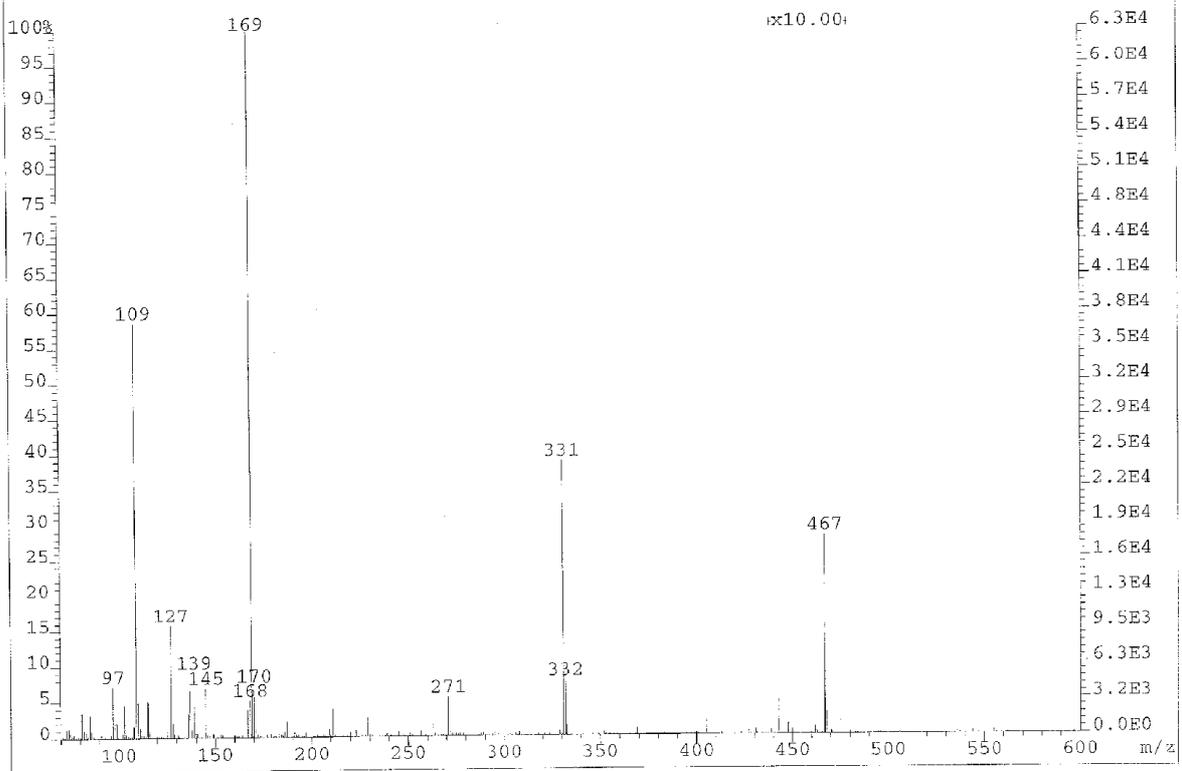
Spektren von 4-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 55



IR-Spektrum

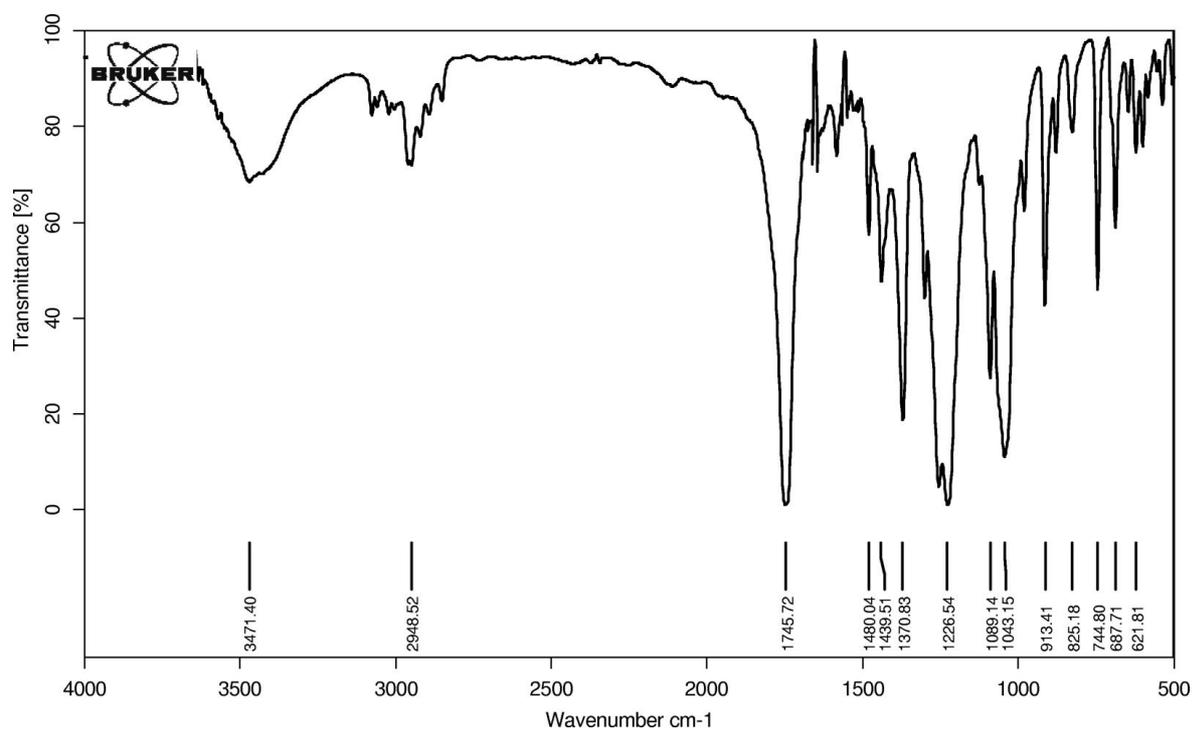
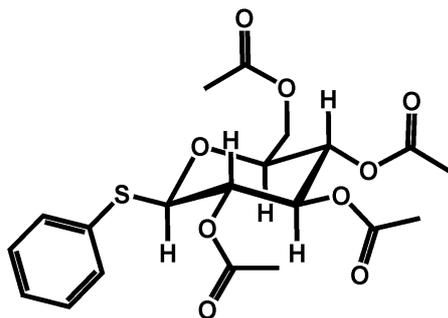
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

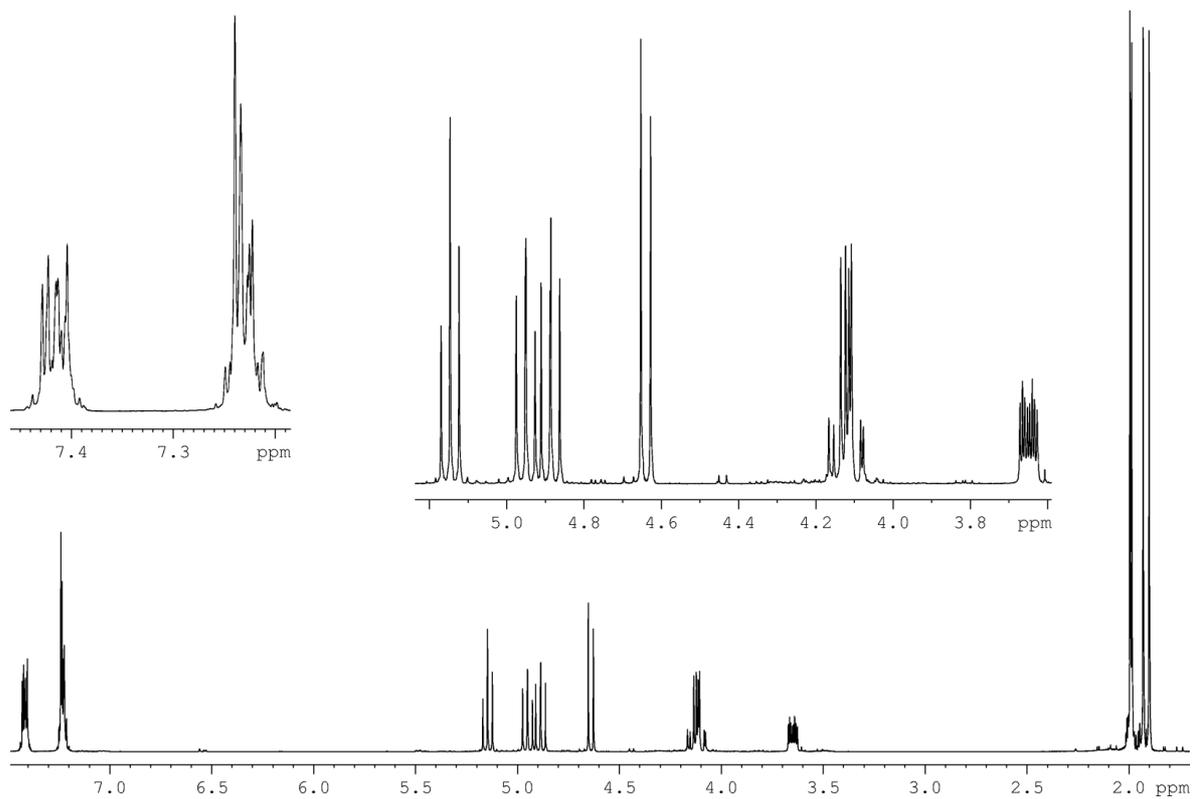
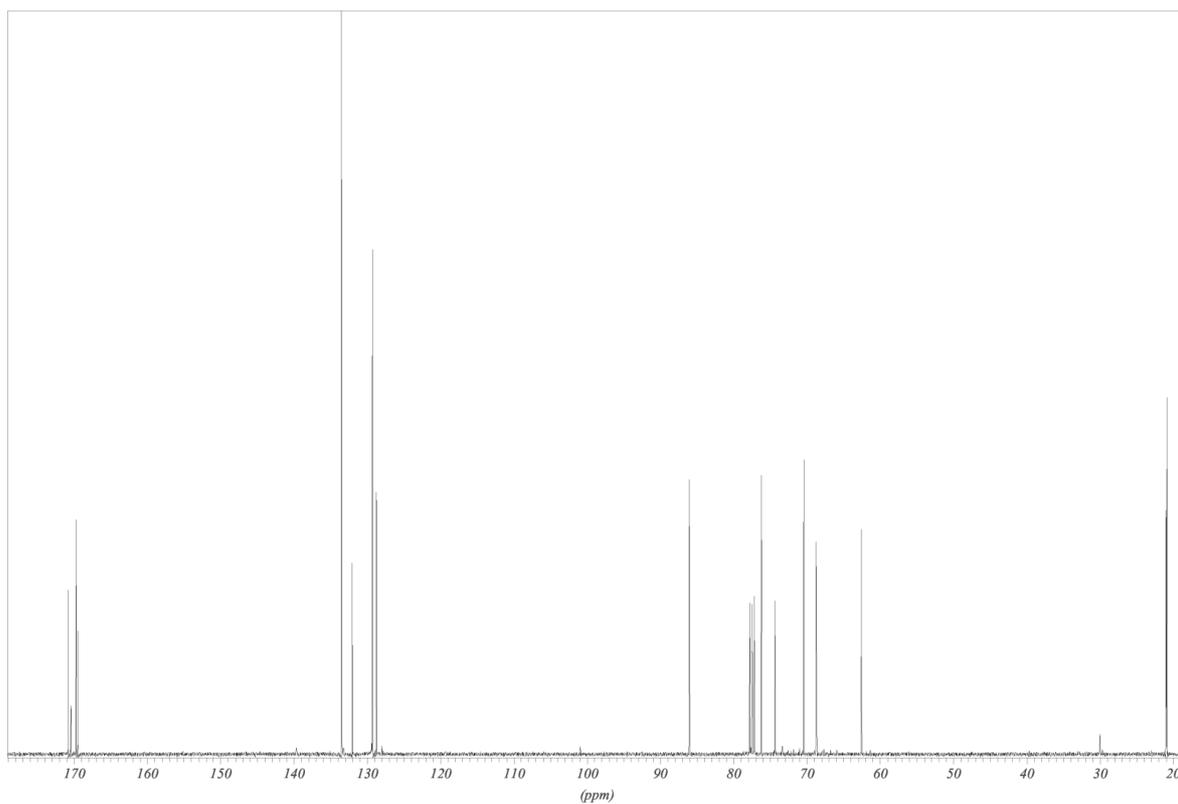
File:SBOLCAVE8AHR Ident:74_94-30_46 Win 1000PPM Acq:16-DEC-2002 16:04:05 +2:57 Cal:SBOLCAVE8AHR
MassSpec EI+ Magnet BpM:169 BpI:63337 TIC:247847 Flags:ACC

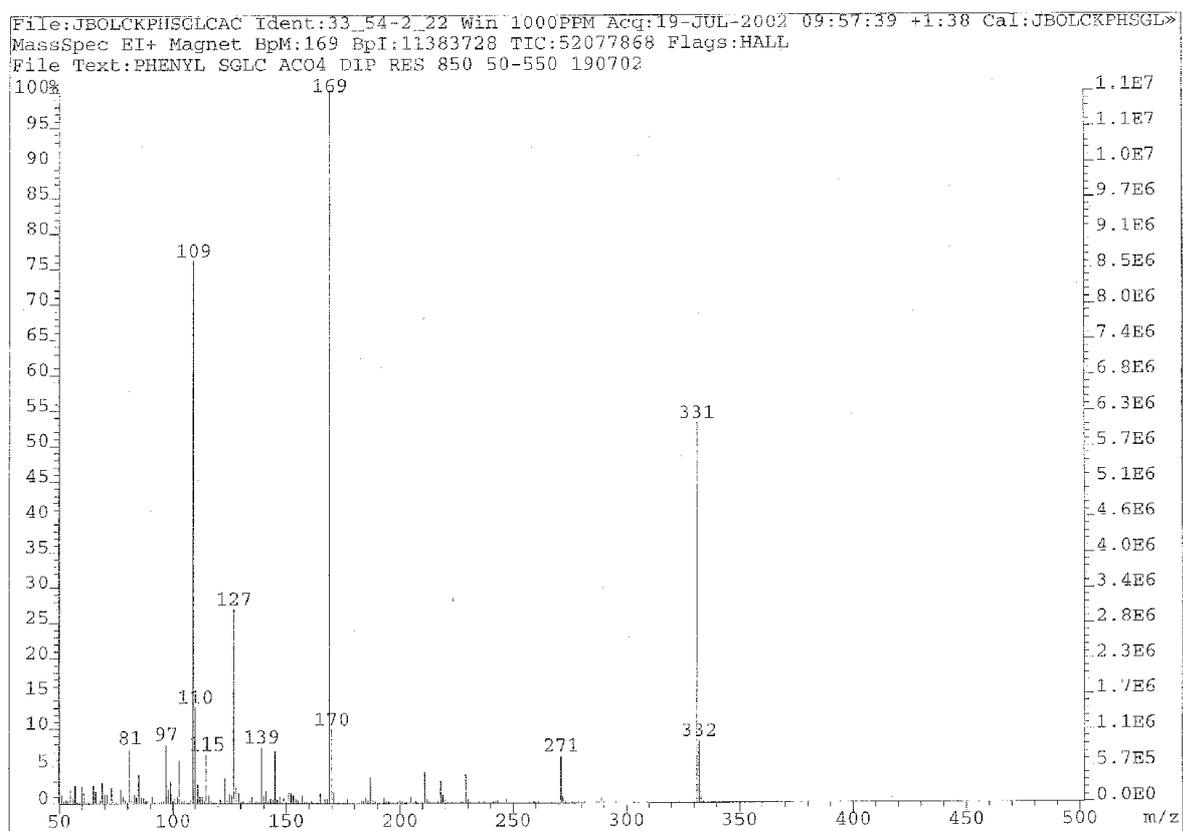


MS-Spektrum

Spektren von Phenyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucofuranosid 49

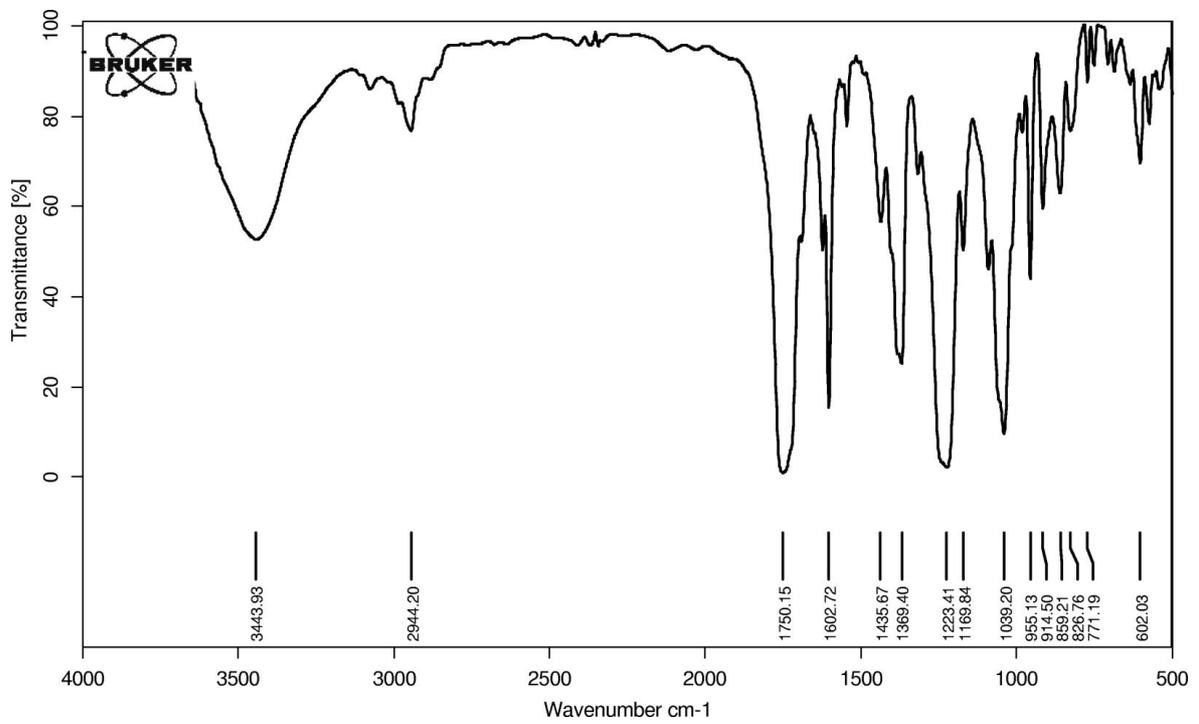
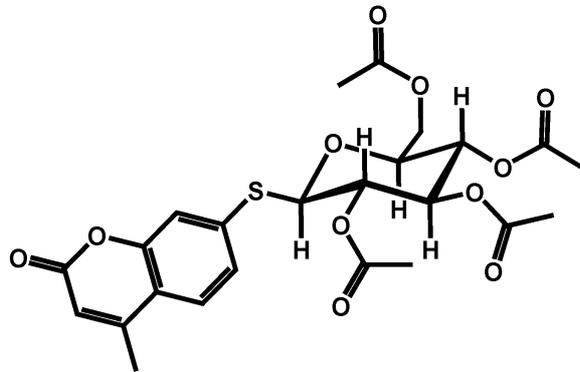


 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

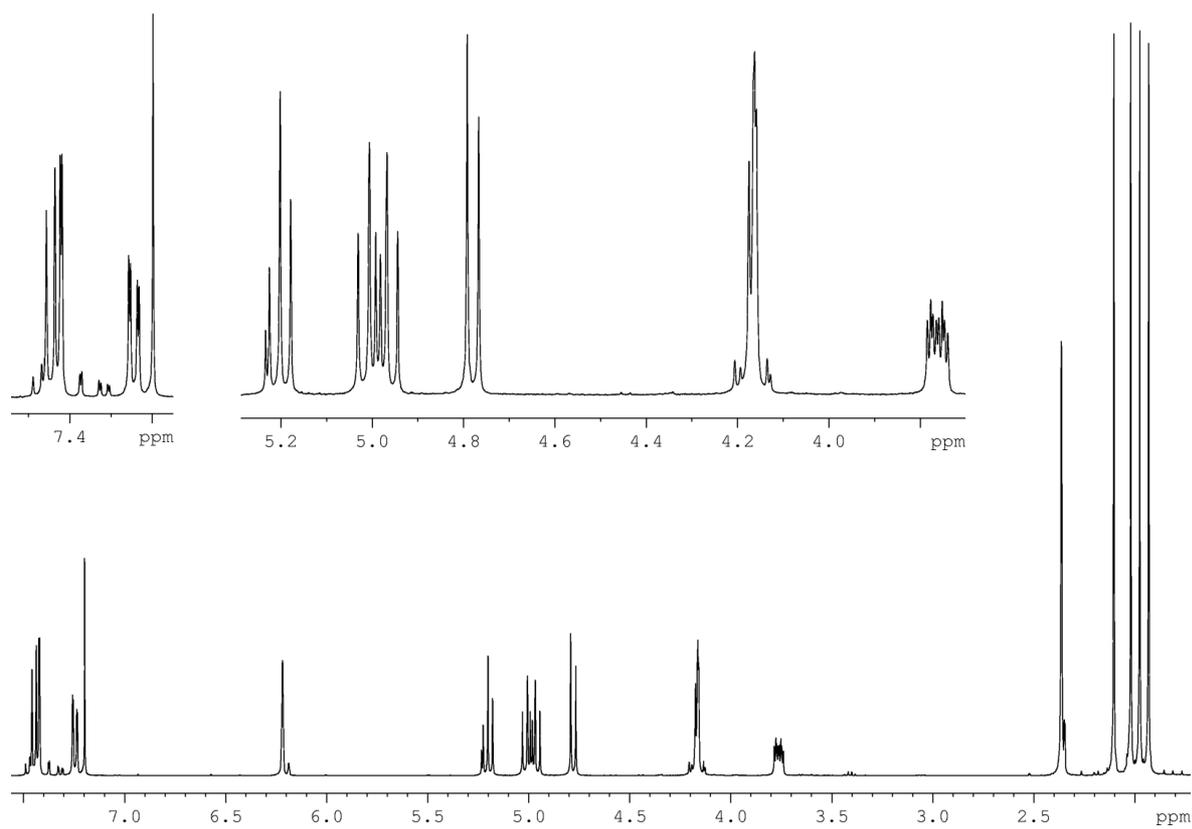
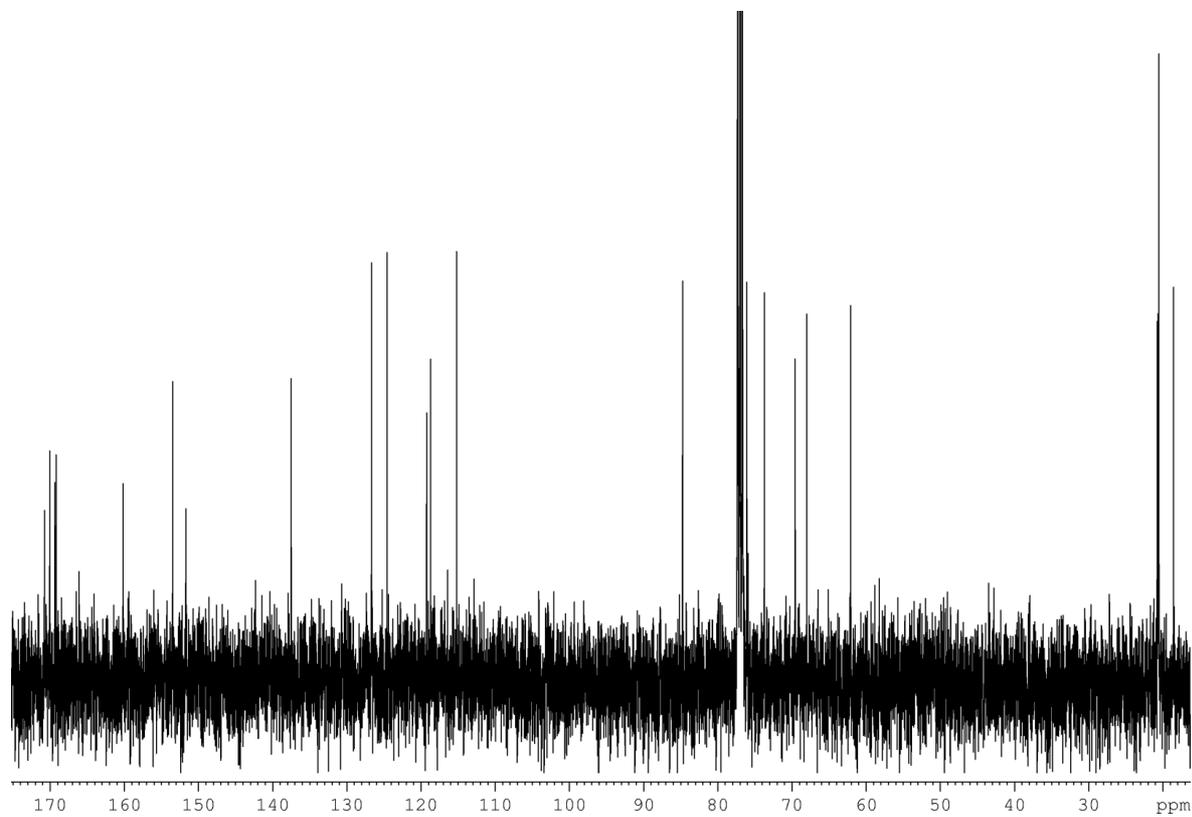


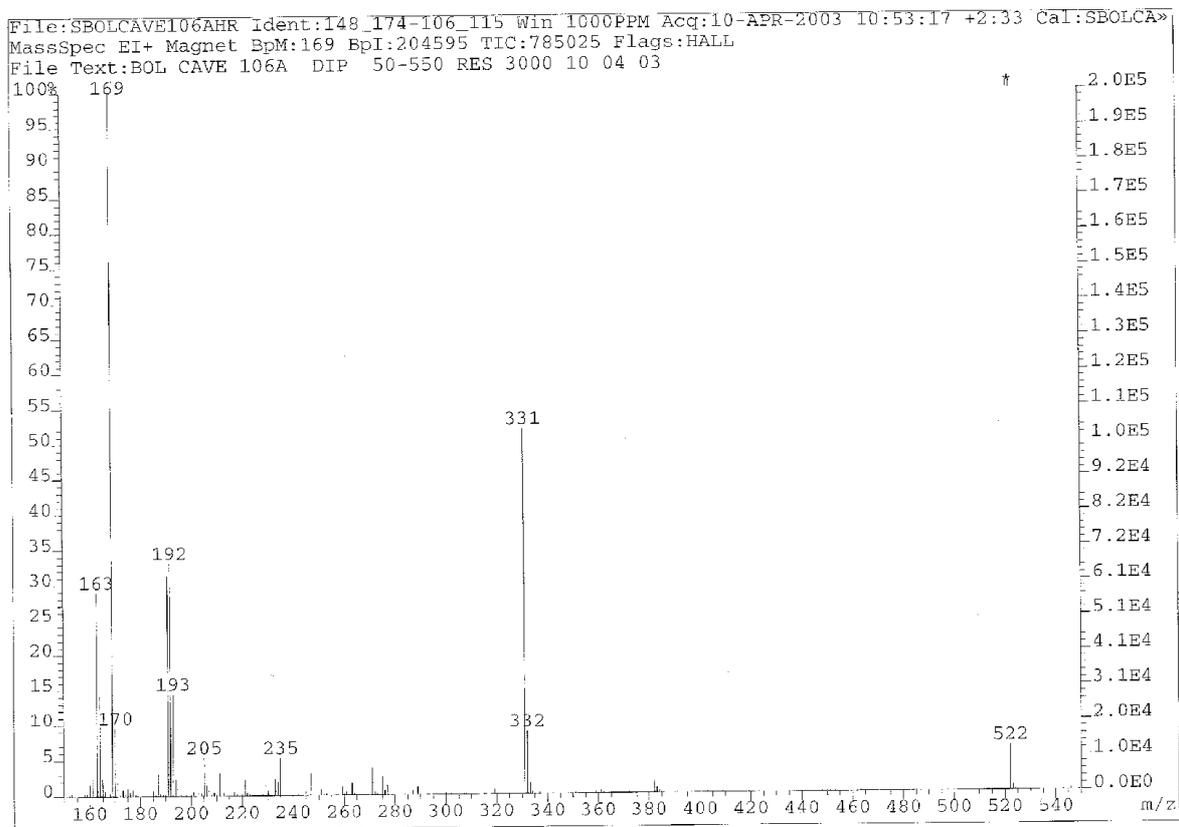
MS-Spektrum

Spektren von 4-Methyl-2-Oxo-2*H*-chromen-7-yl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 56



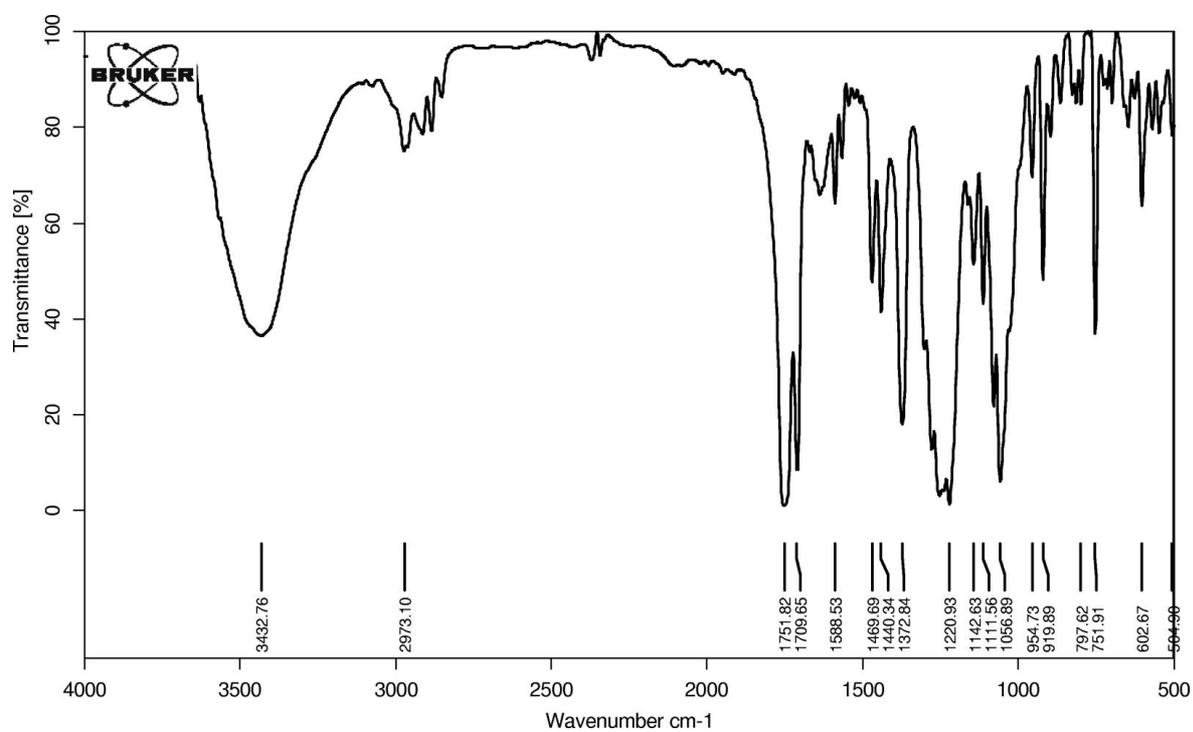
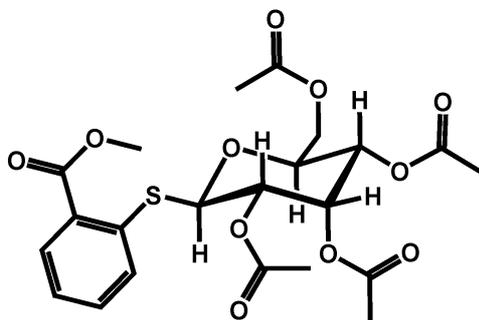
IR-Spektrum

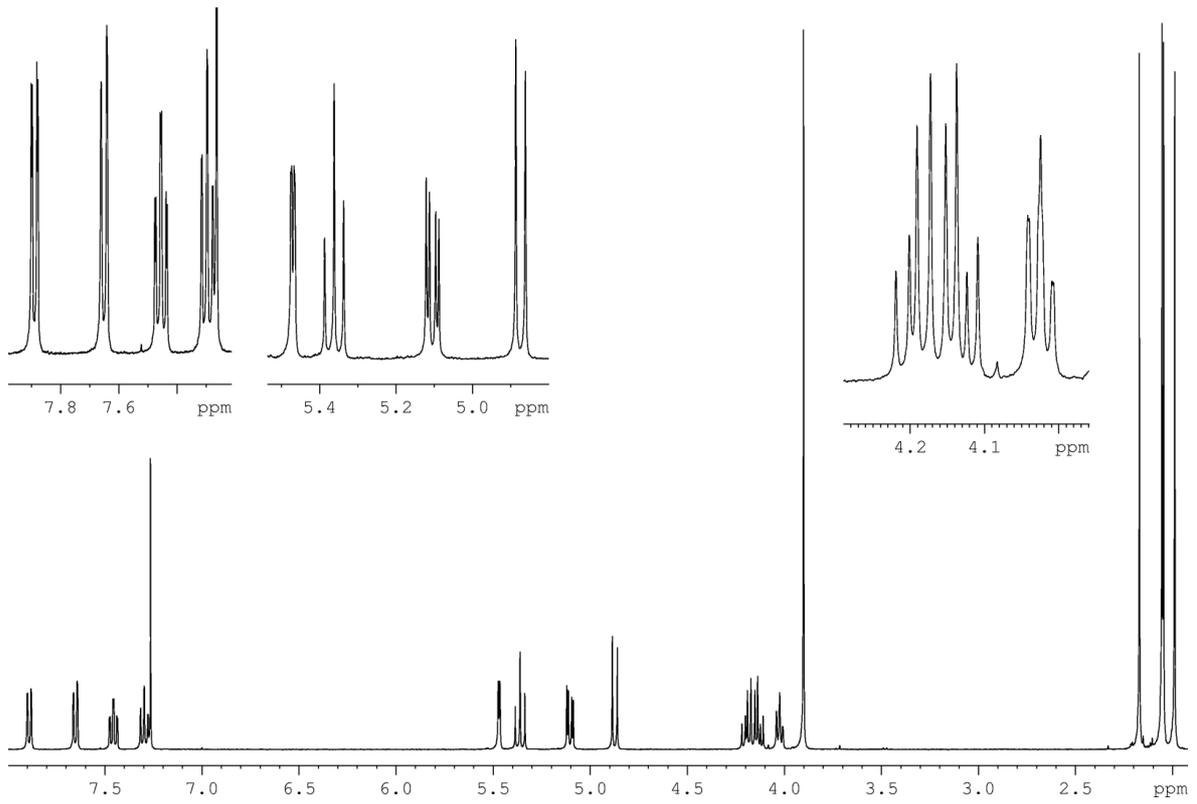
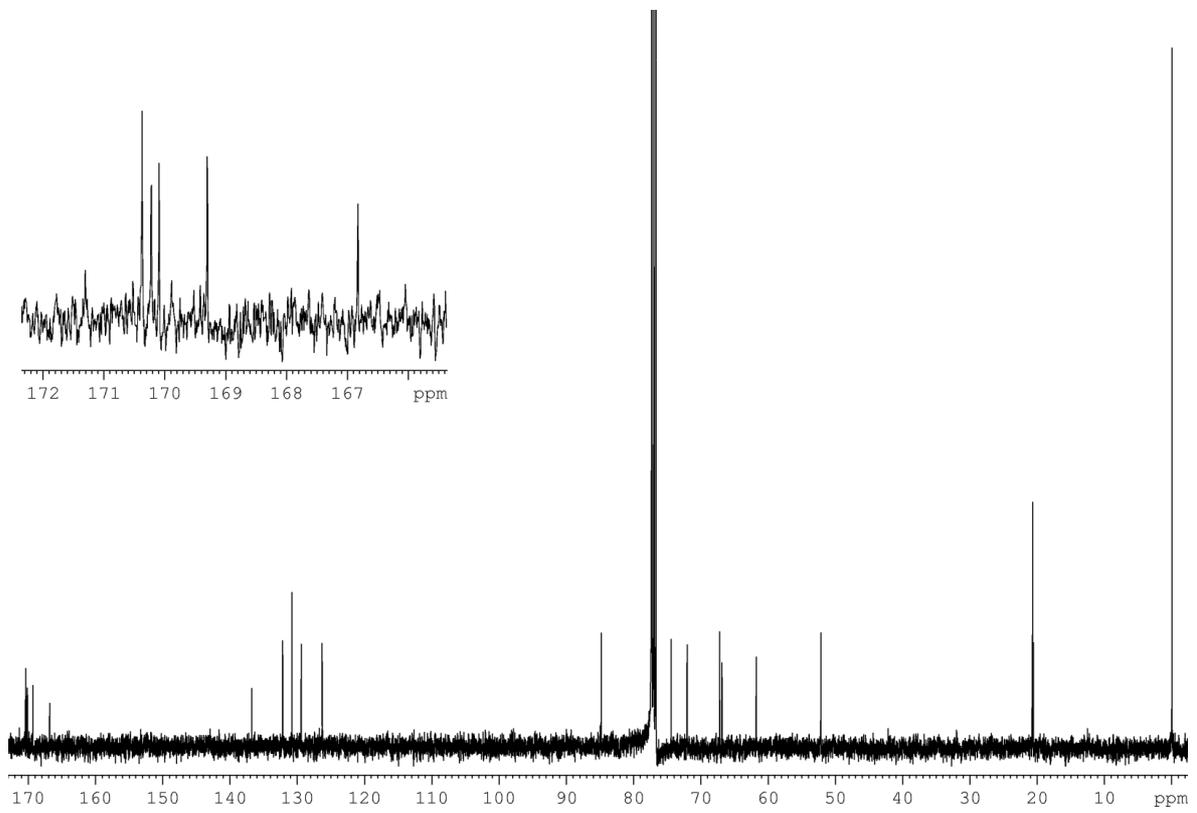
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

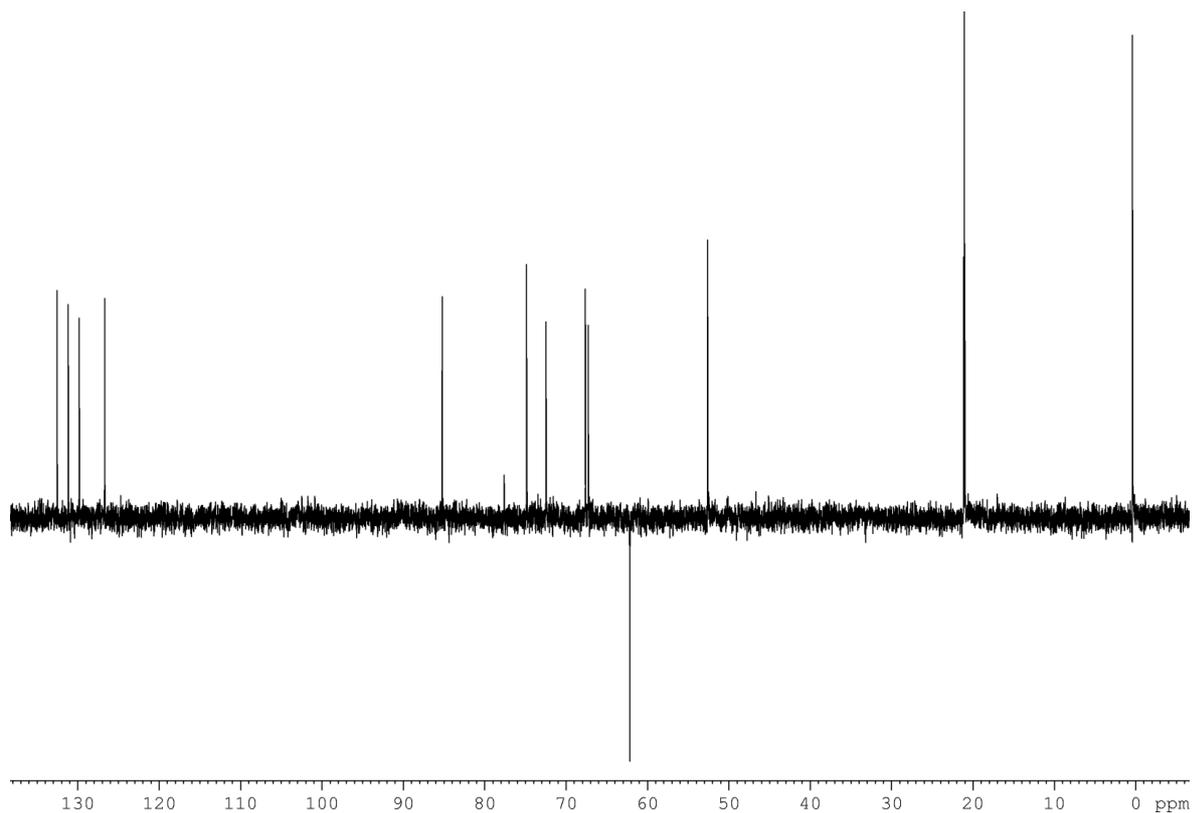


MS-Spektrum

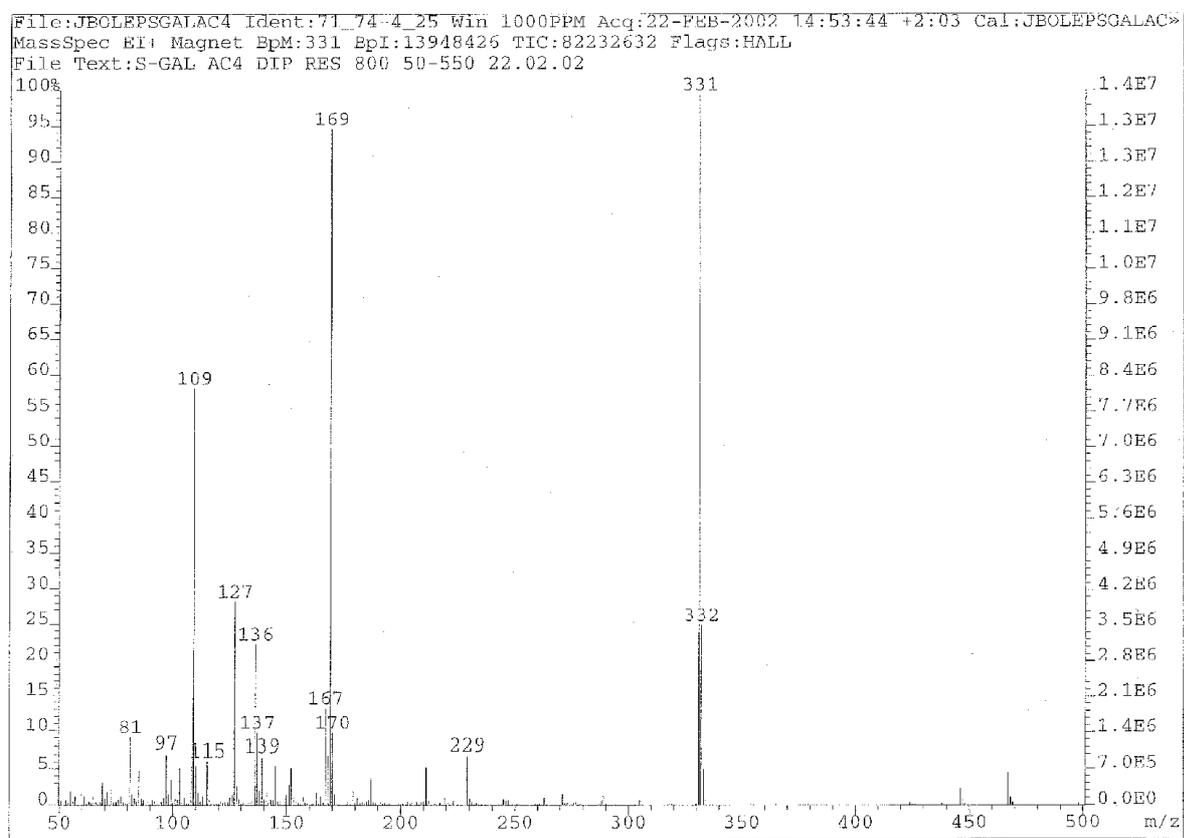
Spektren von 2-Methoxycarbonyl-phenyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-galactopyranosid 58



 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

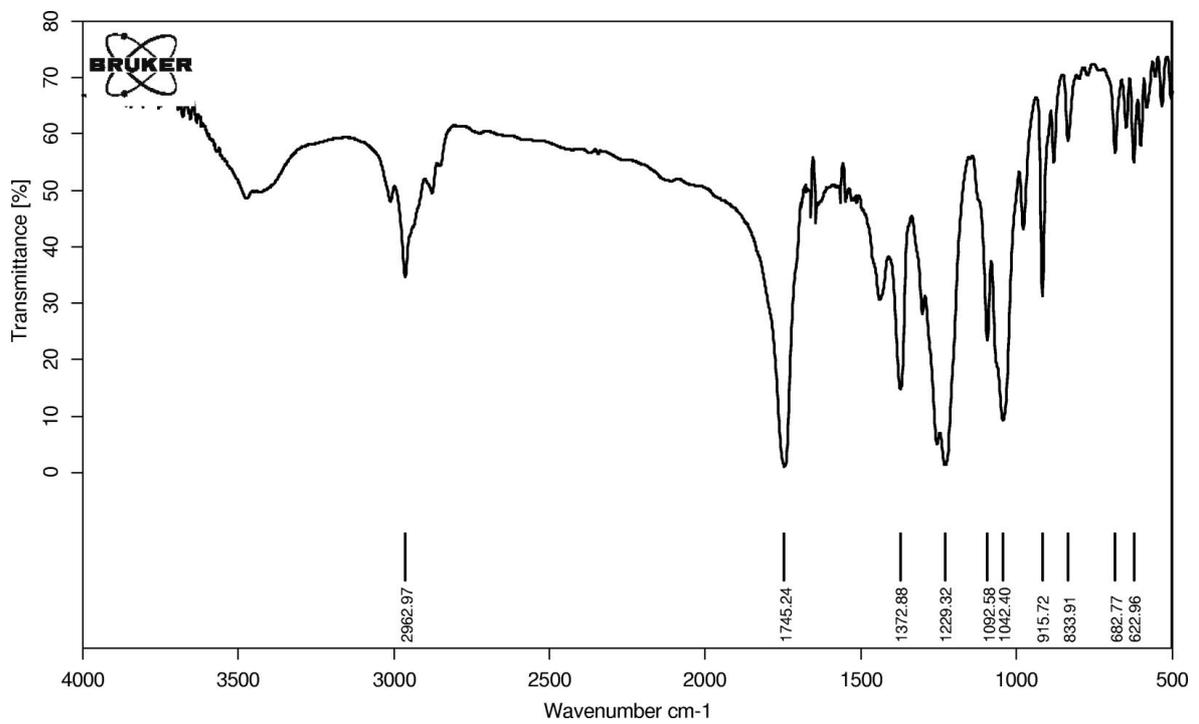
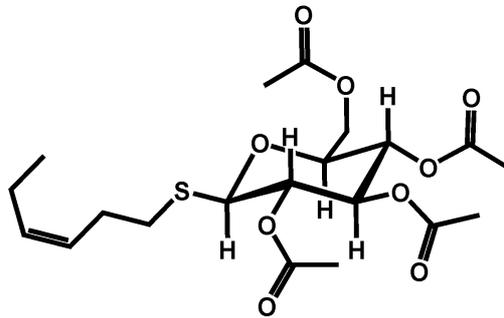


APT-NMR-Spektrum

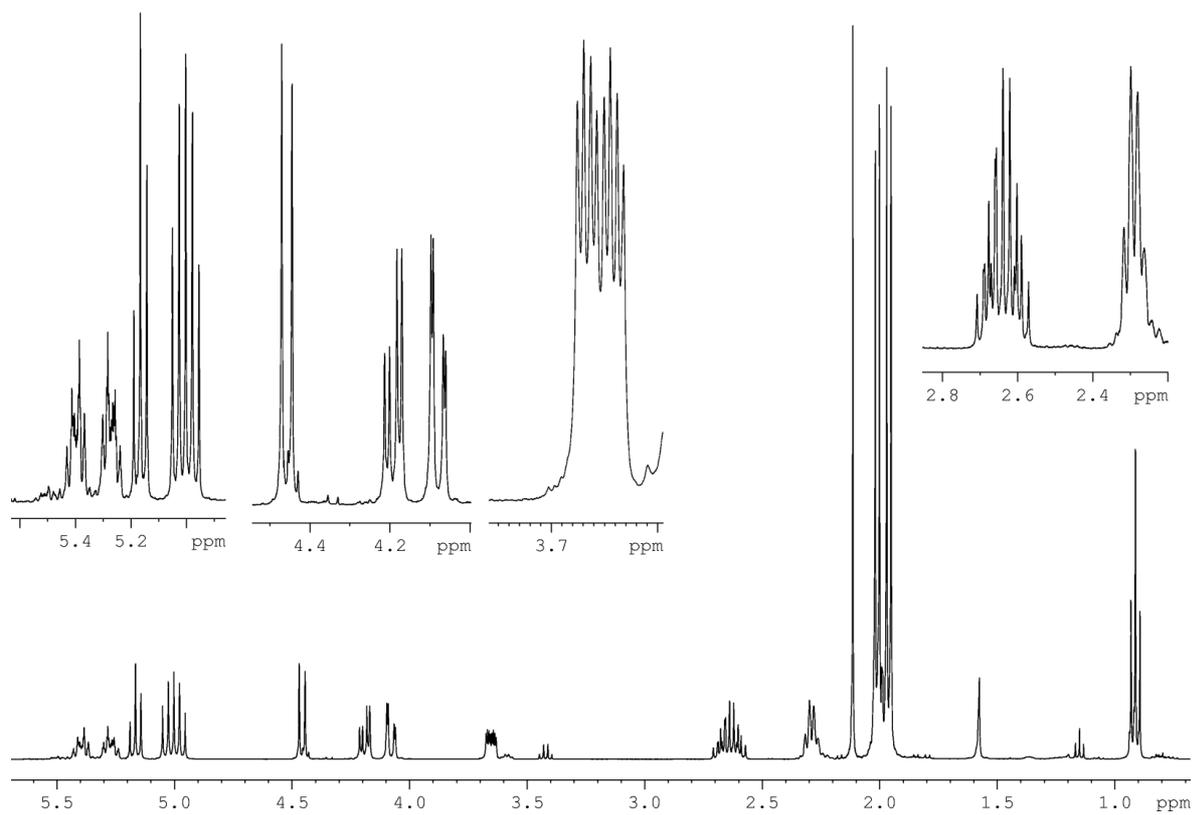
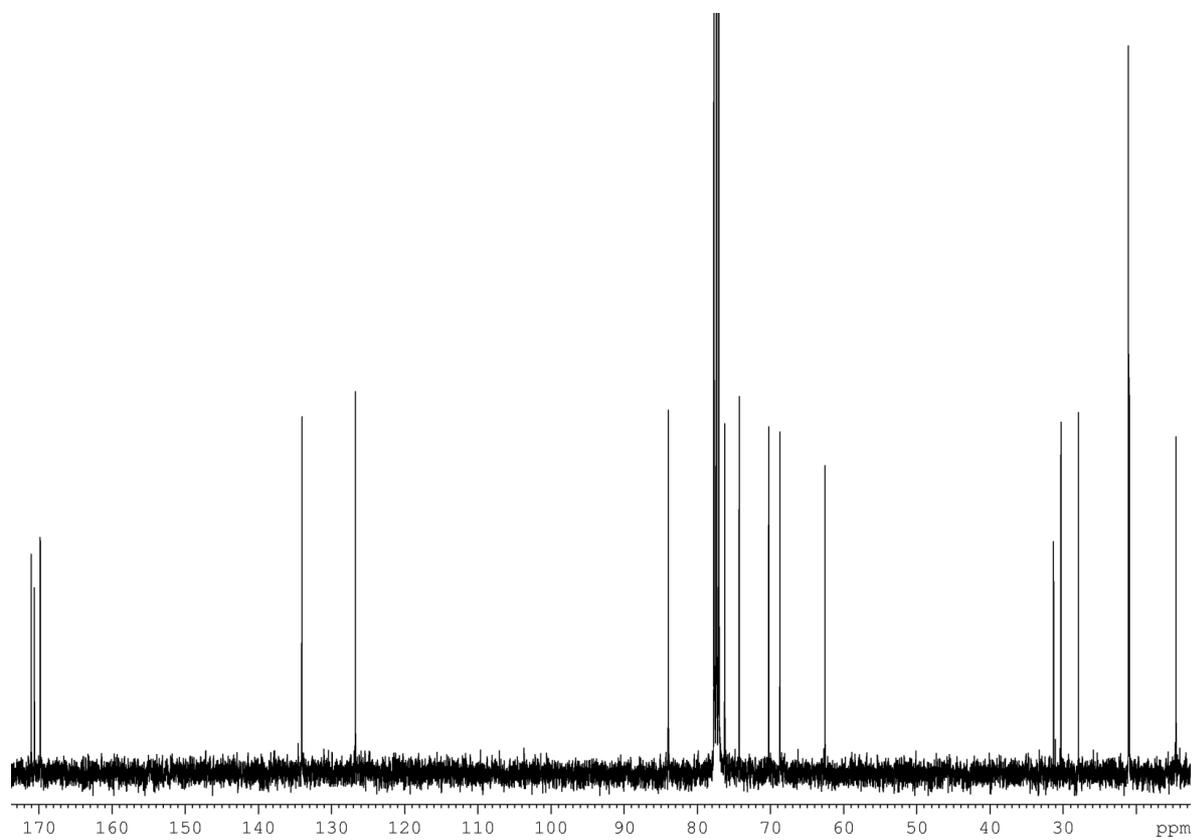


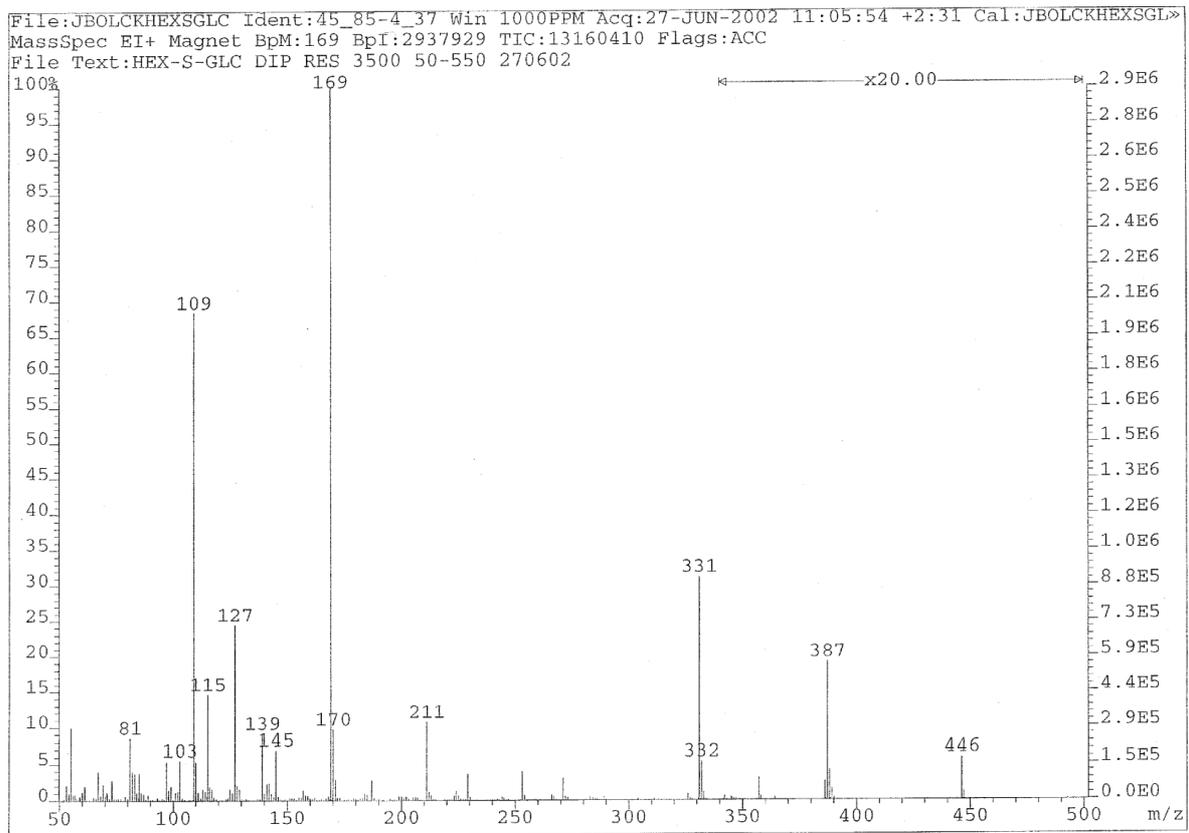
MS-Spektrum

Spektren von (3Z)-Hex-3-en-1-yl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 63



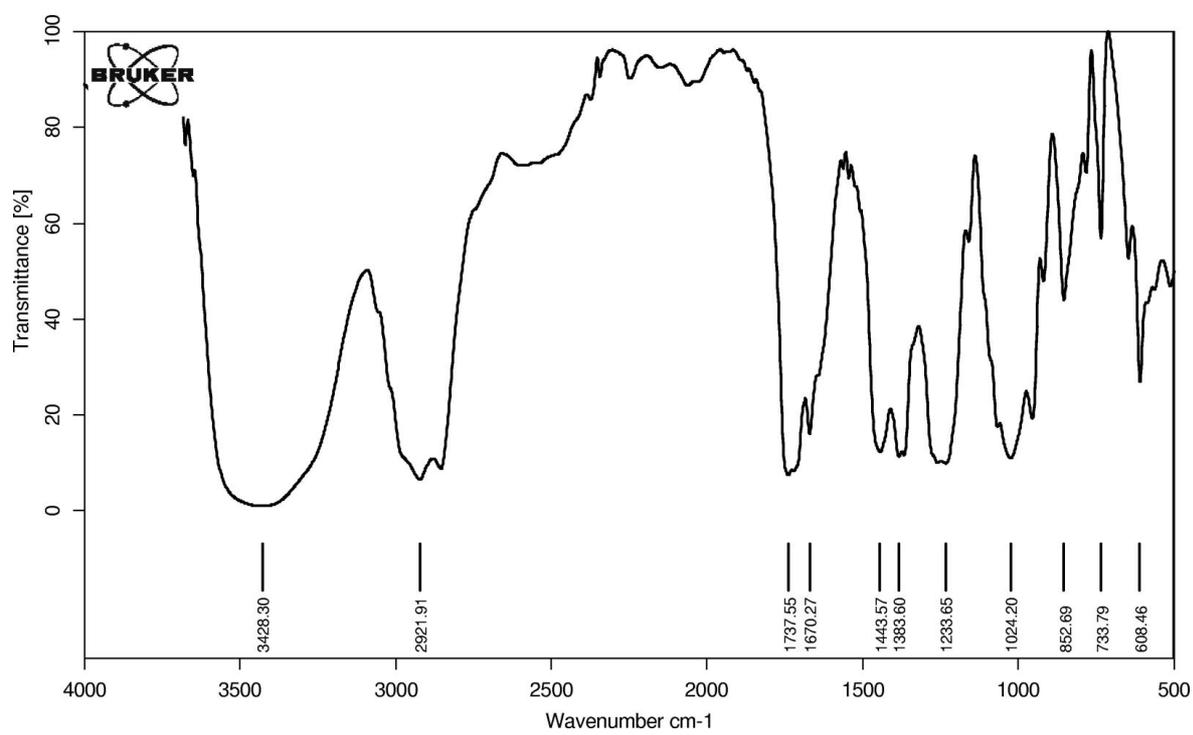
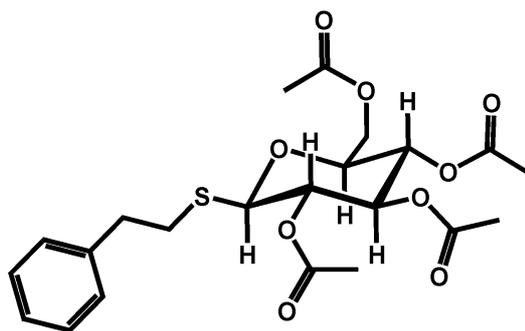
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

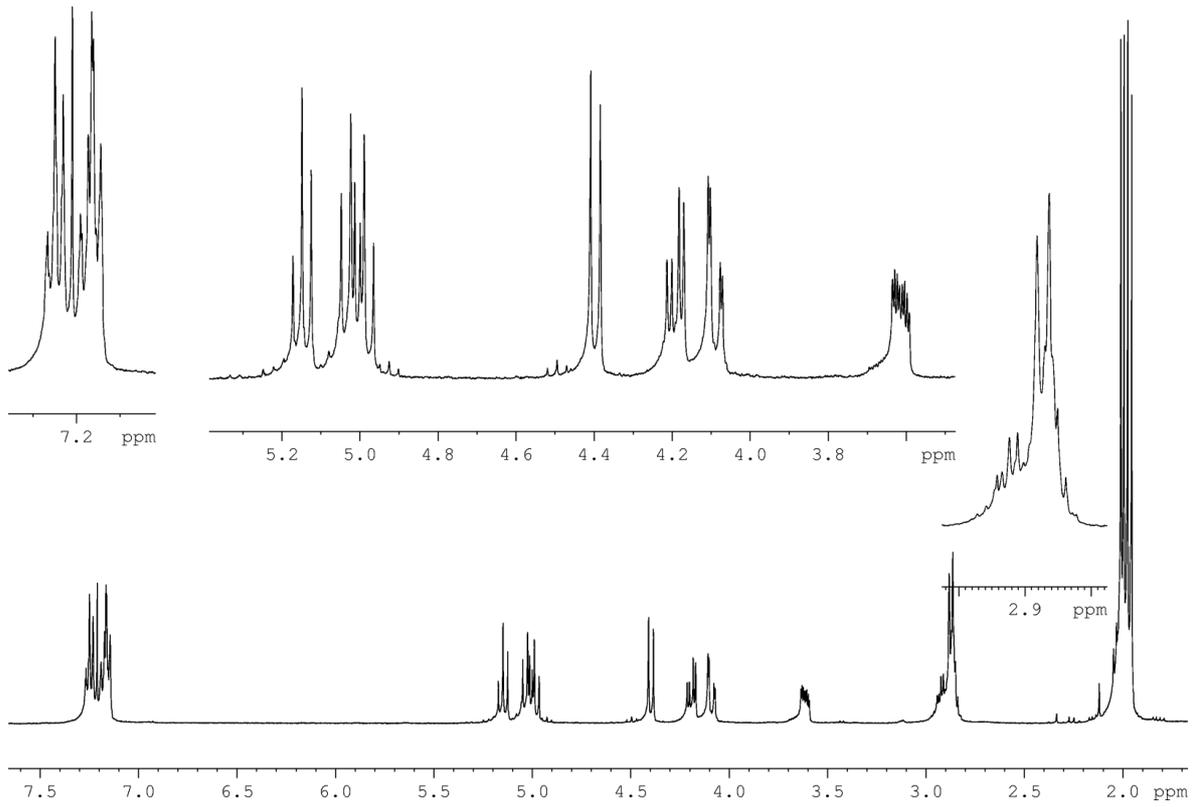
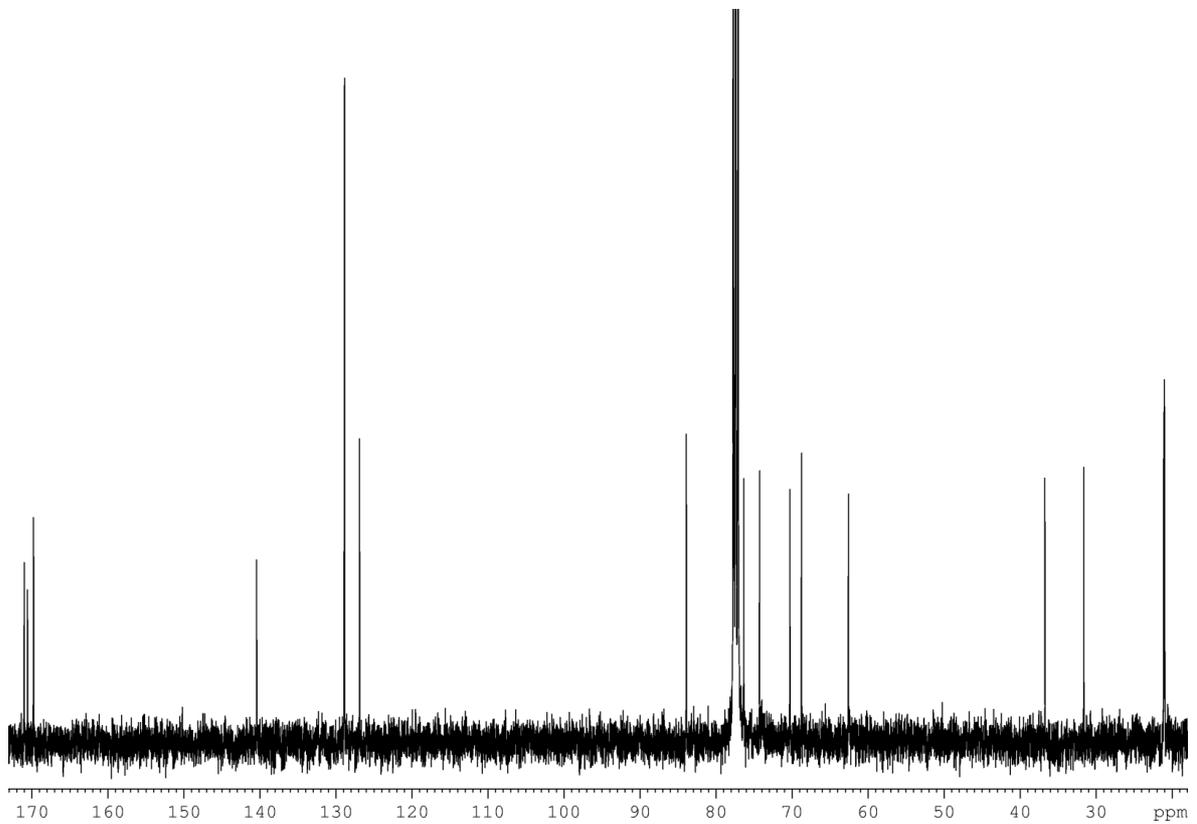


MS-Spektrum

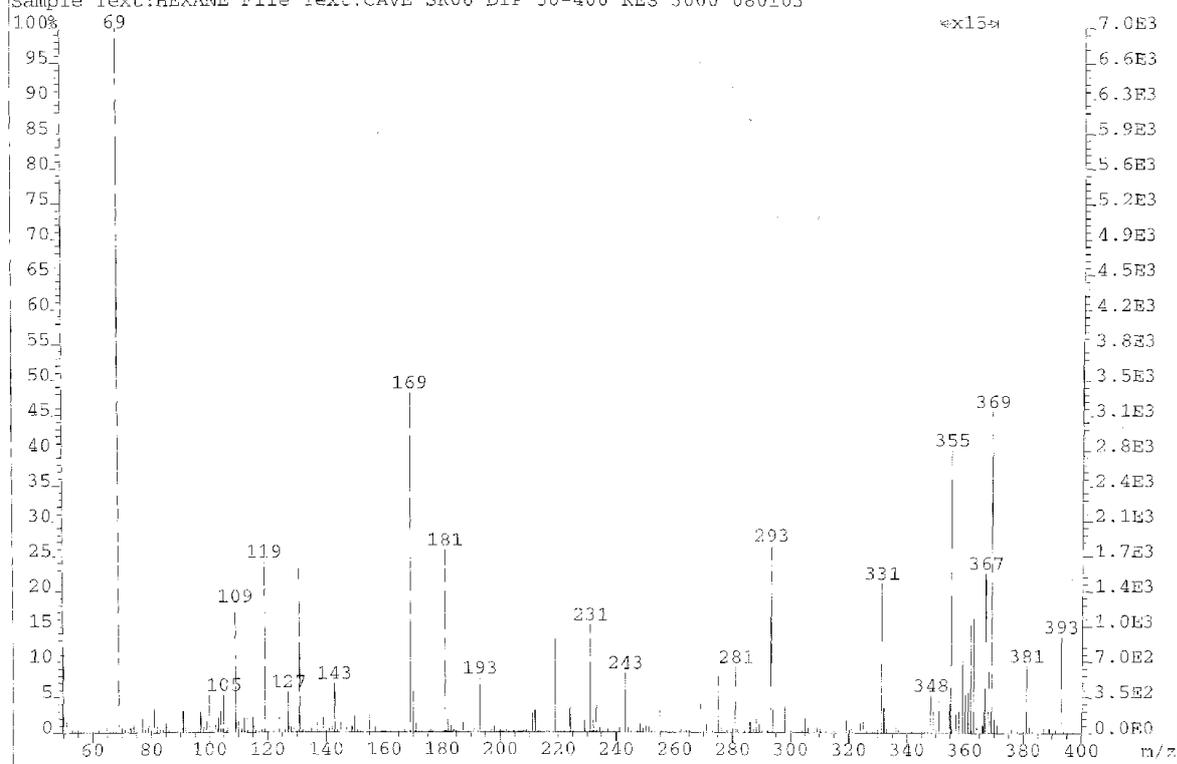
Spektren von 2-Phenylethyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 61



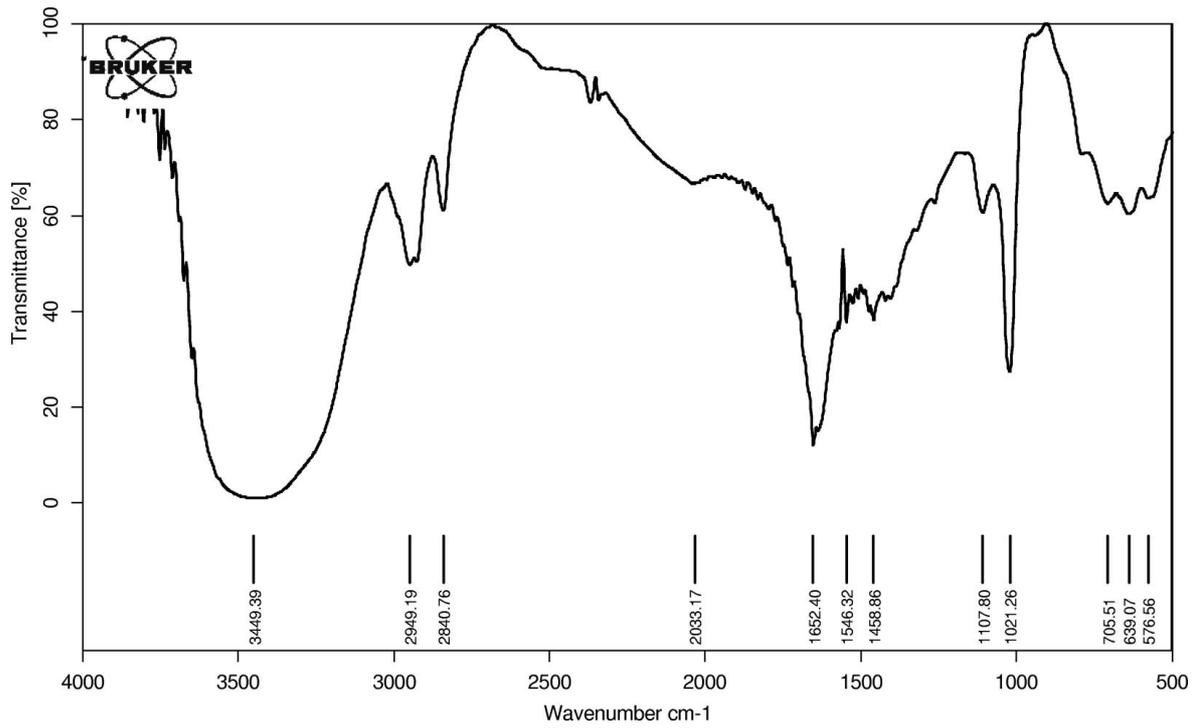
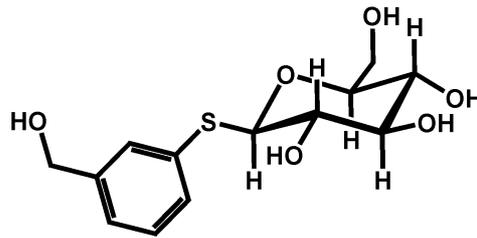
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

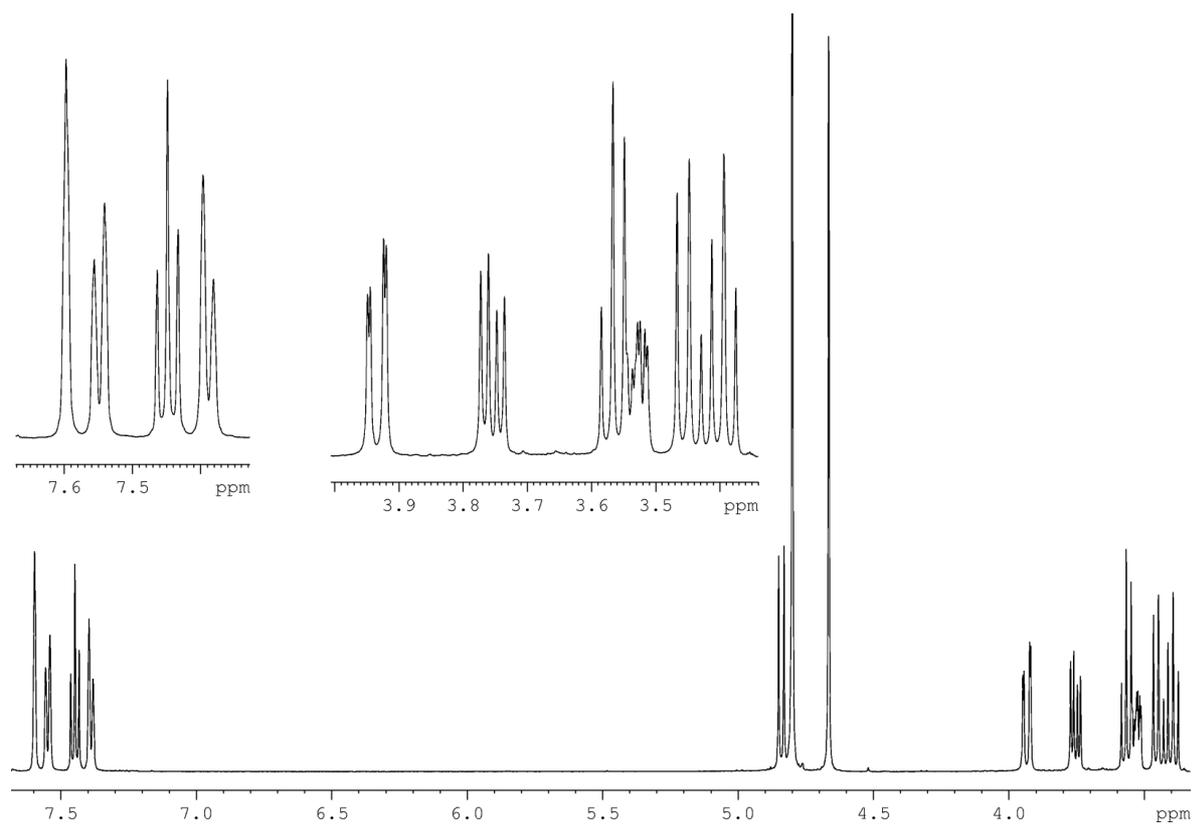
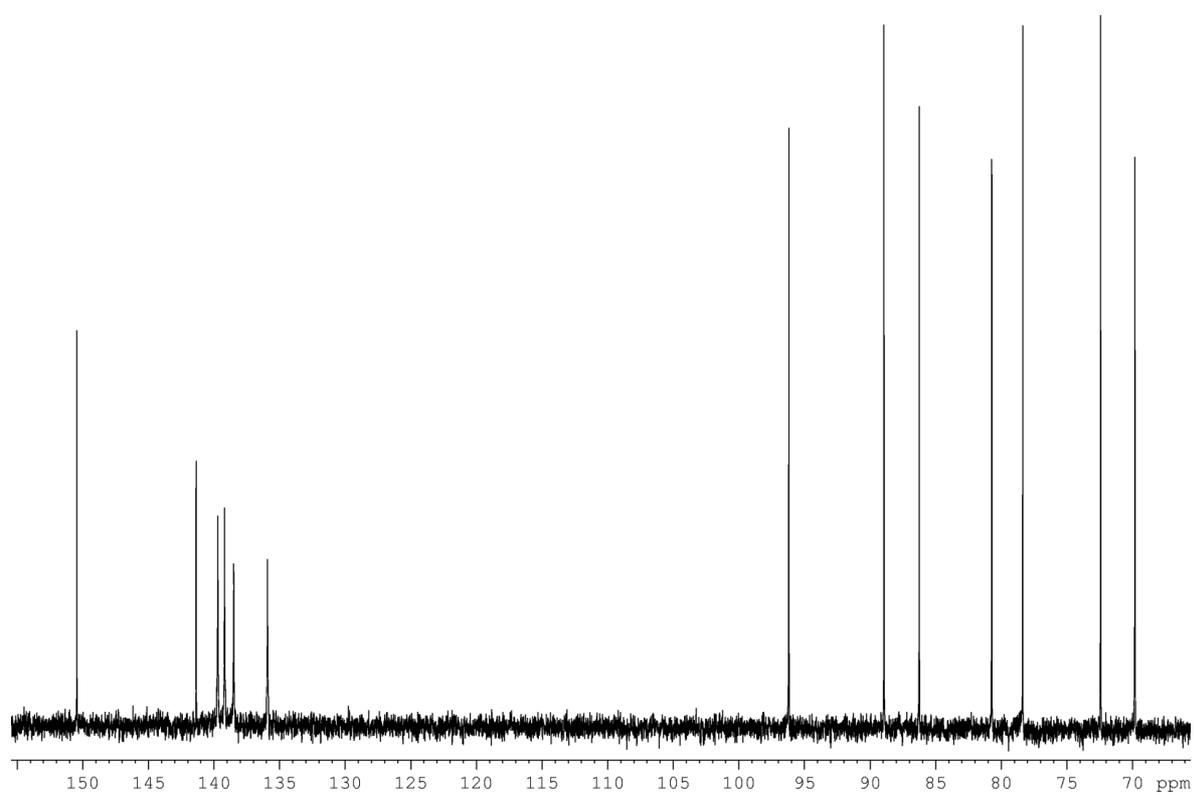
File:SBOLCAVESK06 Ident:66_I32-3_29 Win 1000PPM Acq: 8-JAN-2003 15:12:13 +2:37 Cal:SBOLCAVESK06»
MassSpec EI+ Magnet BpM:69 BpI:6992 TIC:41408 Flags:HALL
Sample Text:HEXANE File Text:CAVE SK06 DIP 50-400 RES 3000 080103

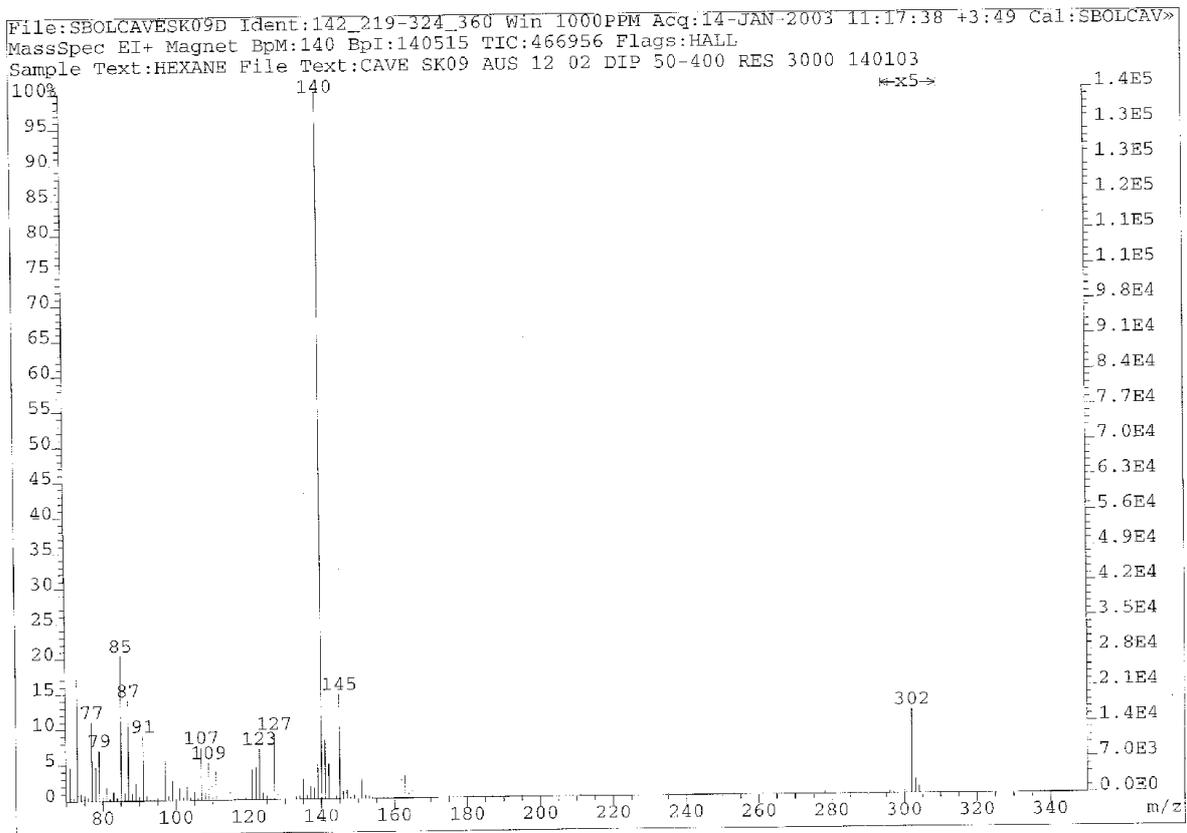


MS-Spektrum

Spektren von 3-Methoxycarbonyl-phenyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 75

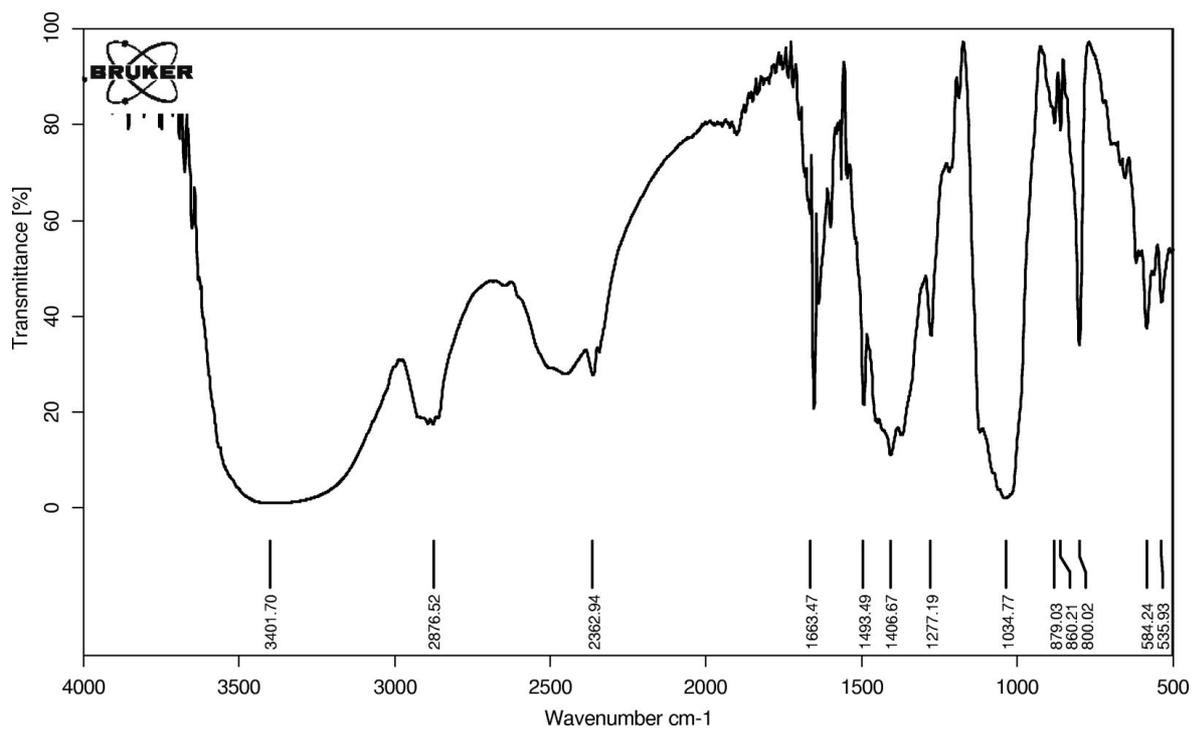
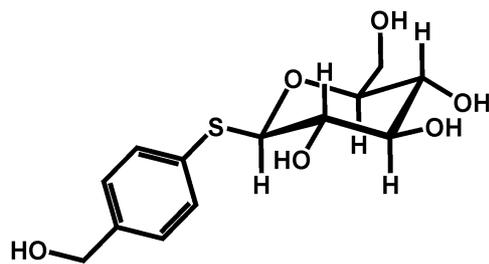
IR-Spektrum

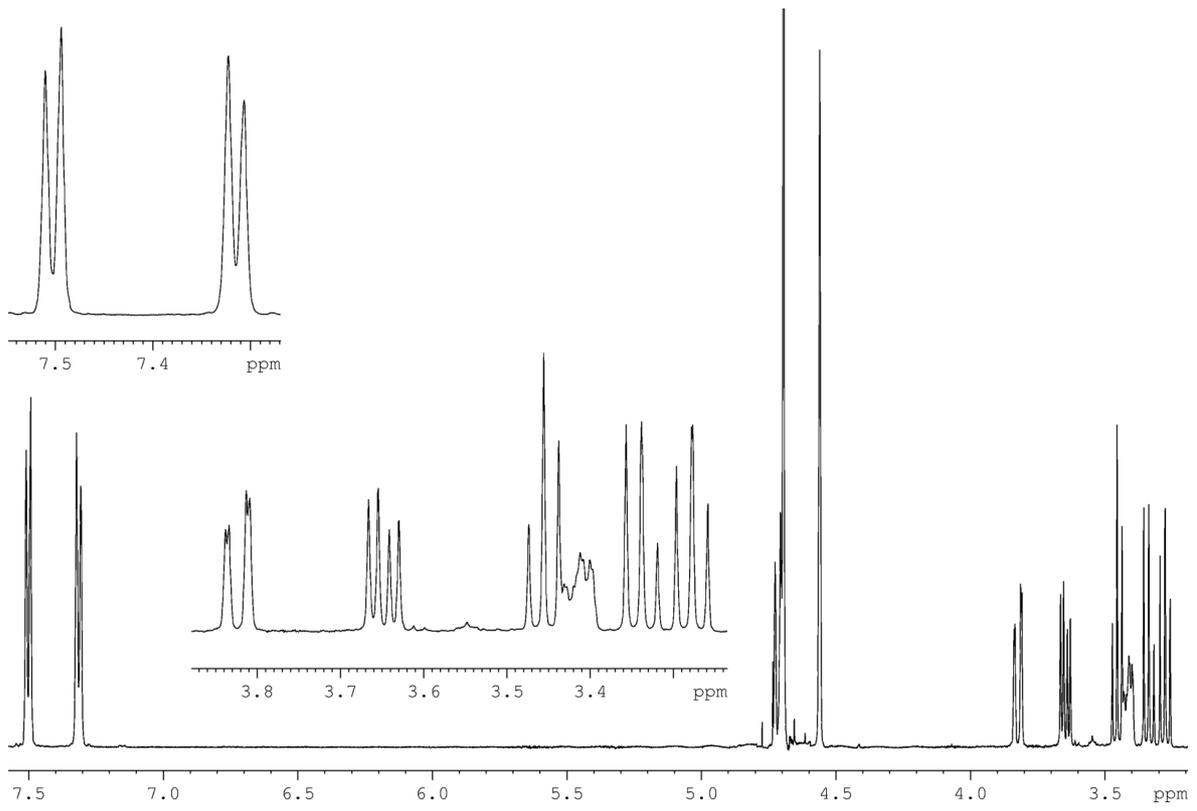
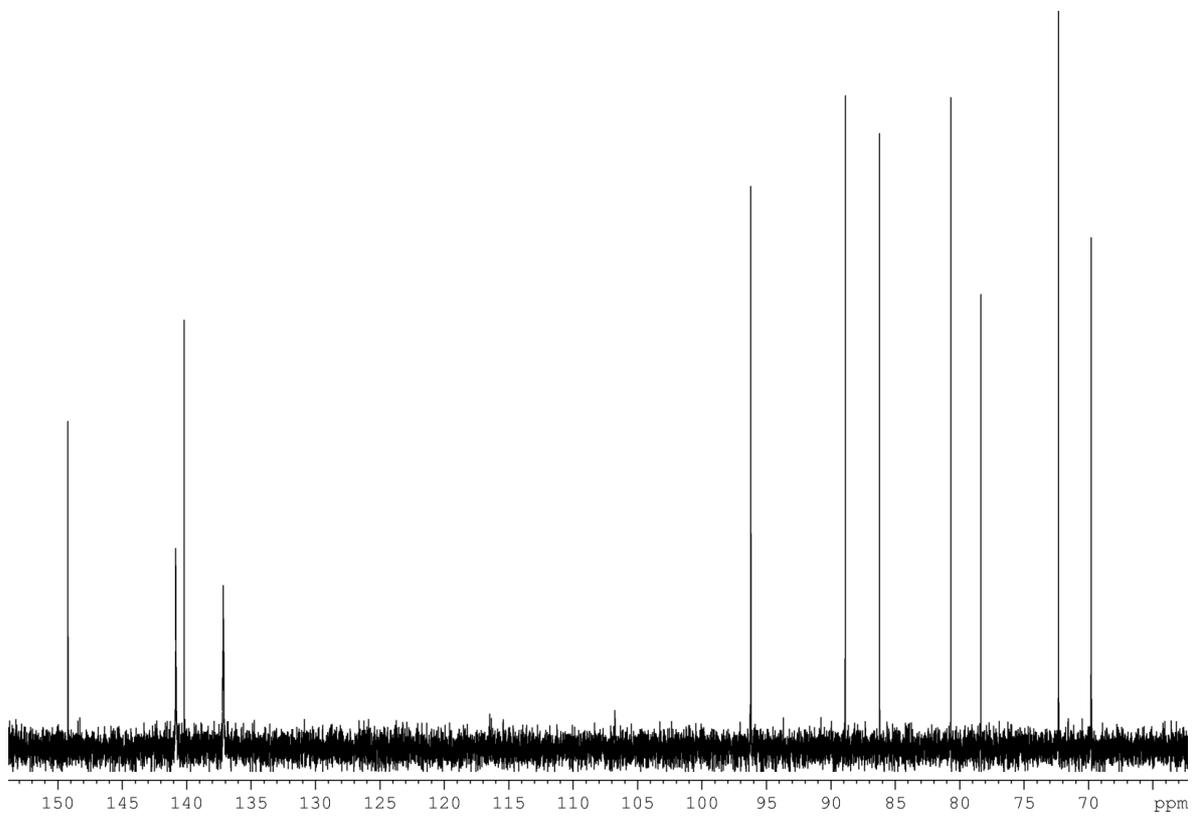
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

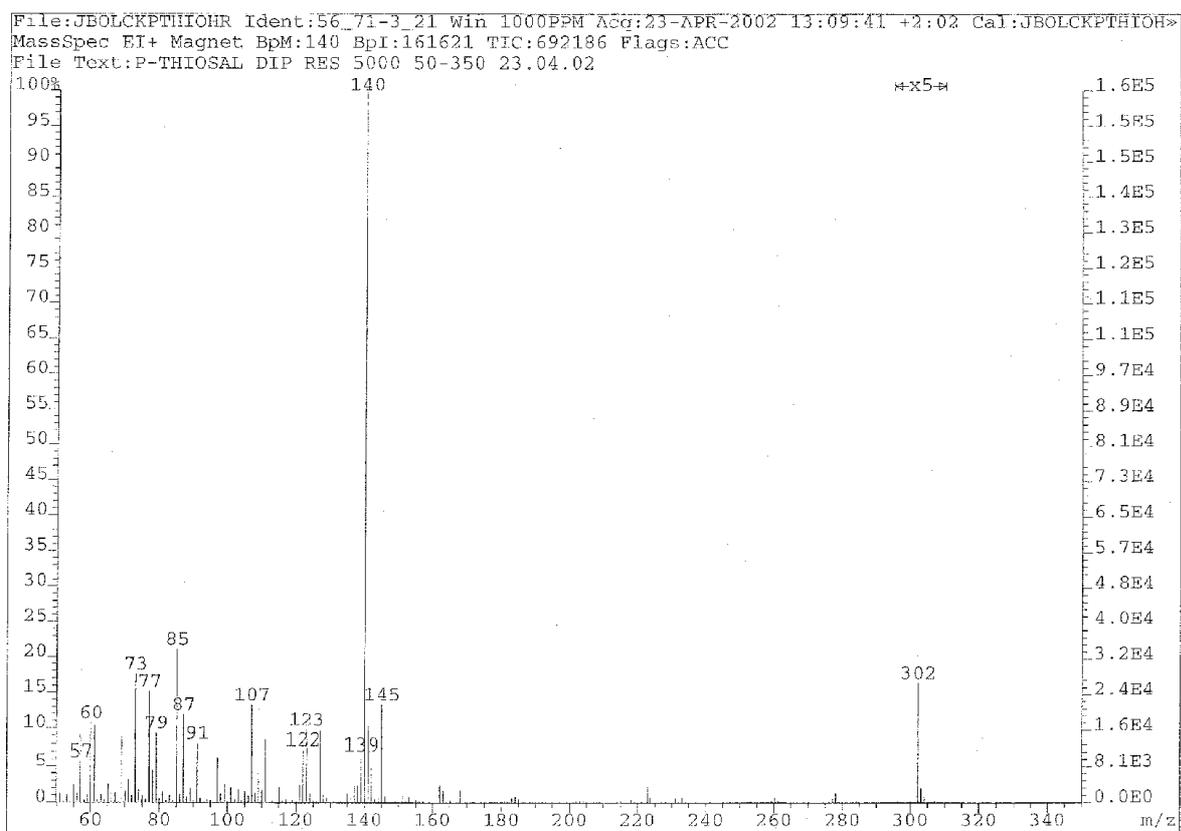


MS-Spektrum

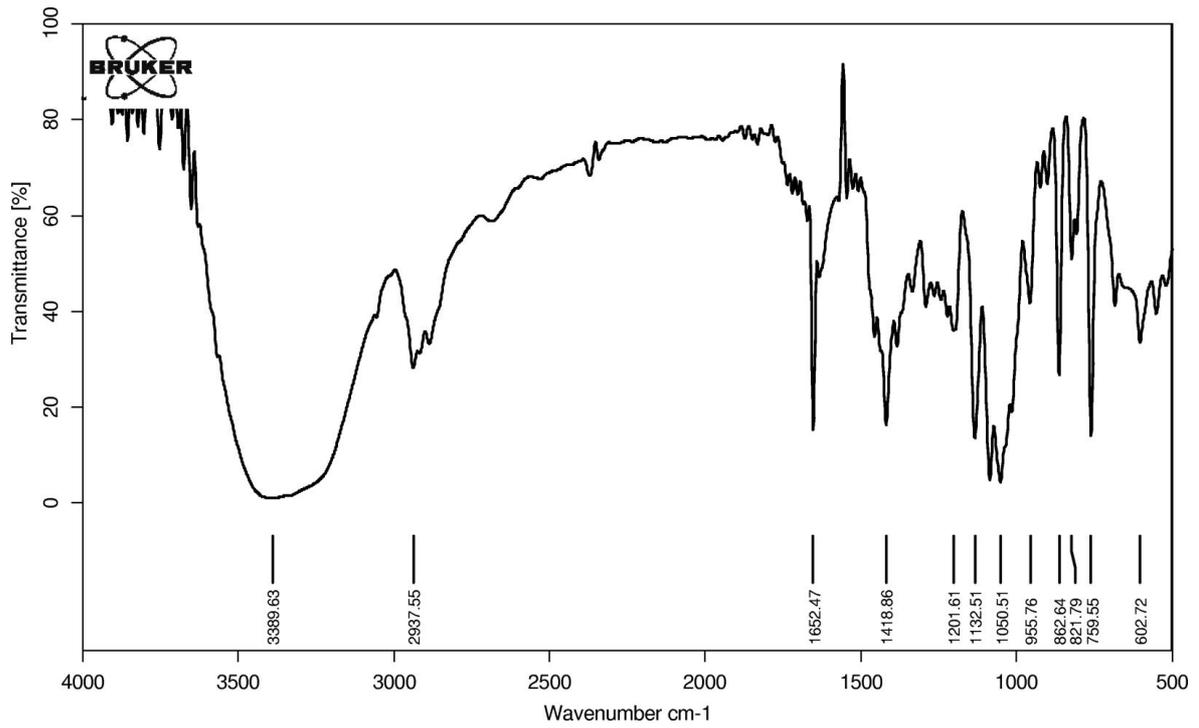
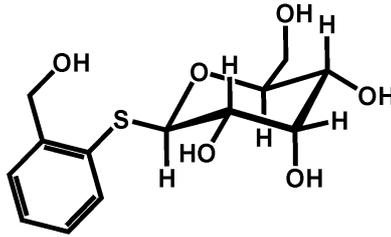
Spektren von 4-Methoxycarbonyl-phenyl-1'-thio- β -D-glucofuranosid 75



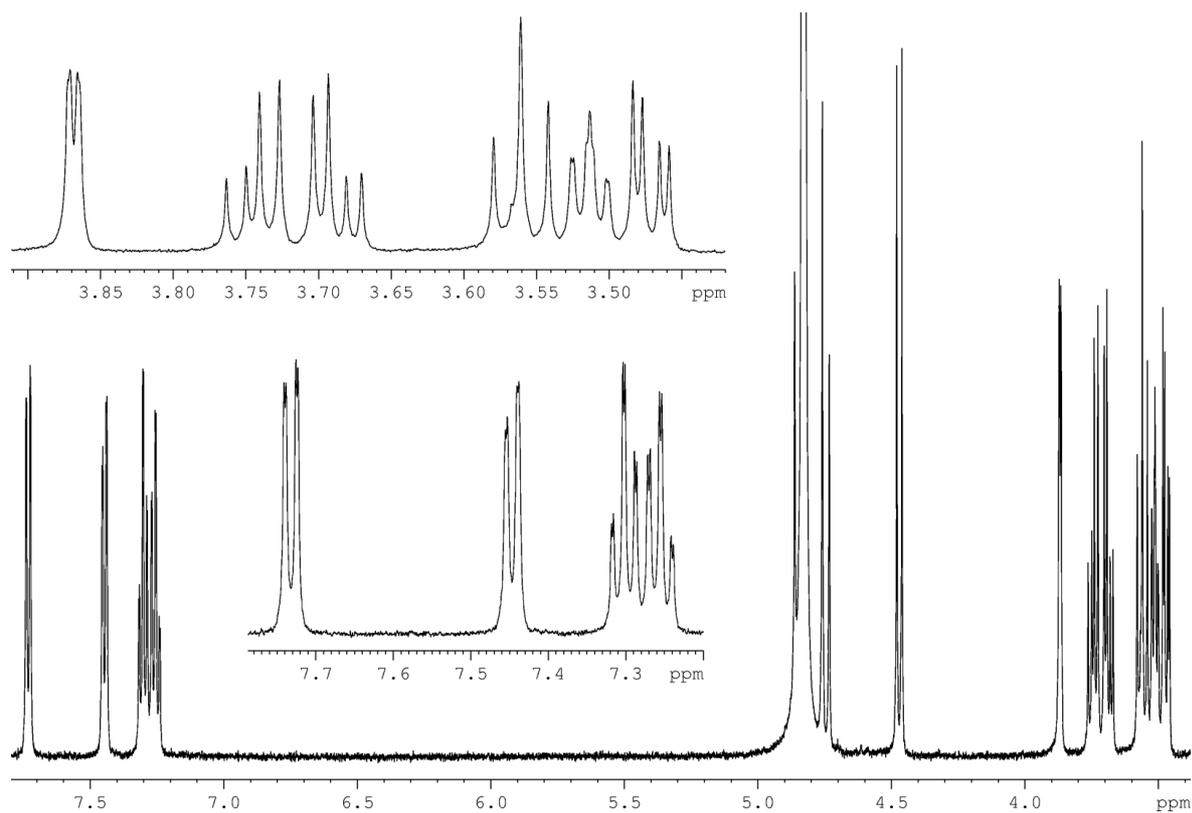
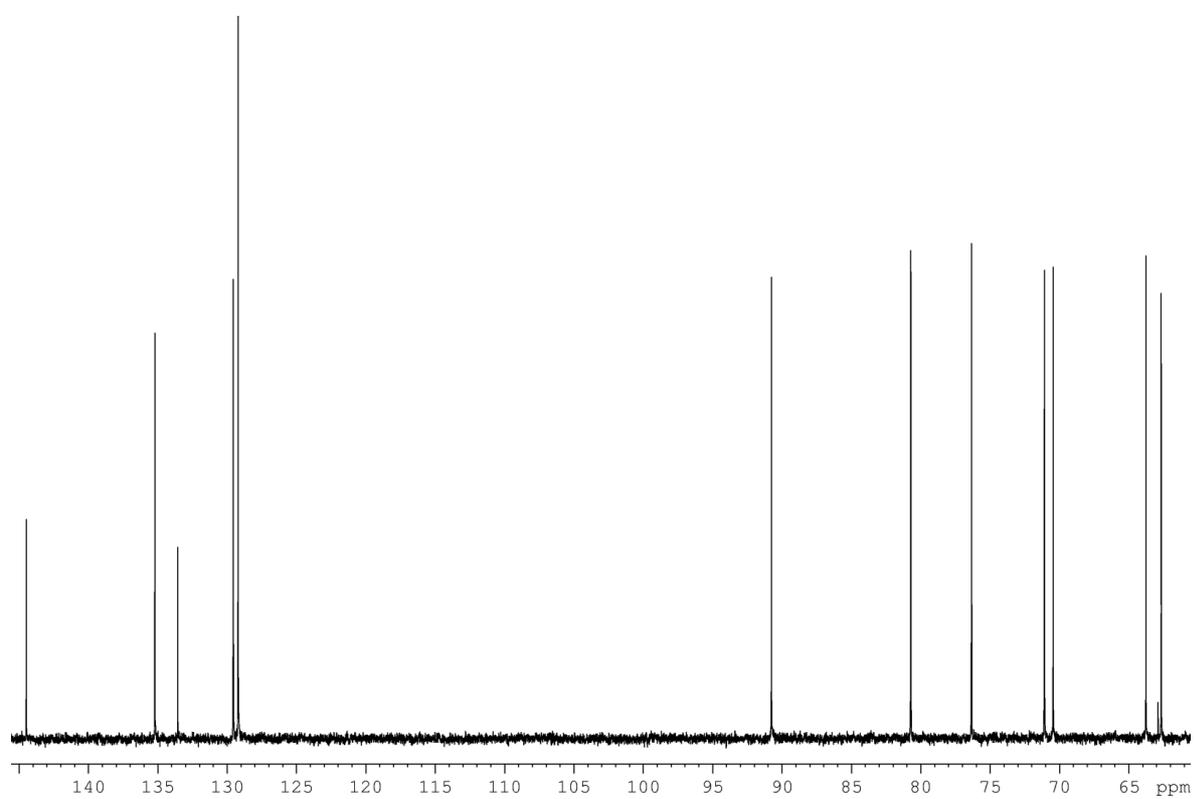
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

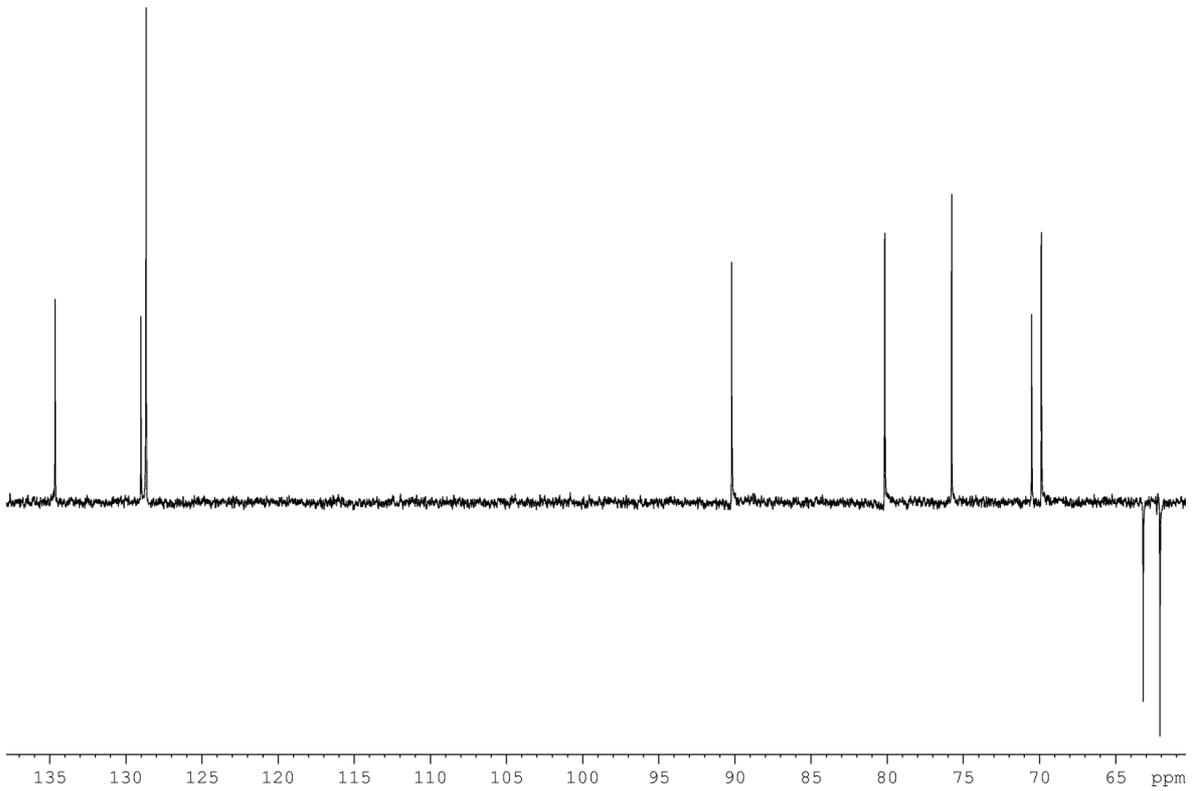


MS-Spektrum

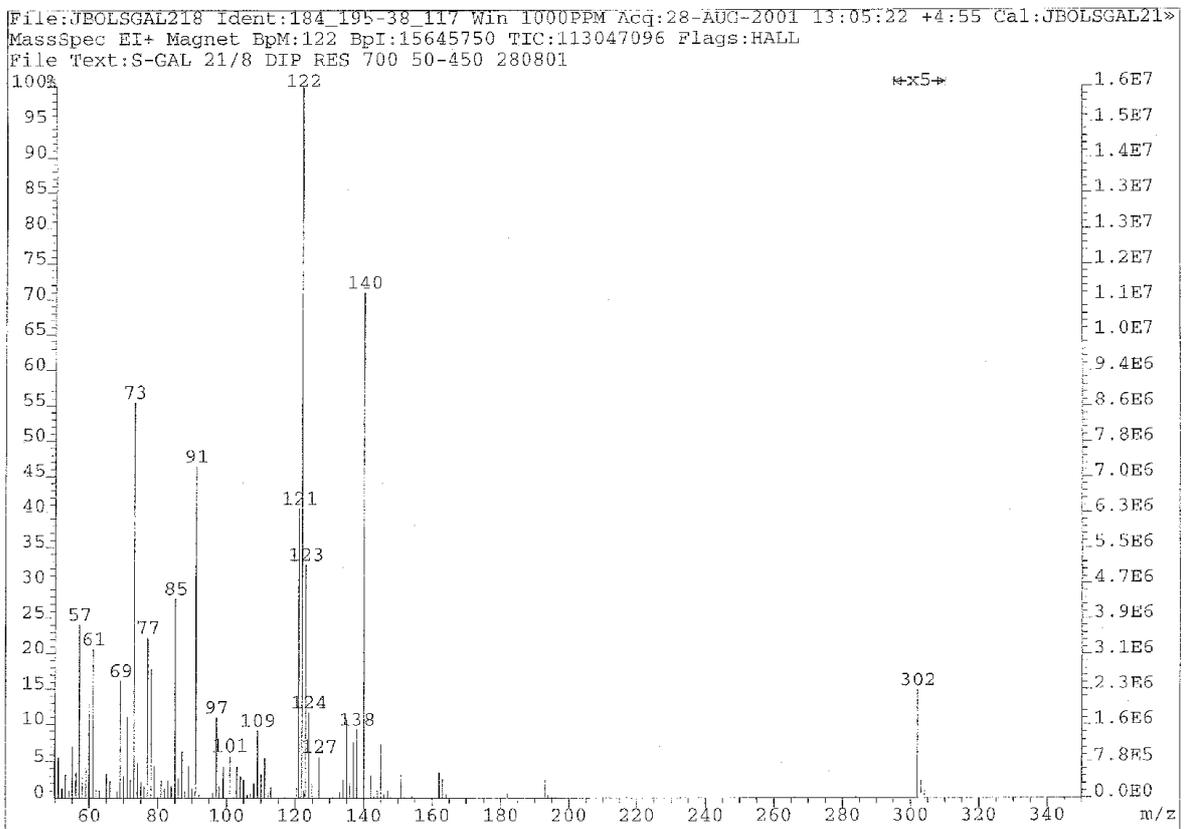
Spektren von 2-Methoxycarbonyl-phenyl-1'-thio- β -D-galactopyranosid 78

IR-Spektrum

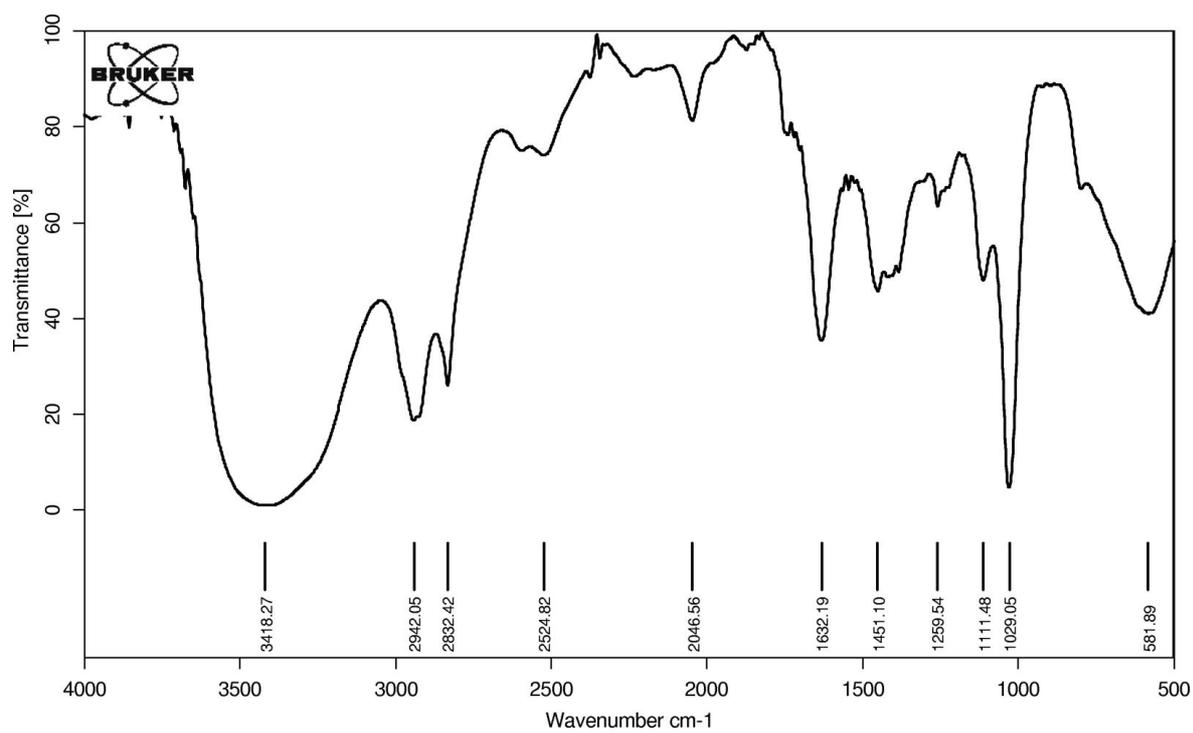
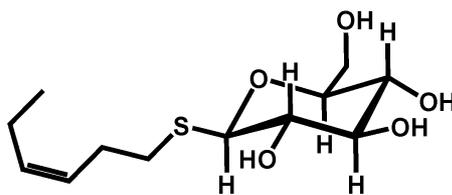
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum



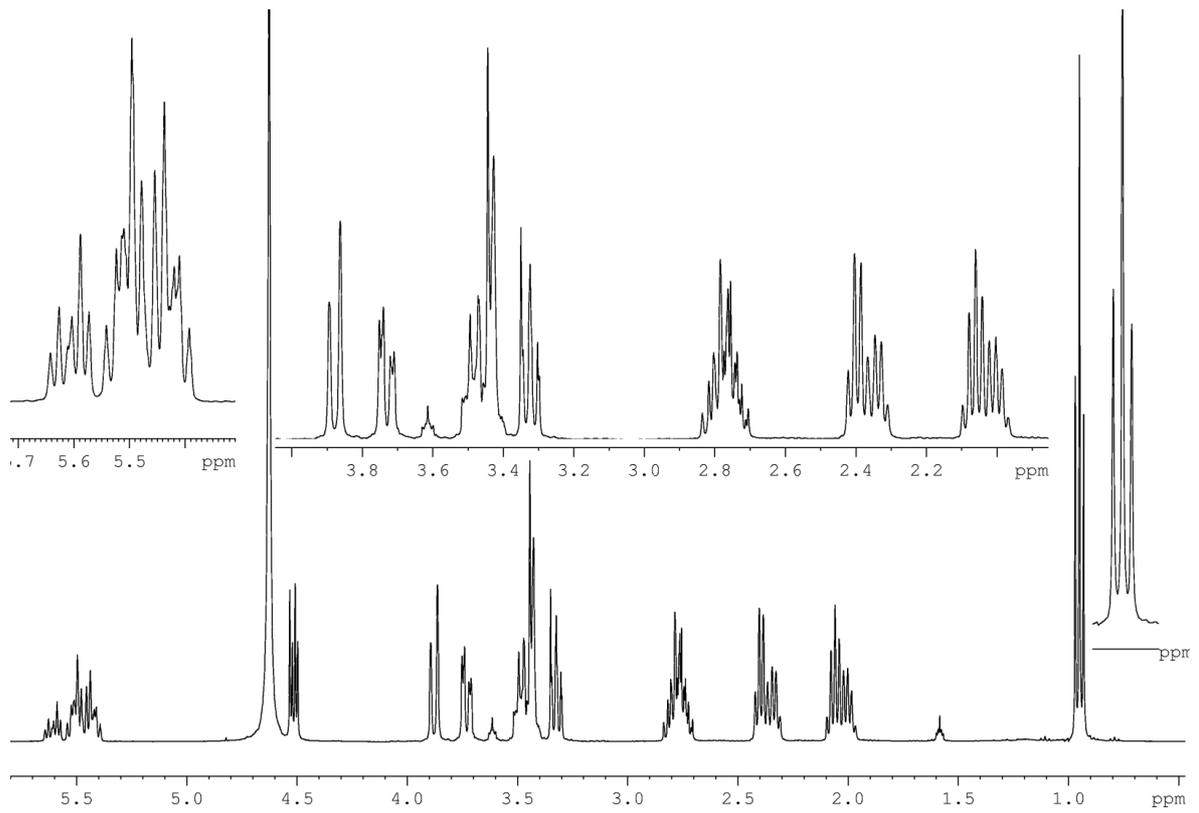
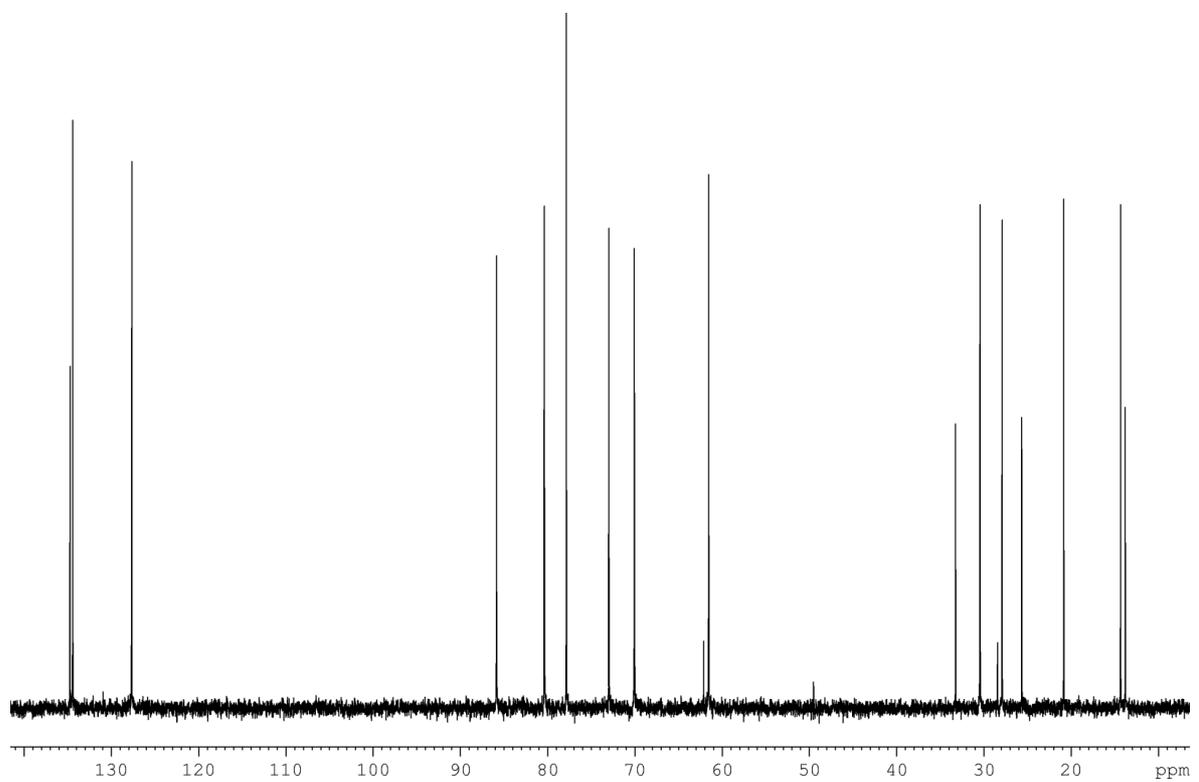
APT-NMR-Spektrum

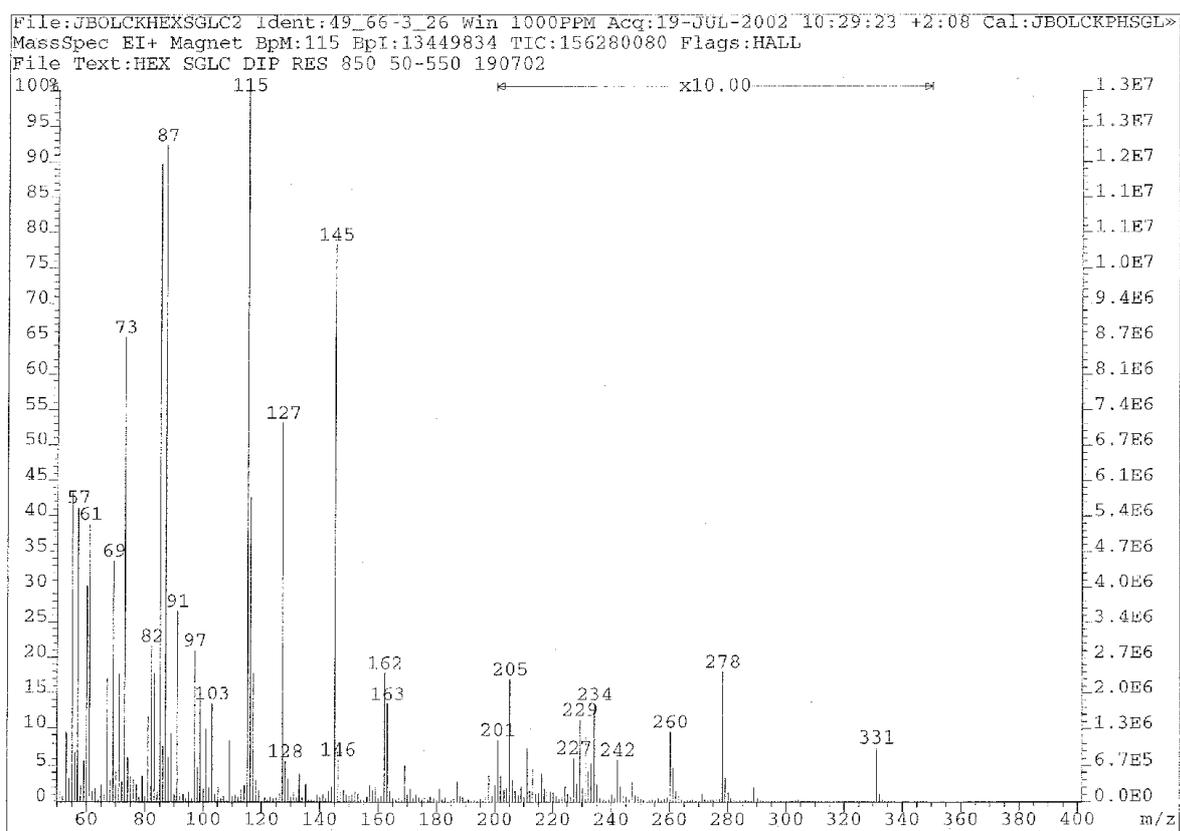


MS-Spektrum

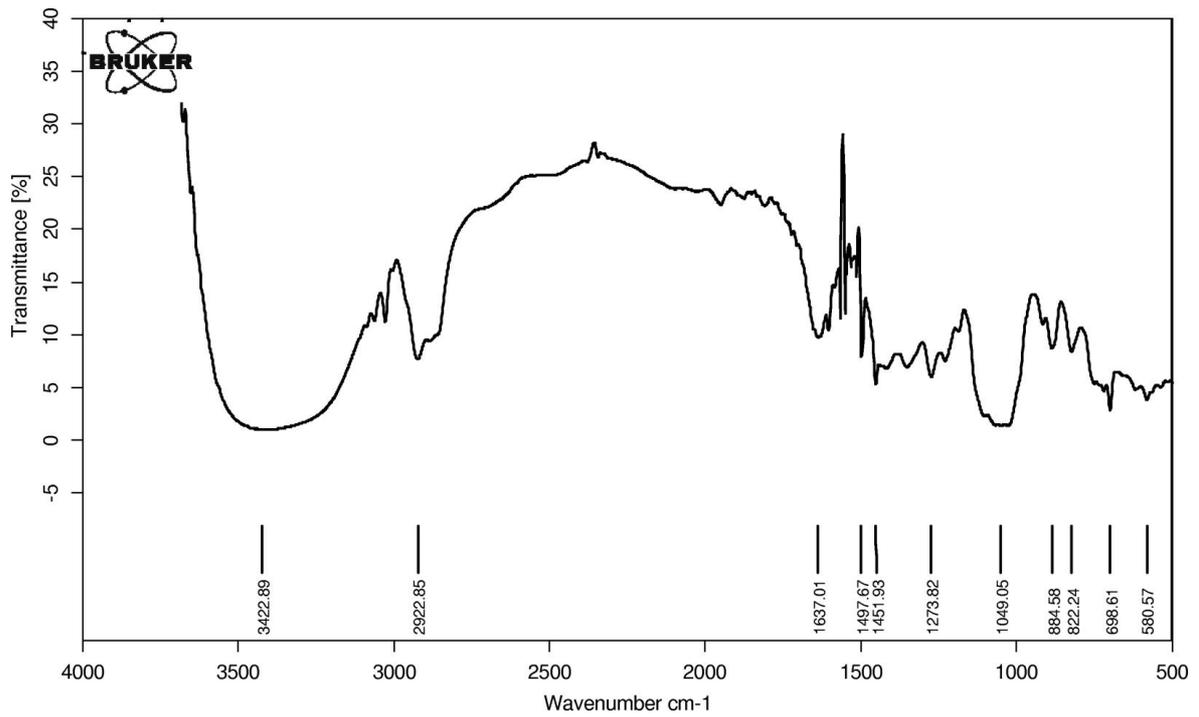
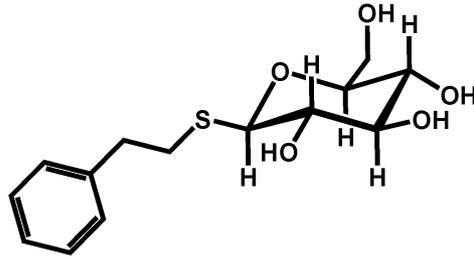
Spektren von (3Z)-Hex-3-en-1-yl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 67

IR-Spektrum

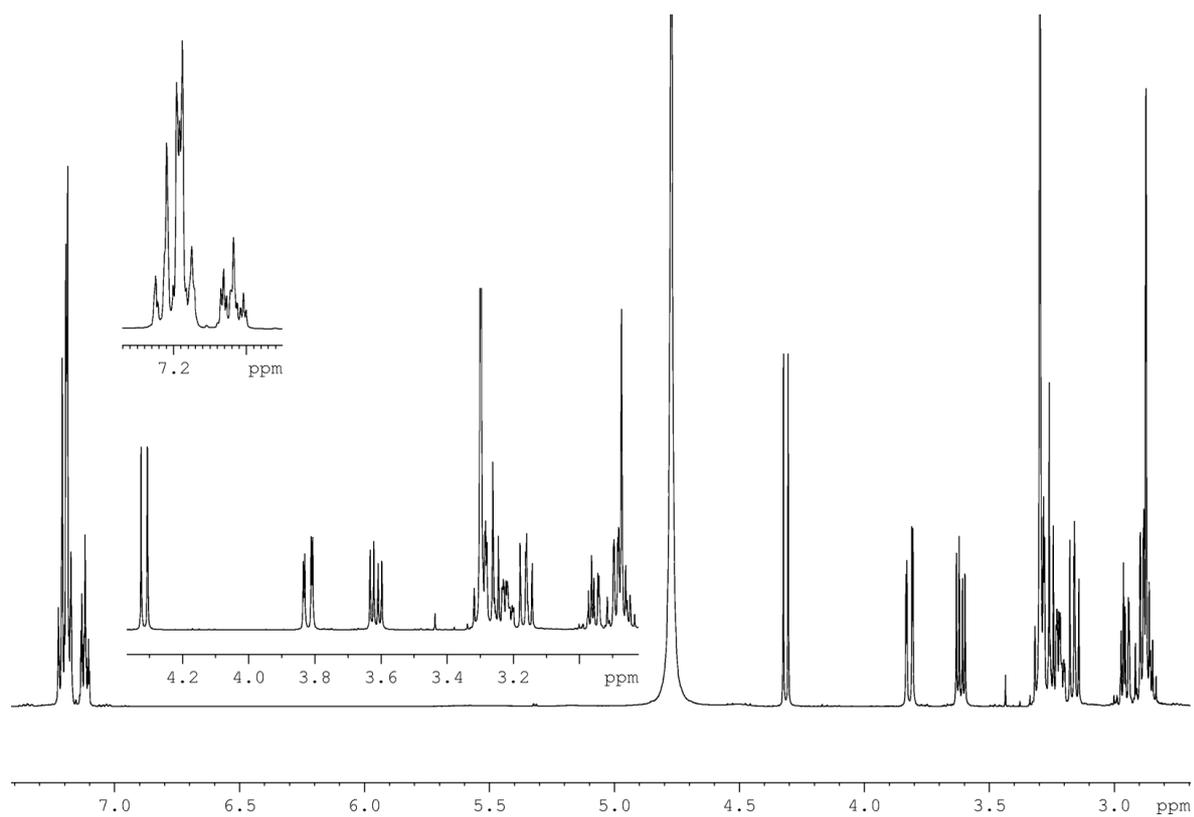
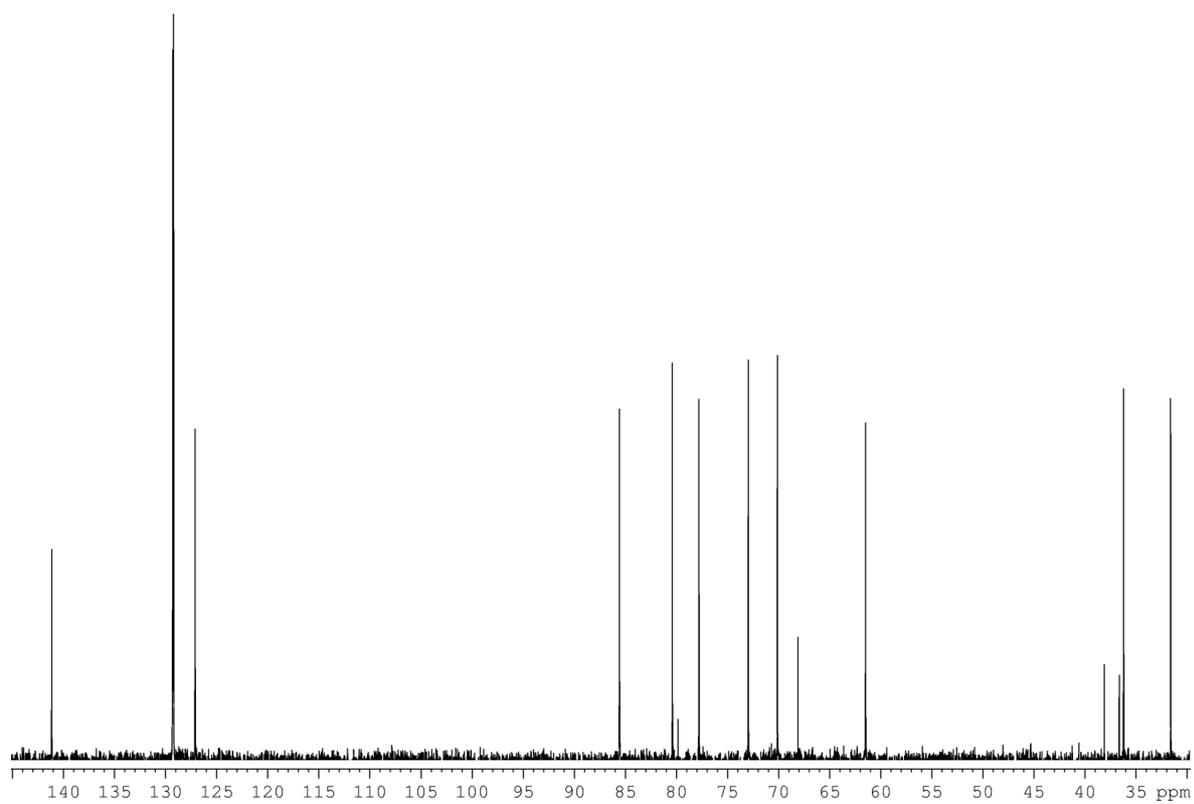
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

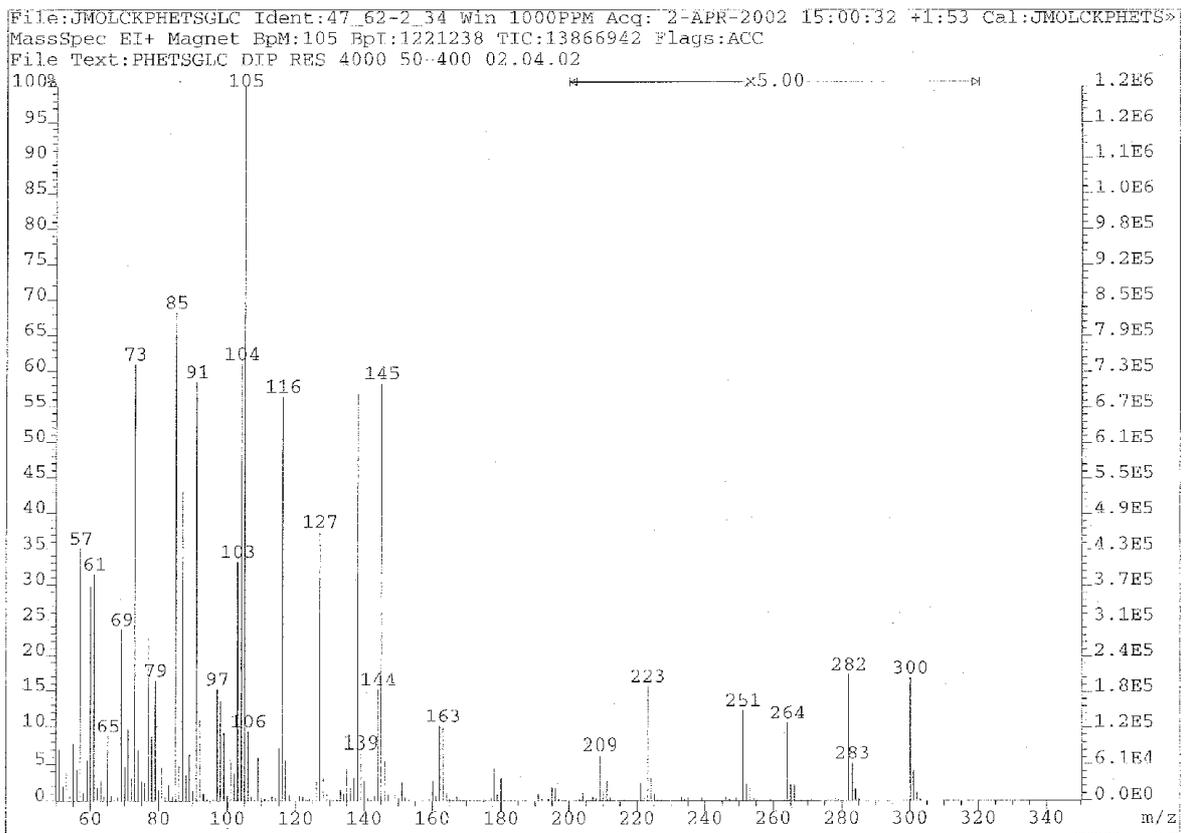


MS-Spektrum

Spektren von 2-Phenylethyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 68

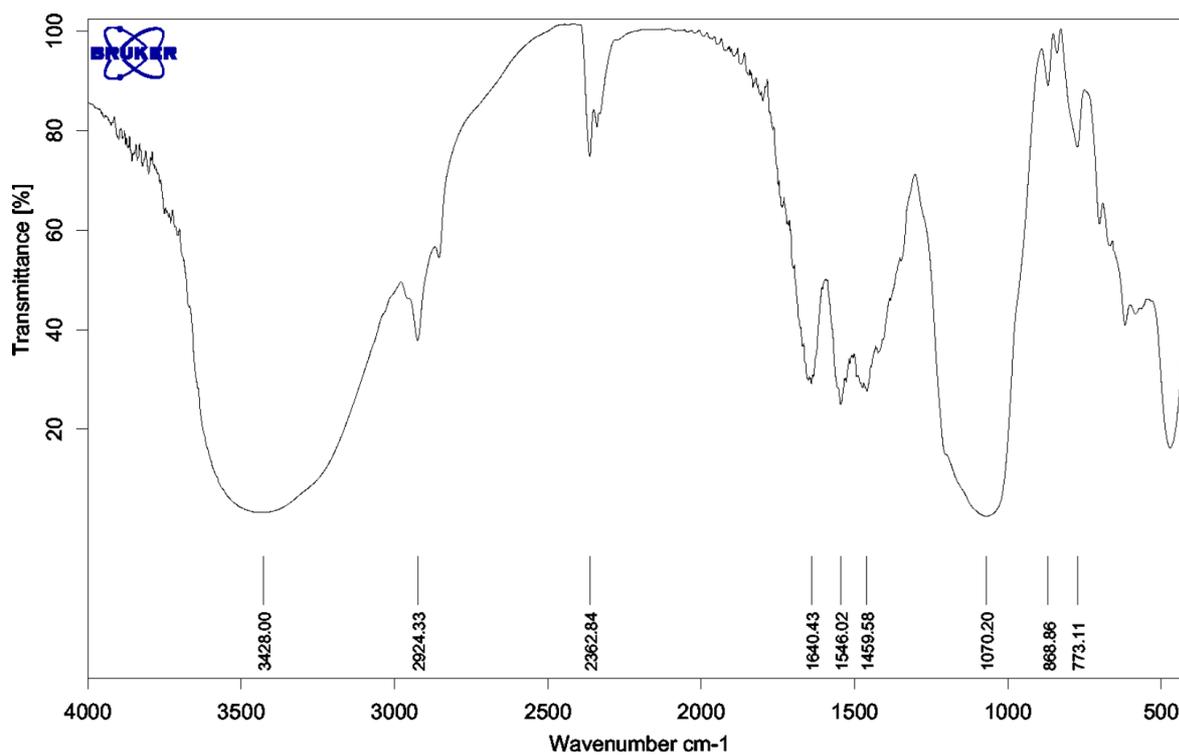
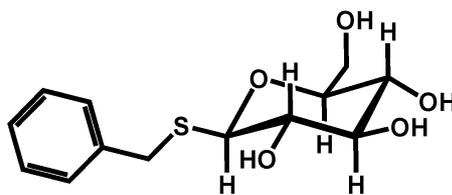
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

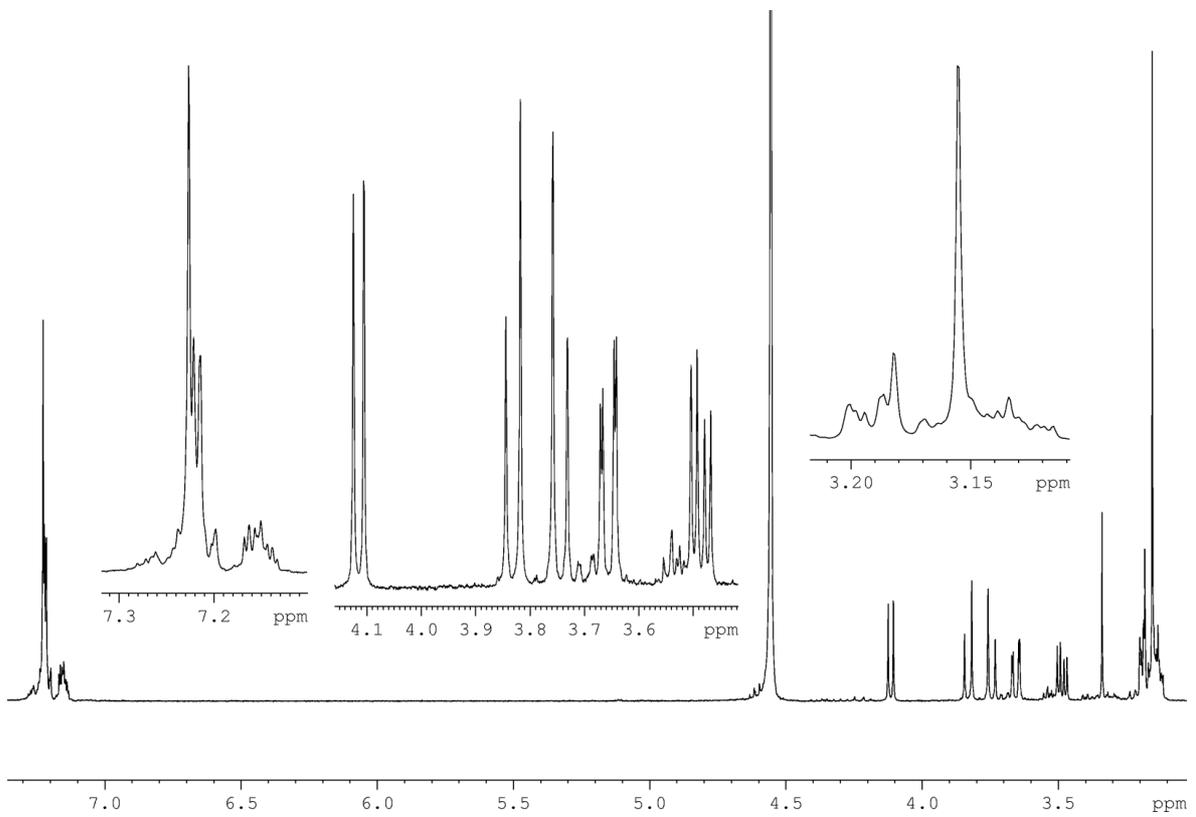


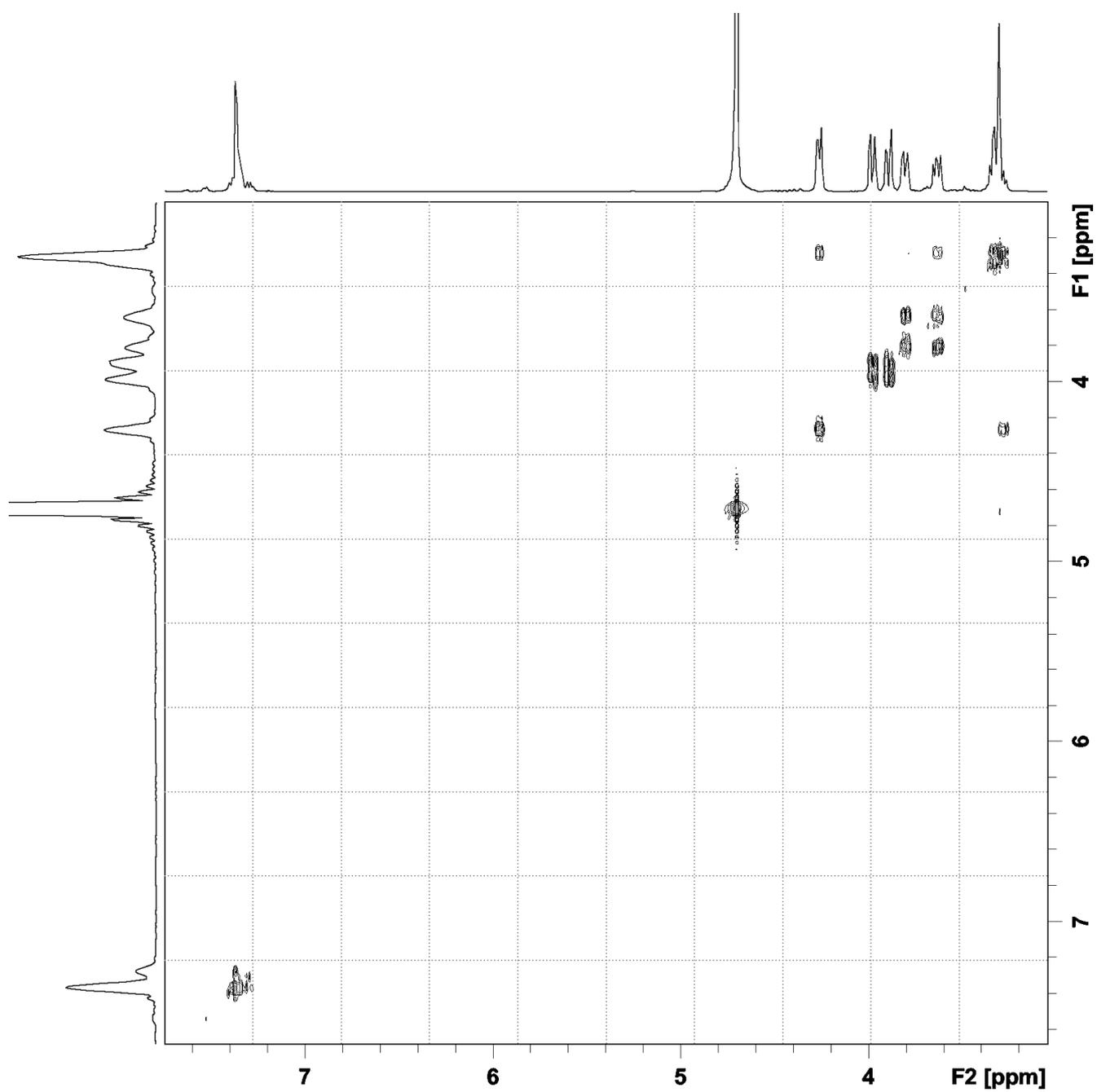
MS-Spektrum

Spektren von Benzyl-1'-thio- β -D-glucofuranosid 68

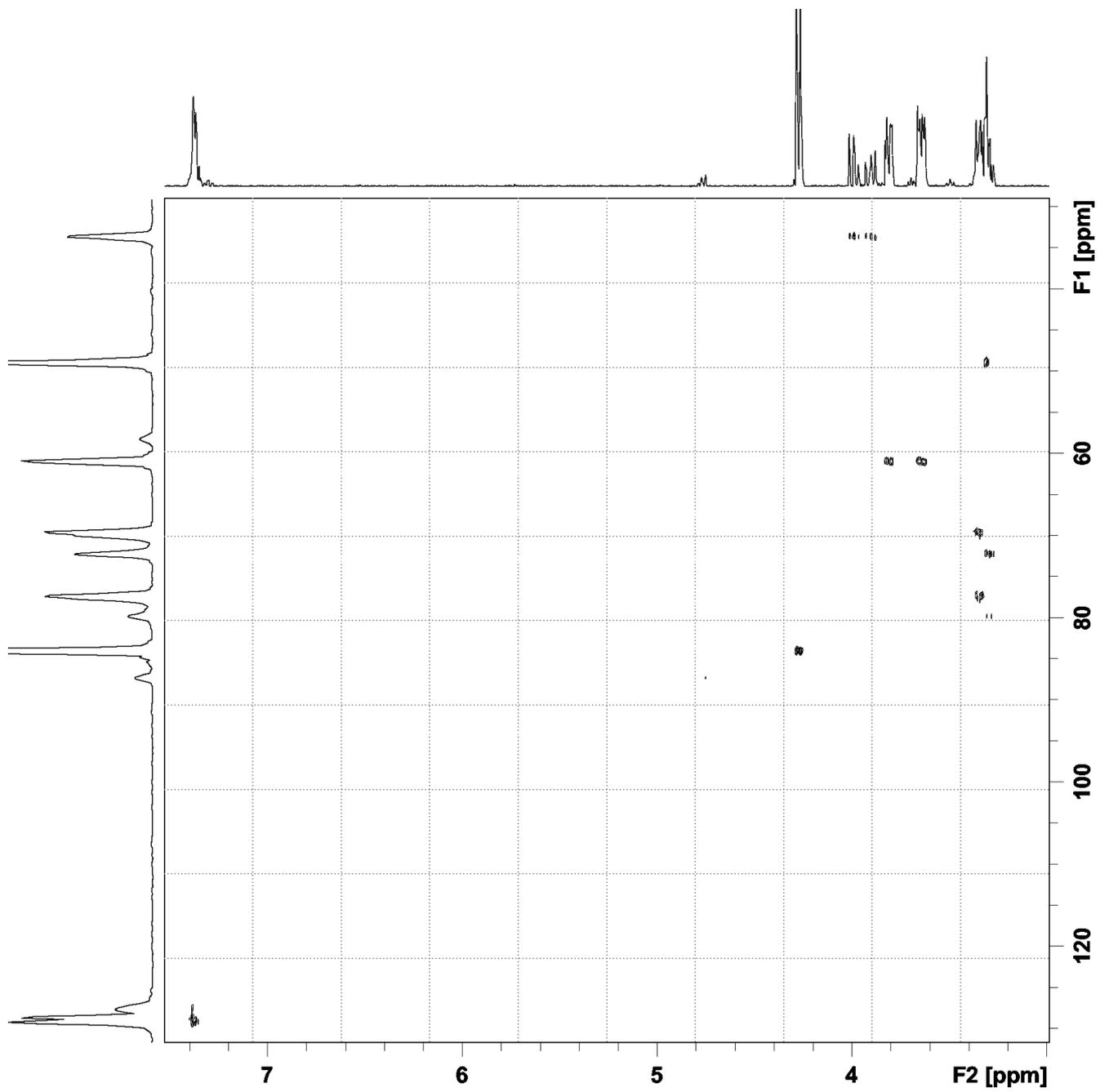


IR-Spektrum

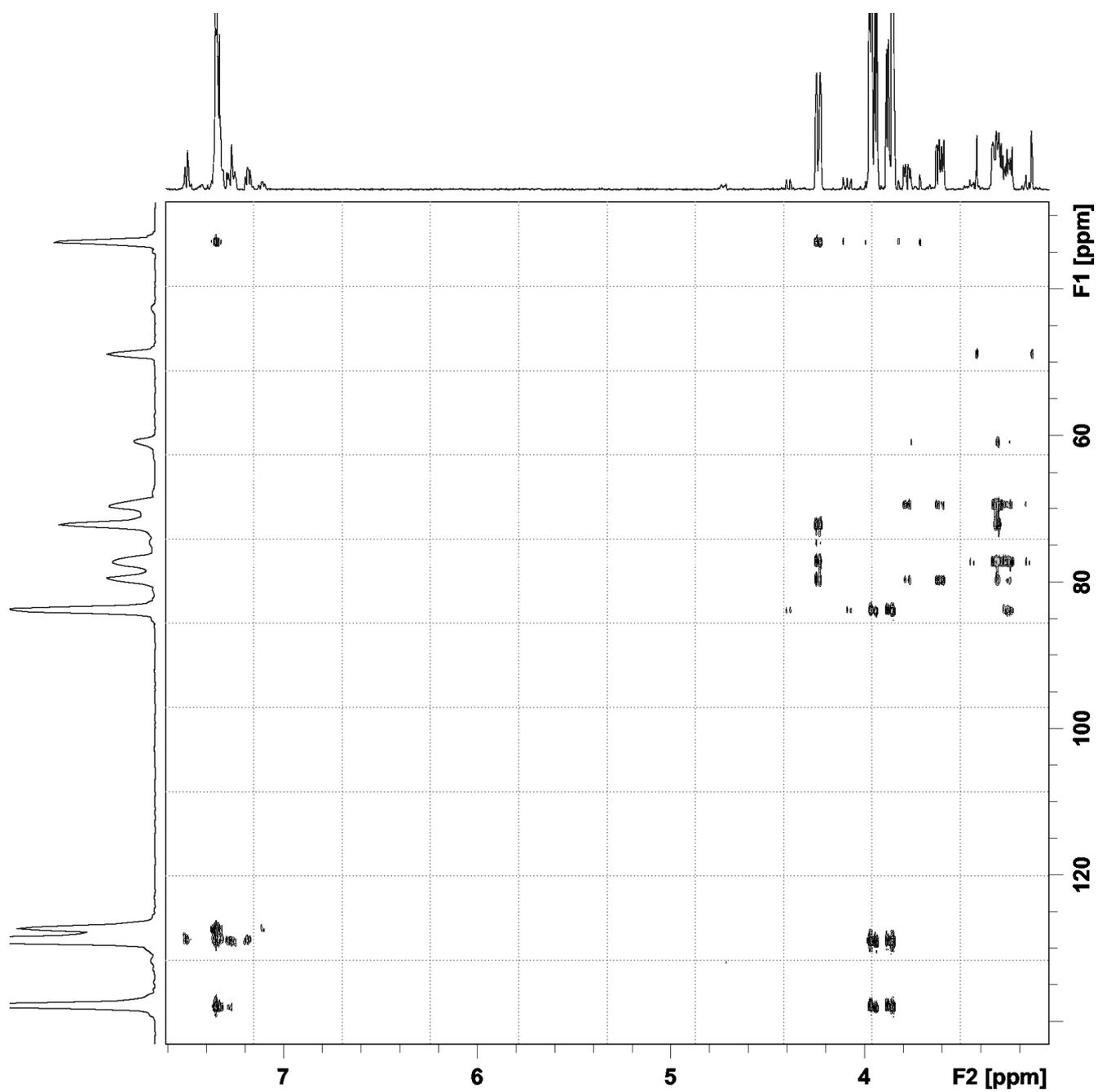
 ^1H -Spektrum



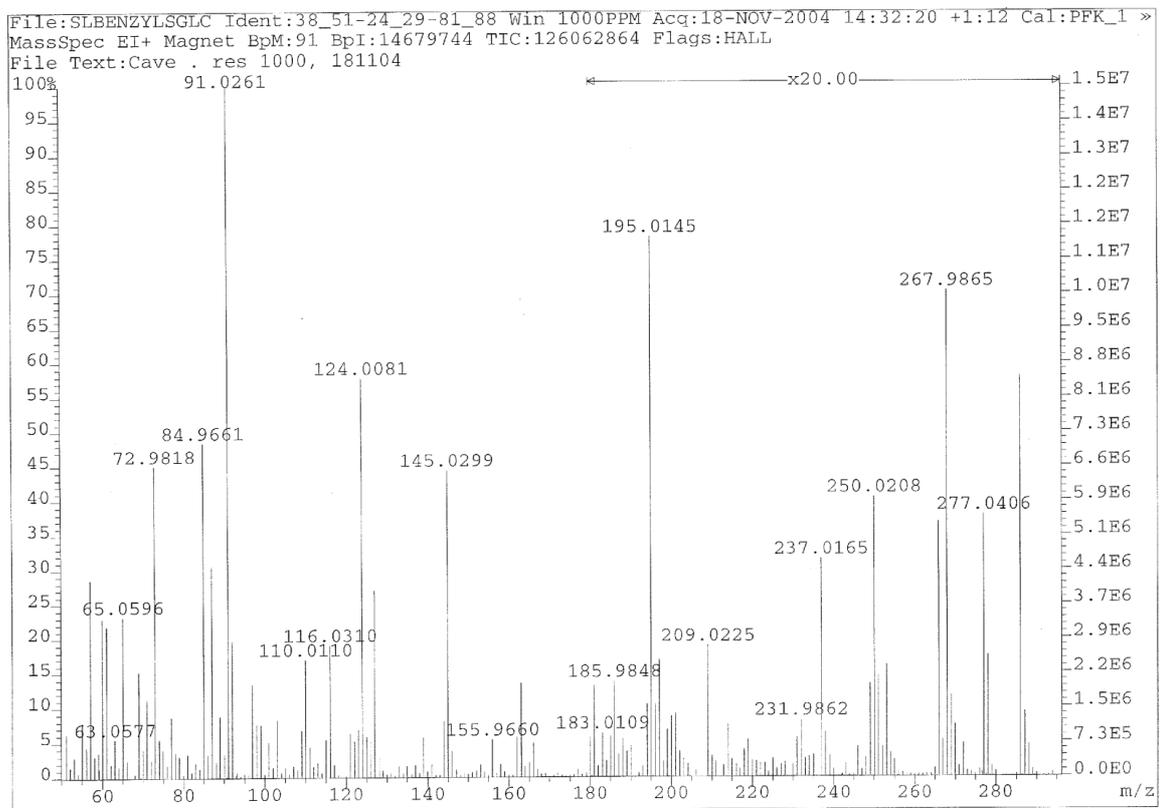
COSY-Spektrum



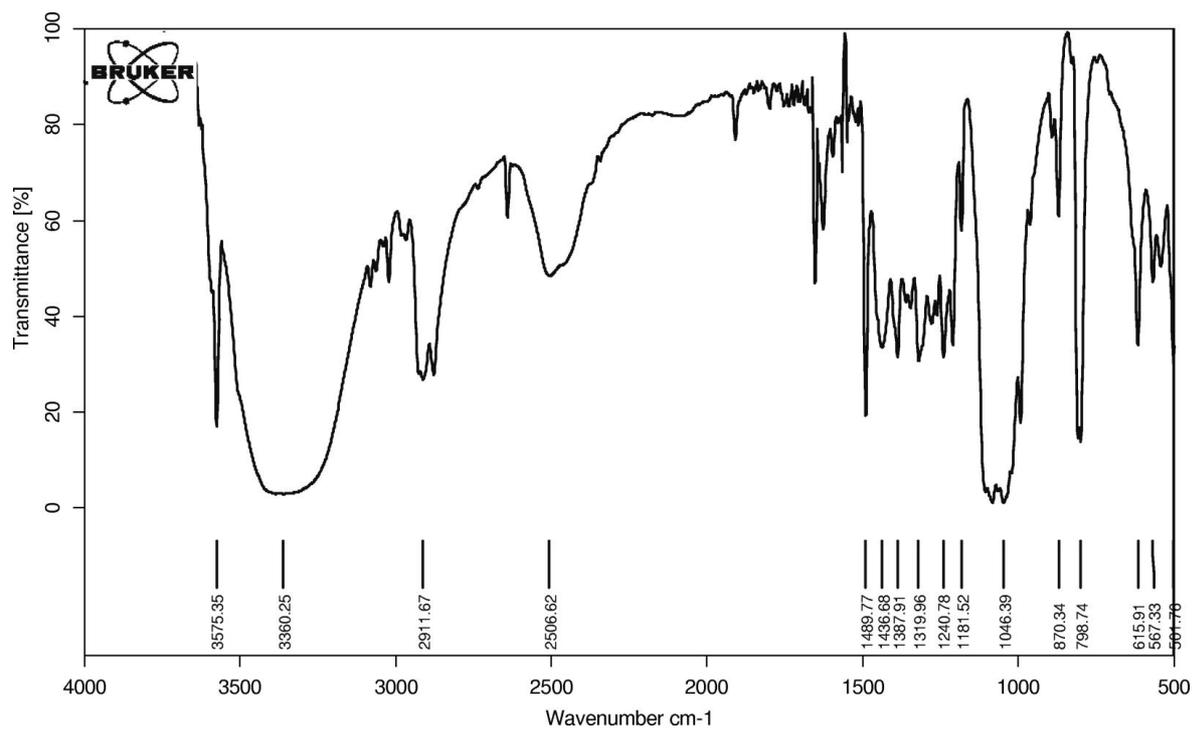
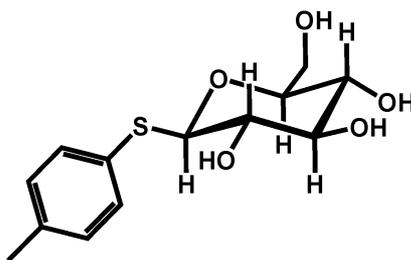
HMQC-Spektrum



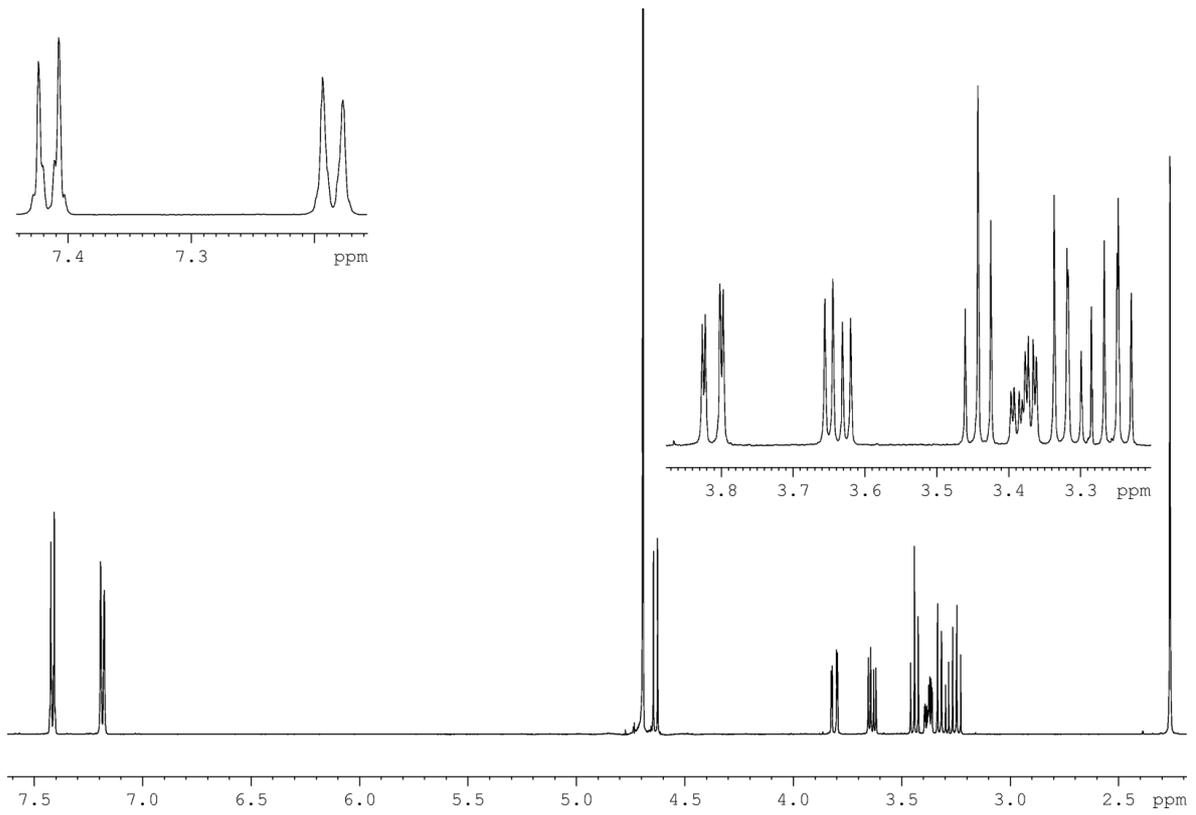
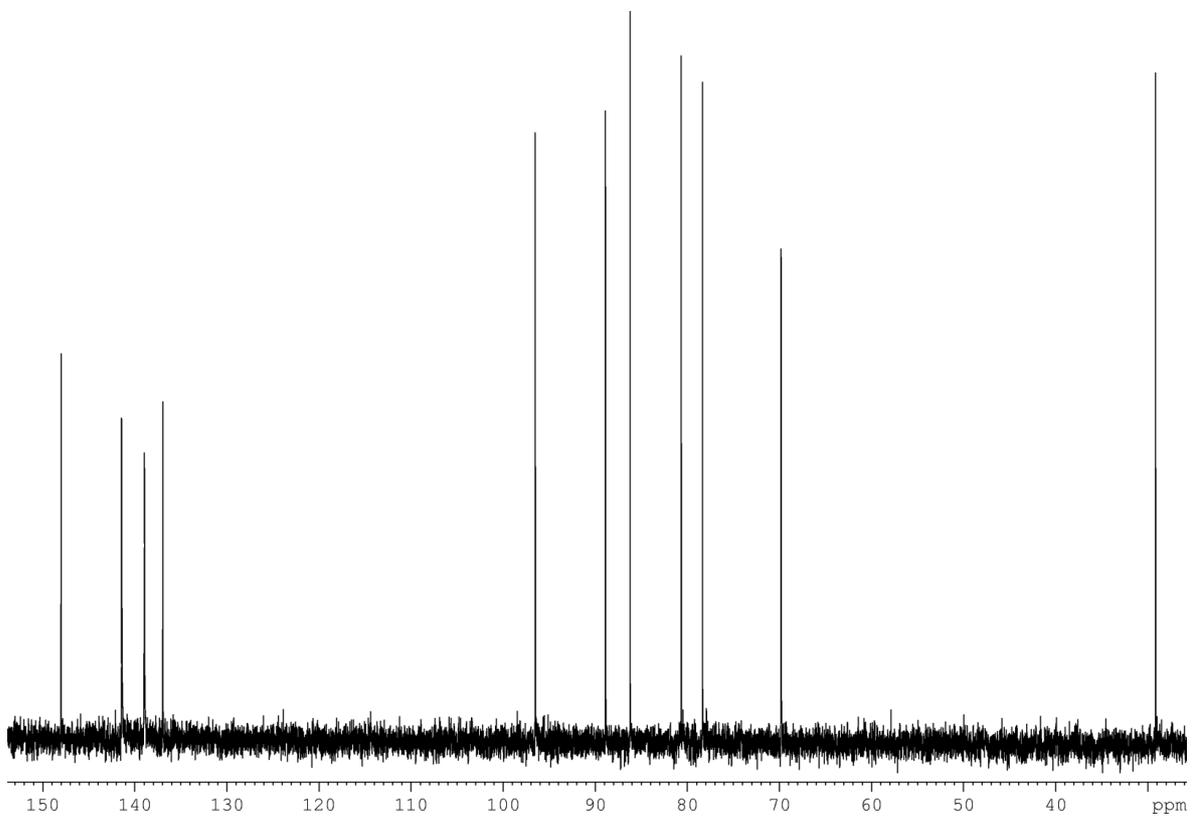
HMBC-Spektrum

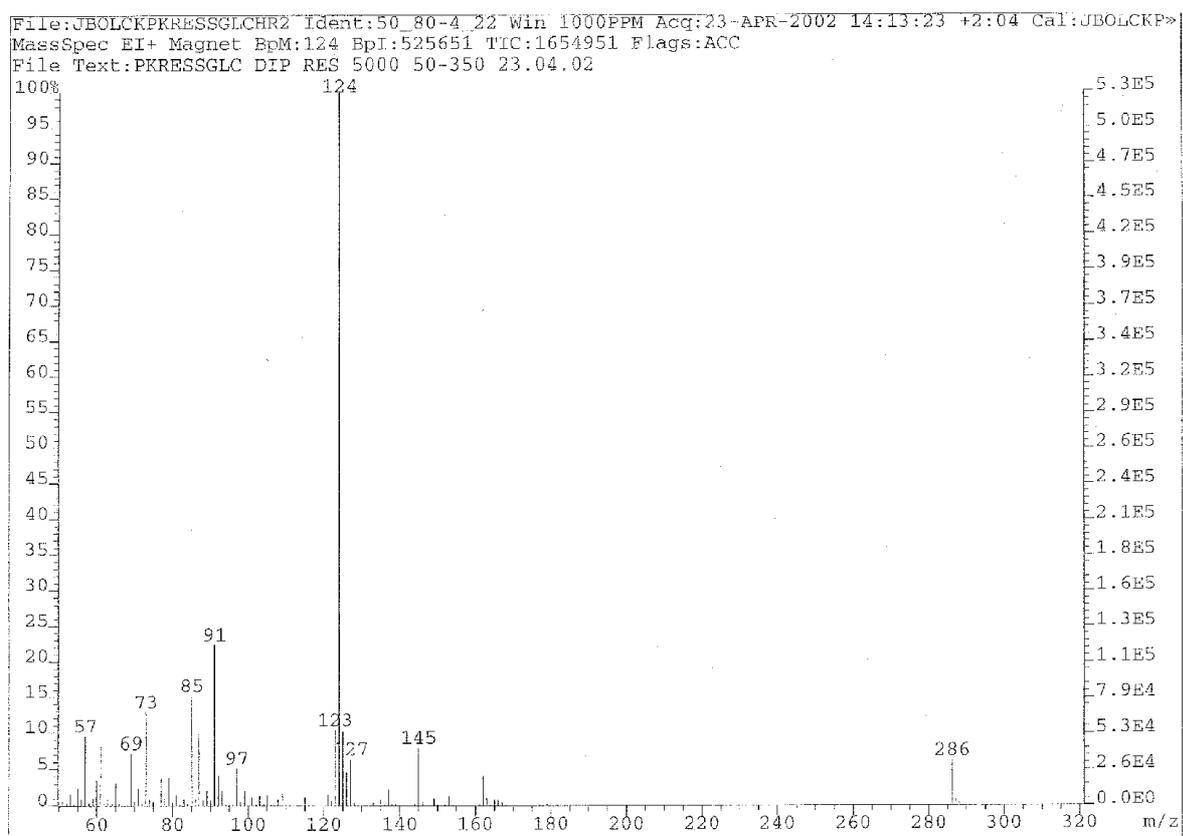


MS-Spektrum

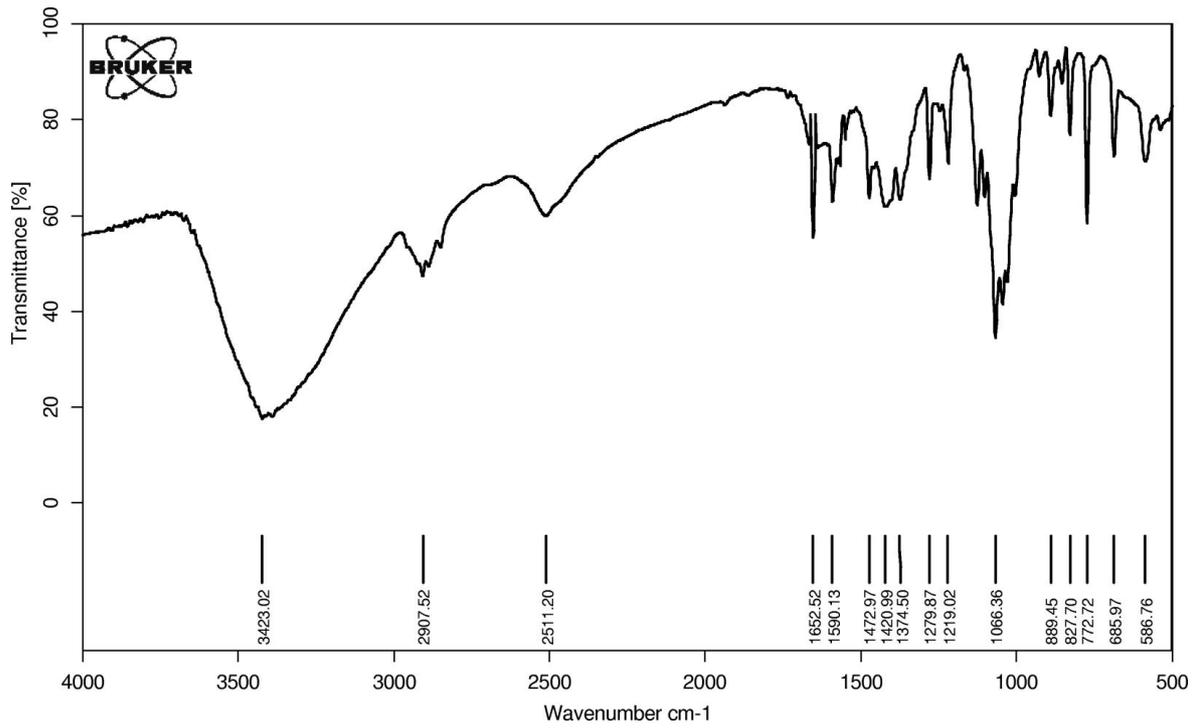
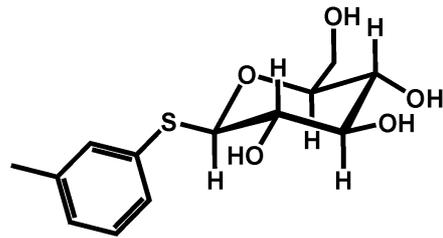
Spektren von 4-Tolyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 70

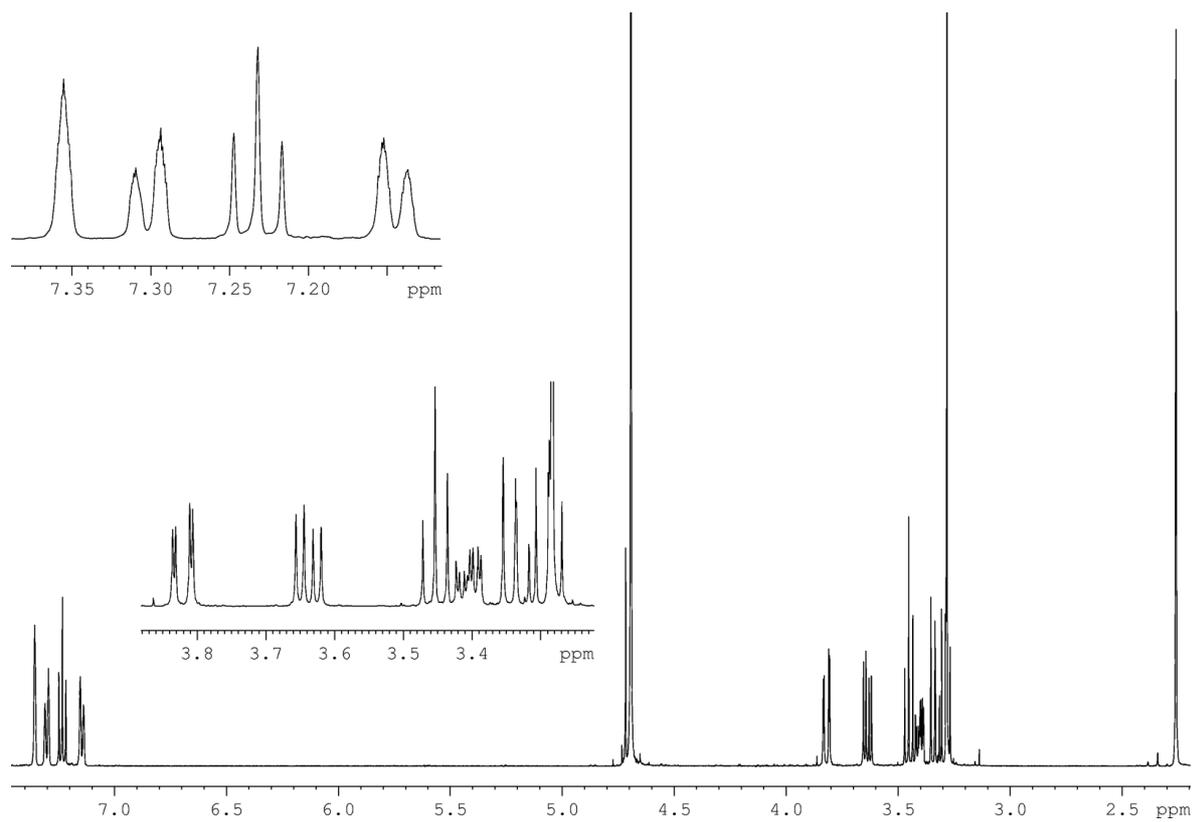
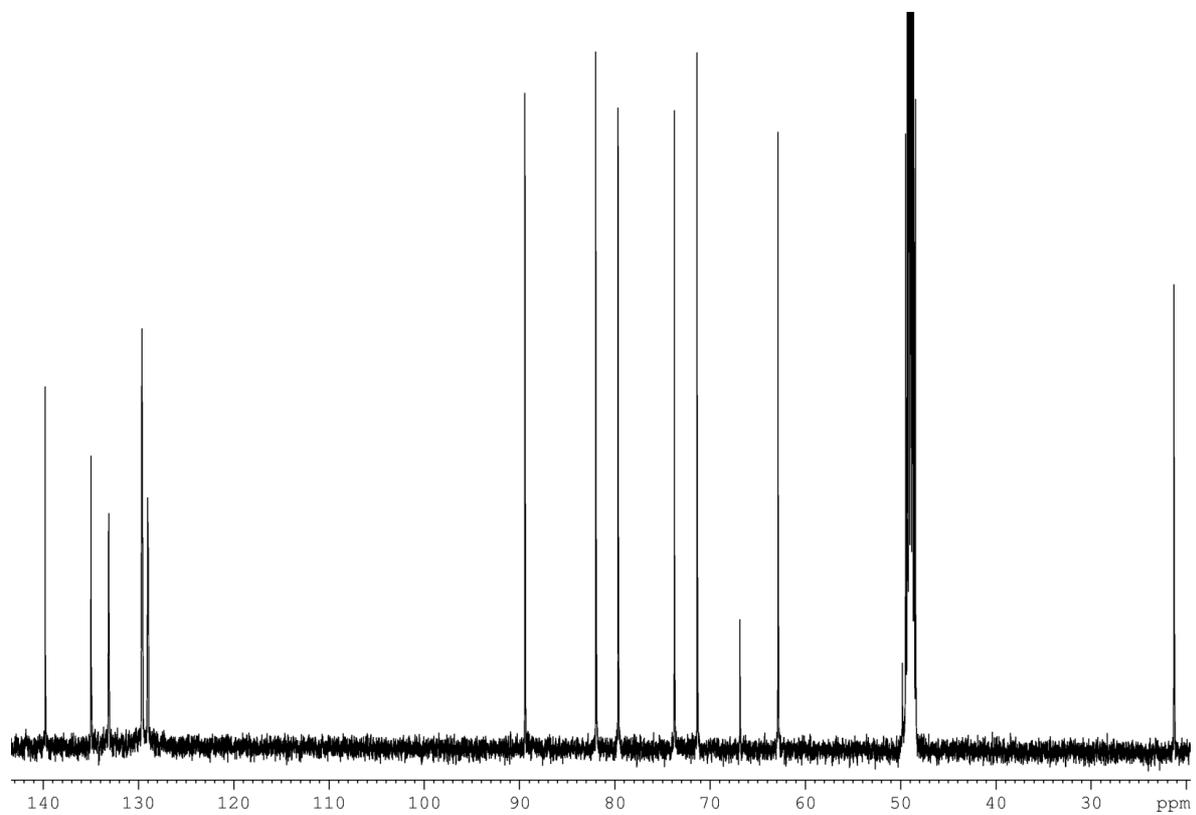
IR-Spektrum

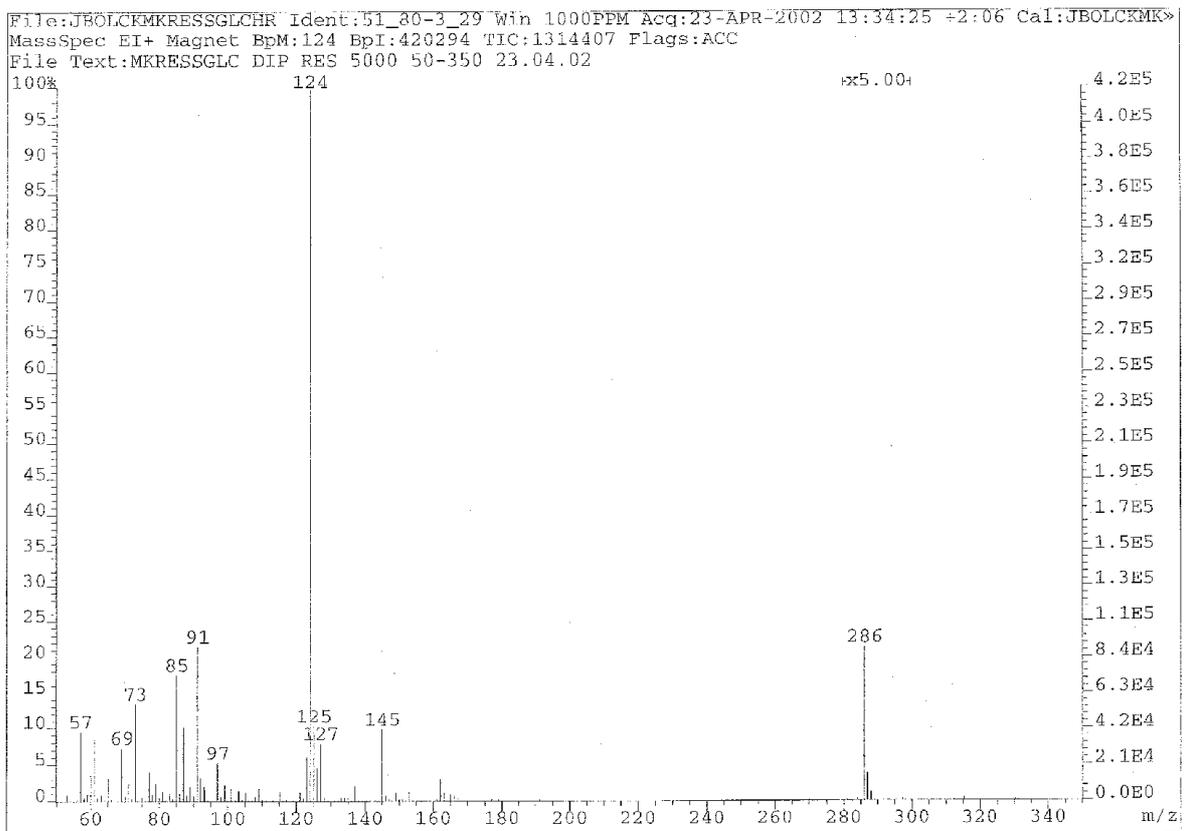
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum



MS-Spektrum

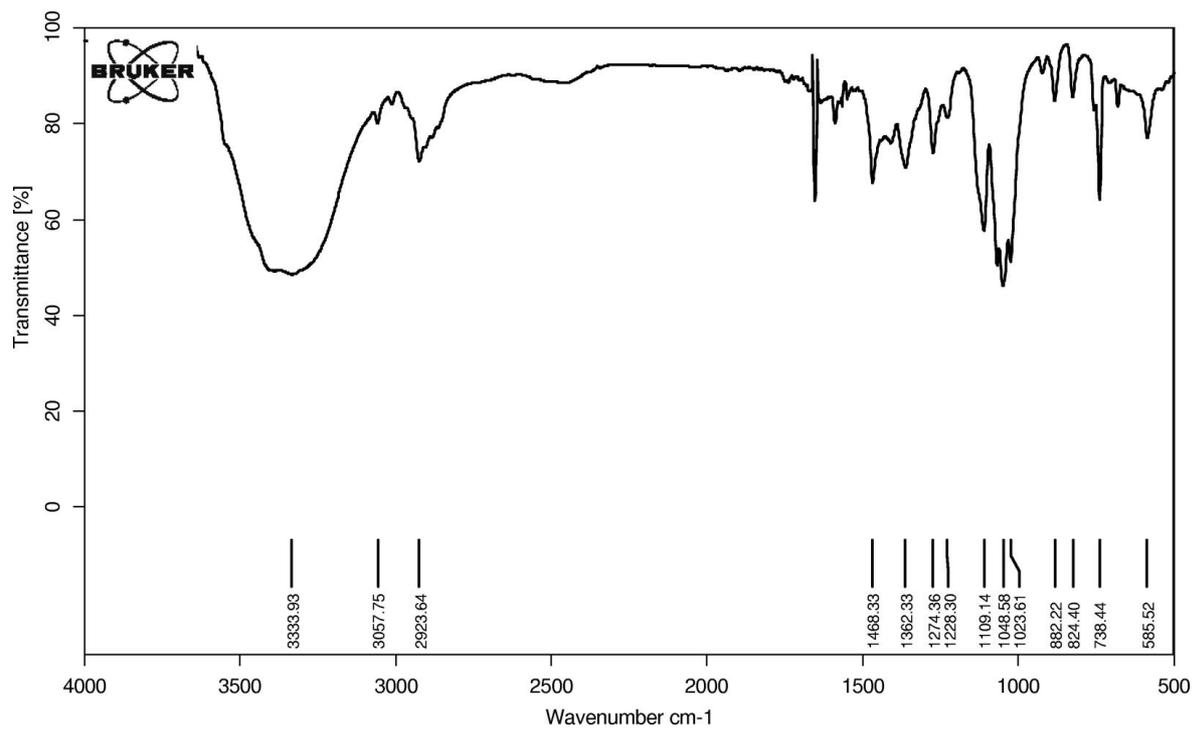
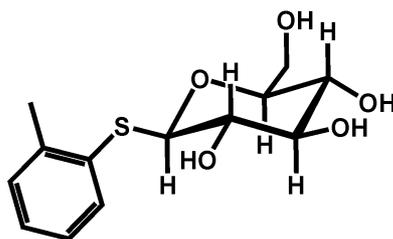
Spektren von 3-Tolyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 71

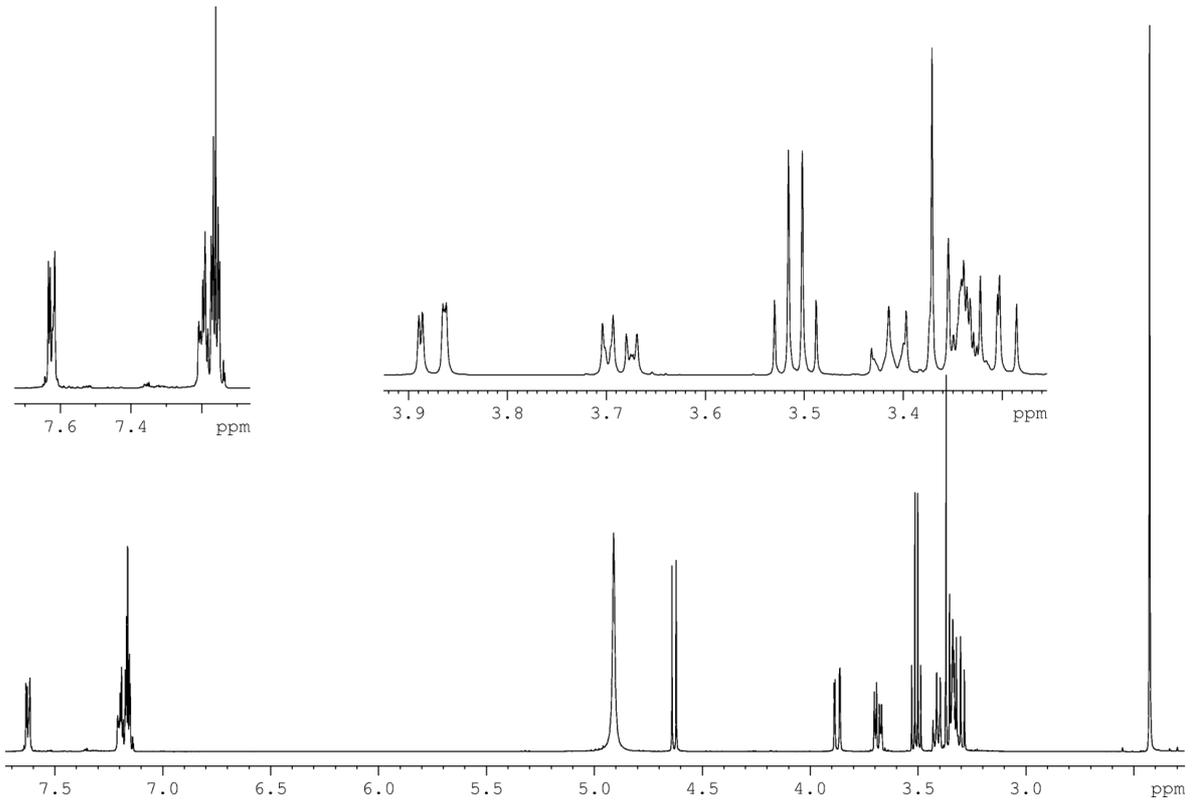
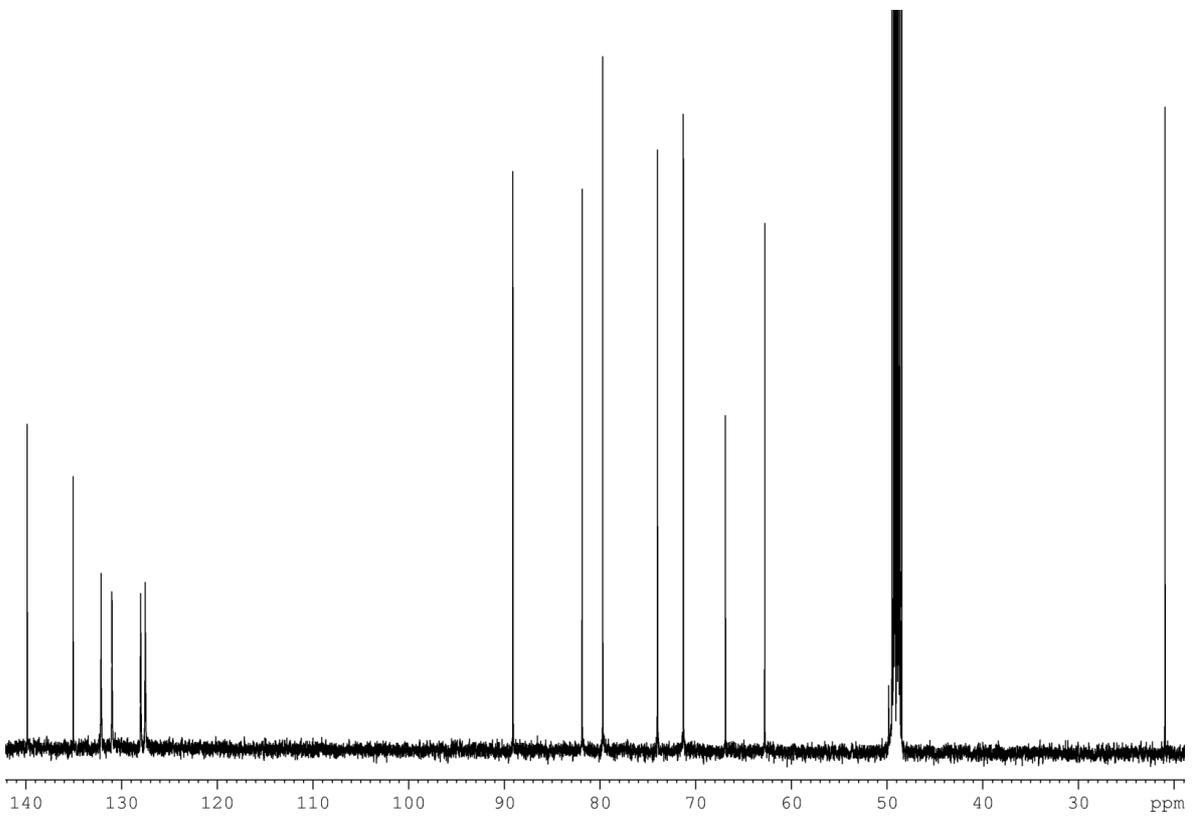
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

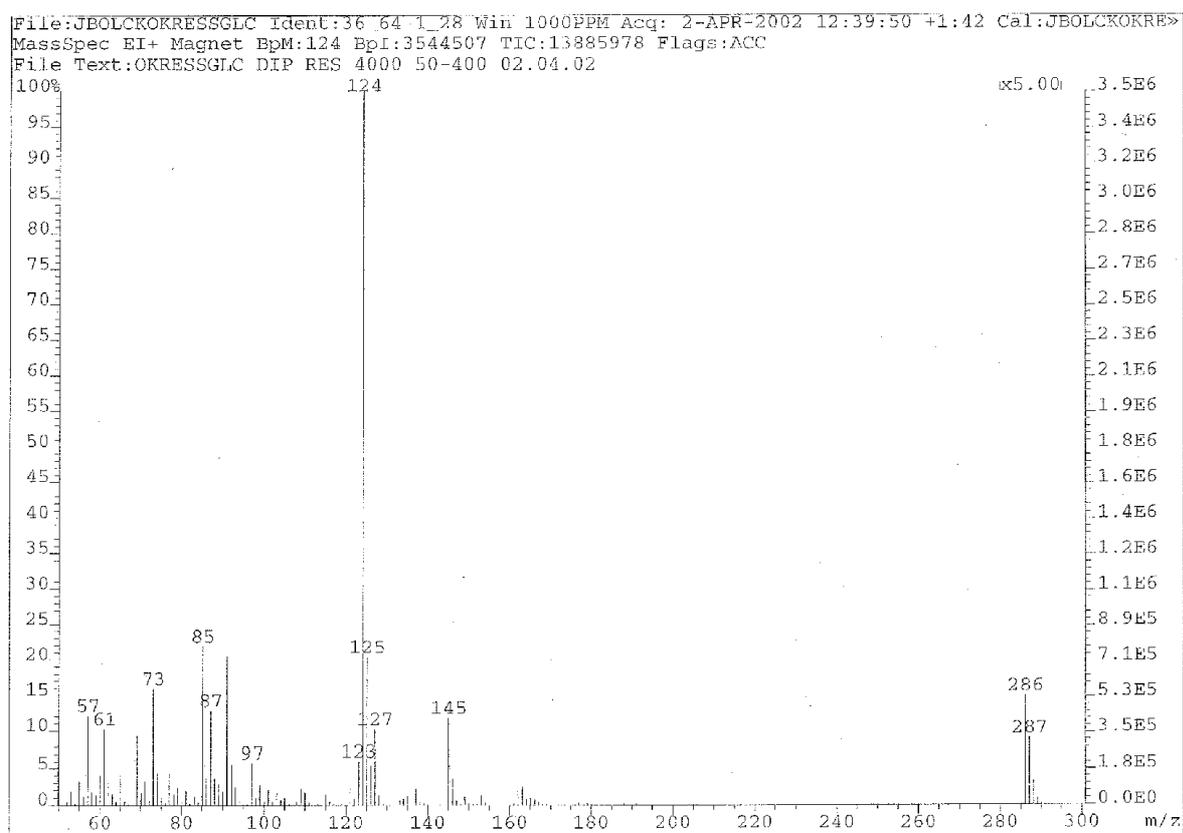


MS-Spektrum

Spektren von 2-Tolyl-1'-thio- β -D-glucoopyranosid 71

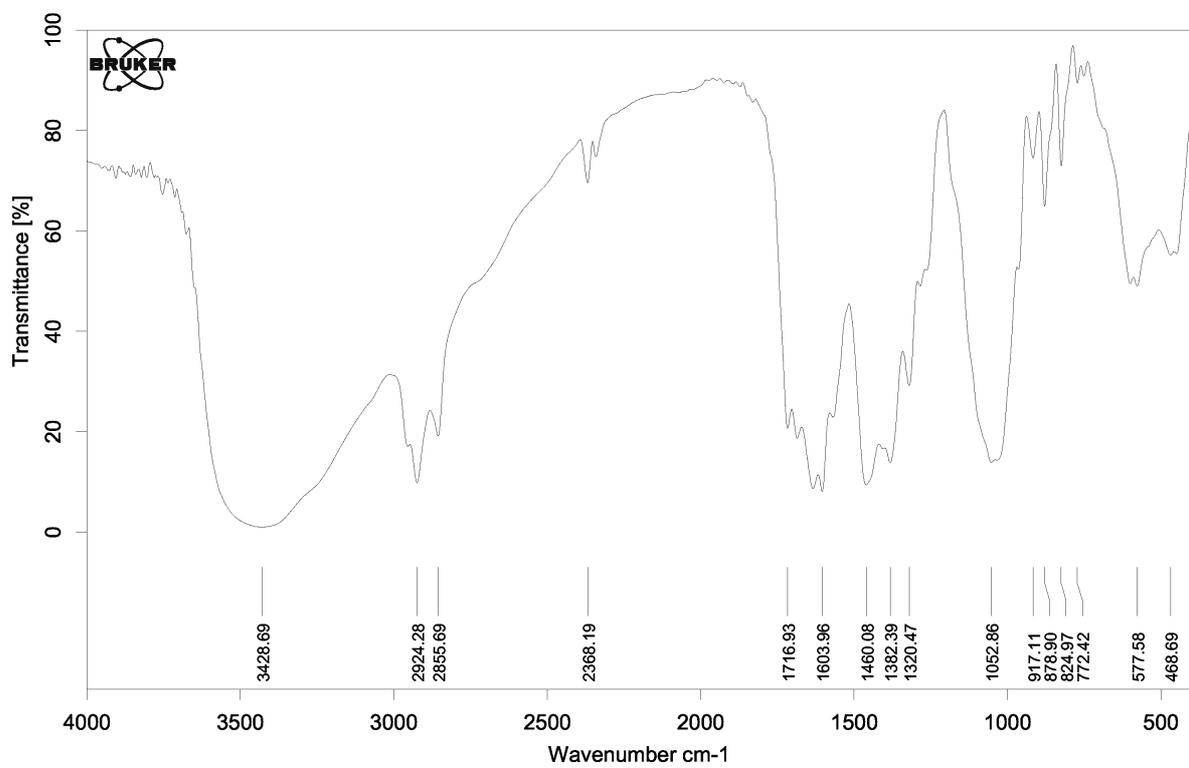
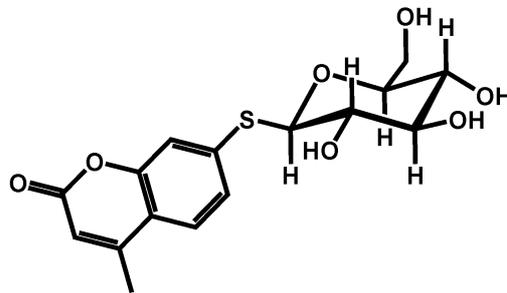


 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

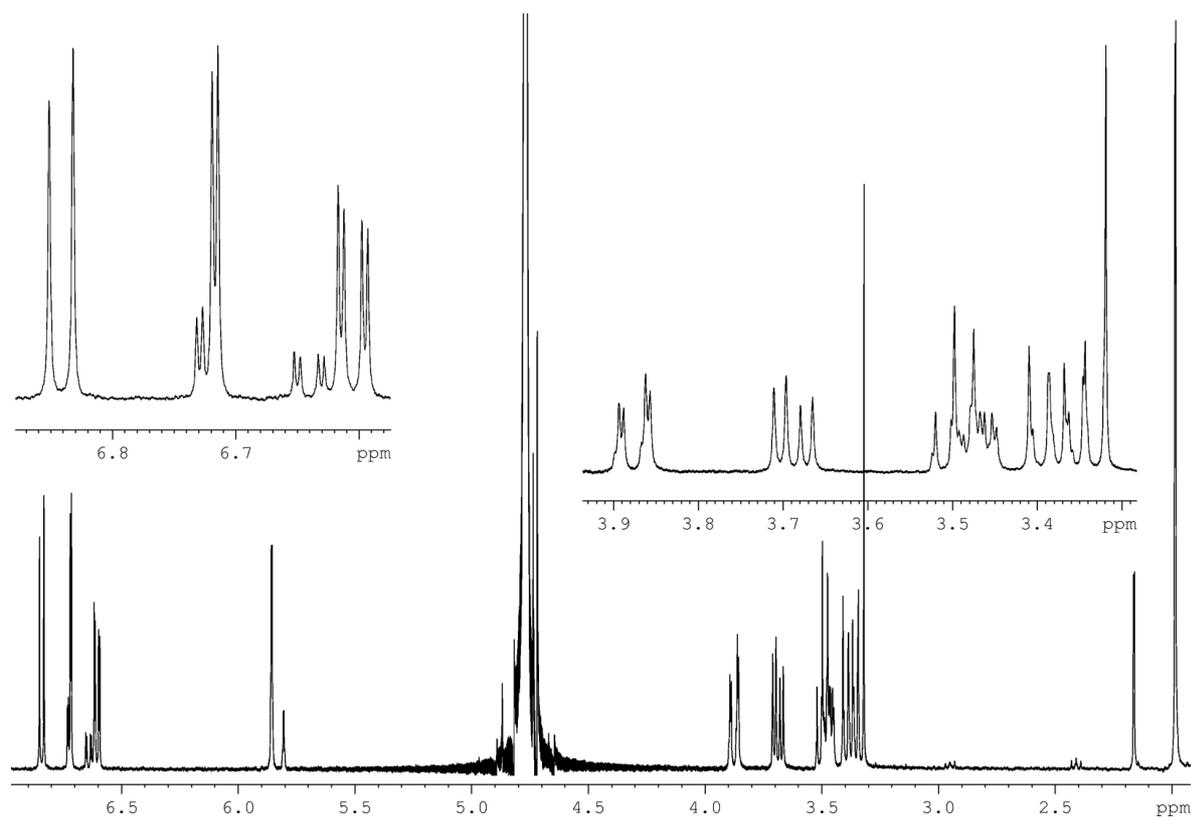
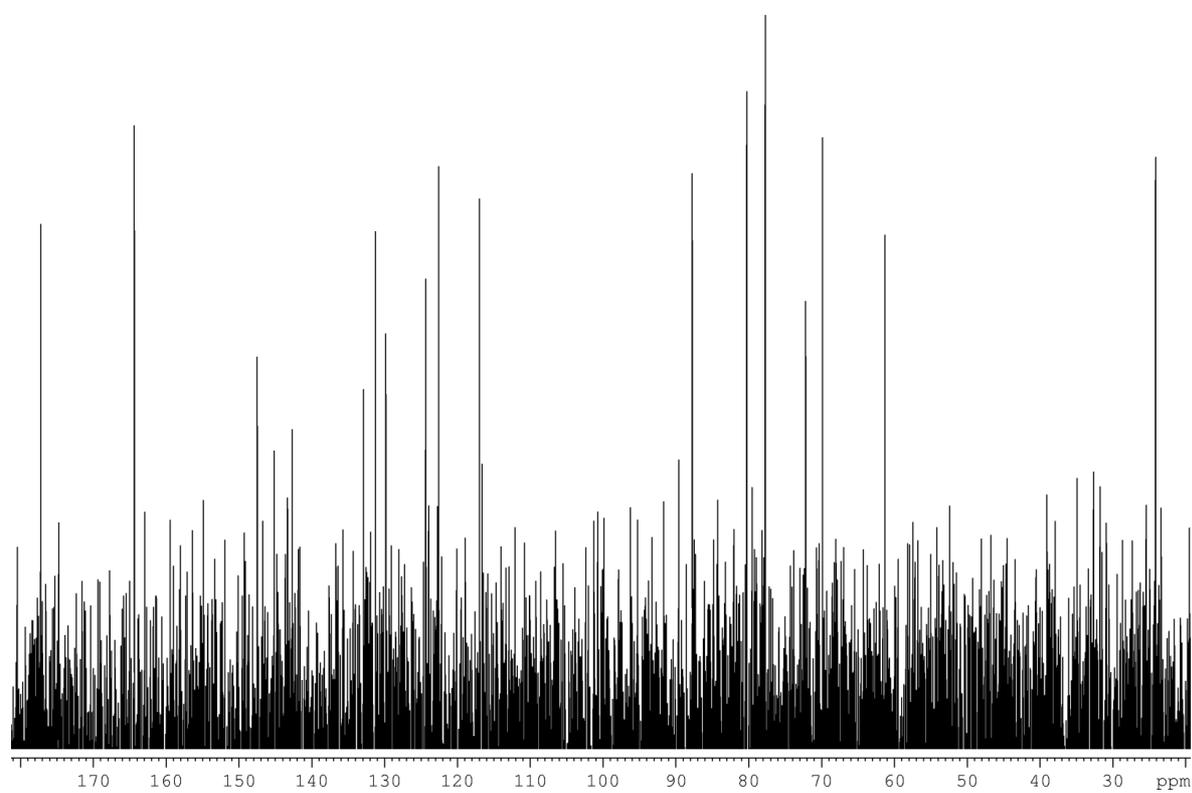


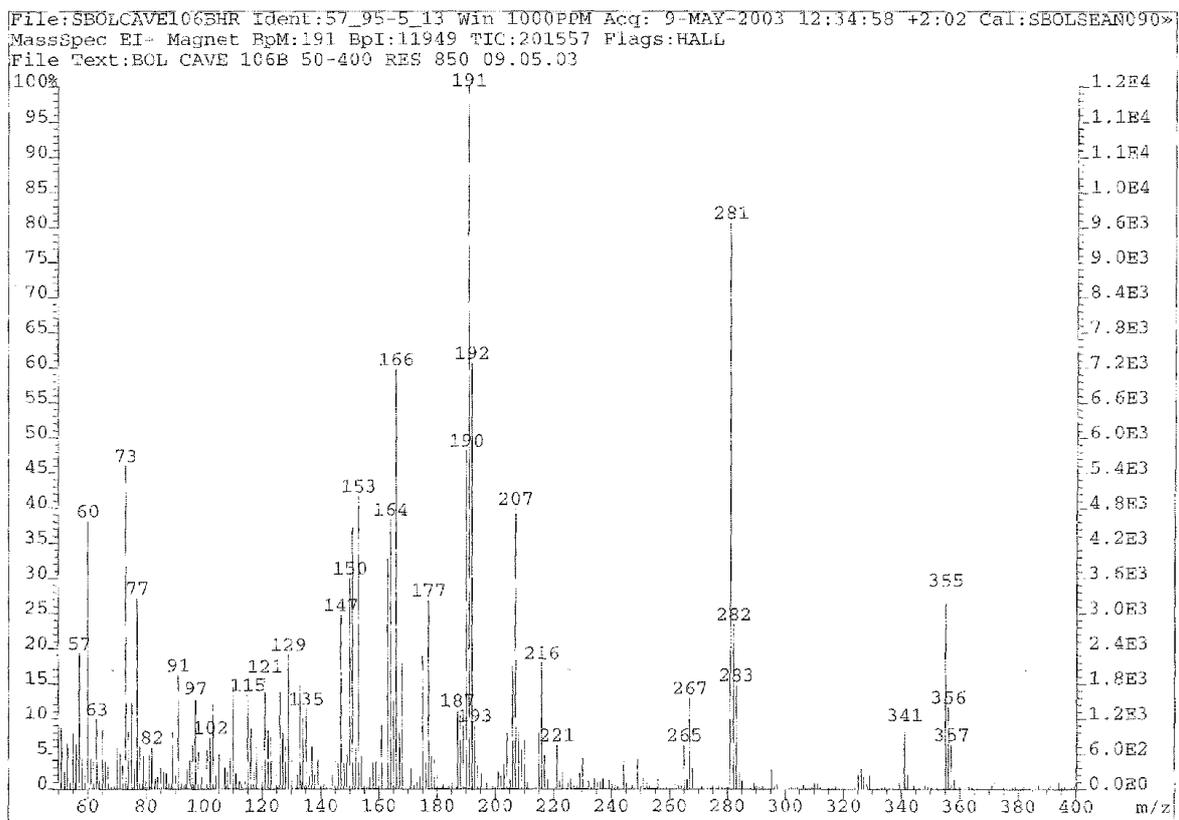
MS-Spektrum

Spektren von 4-Methyl-2-Oxo-2H-chromen-7-yl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 76



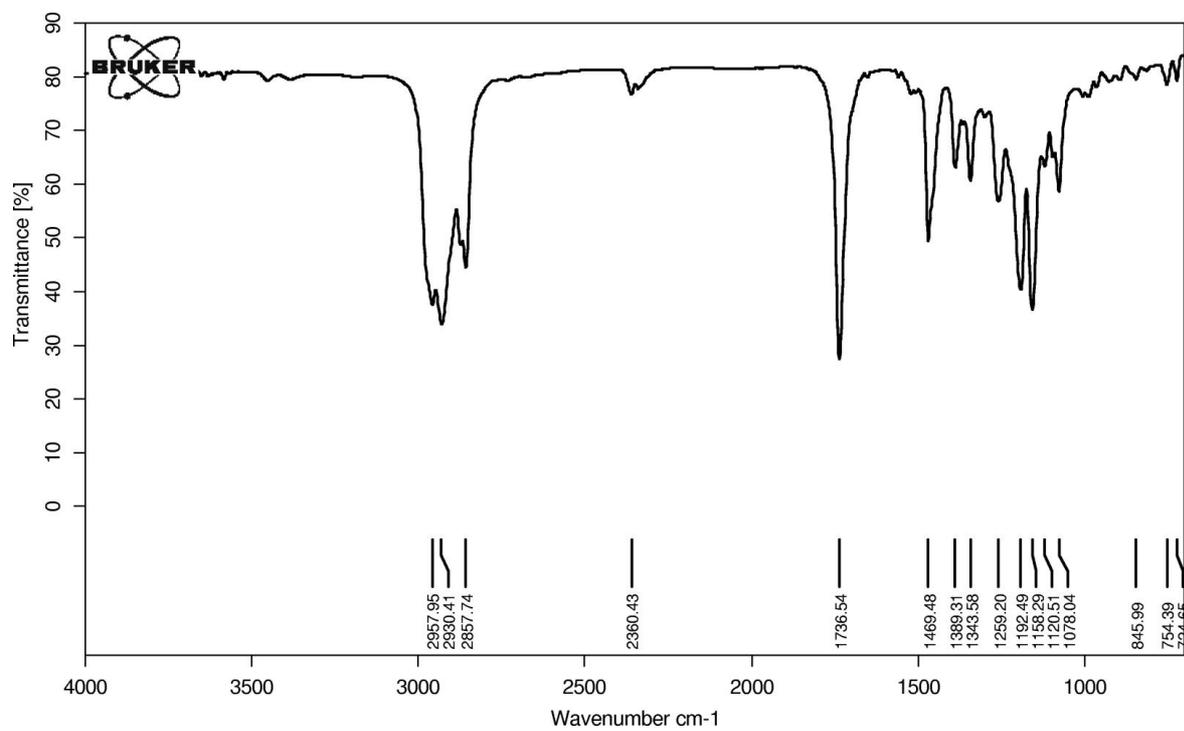
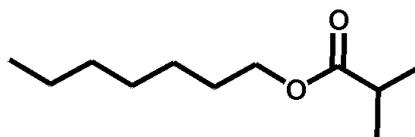
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

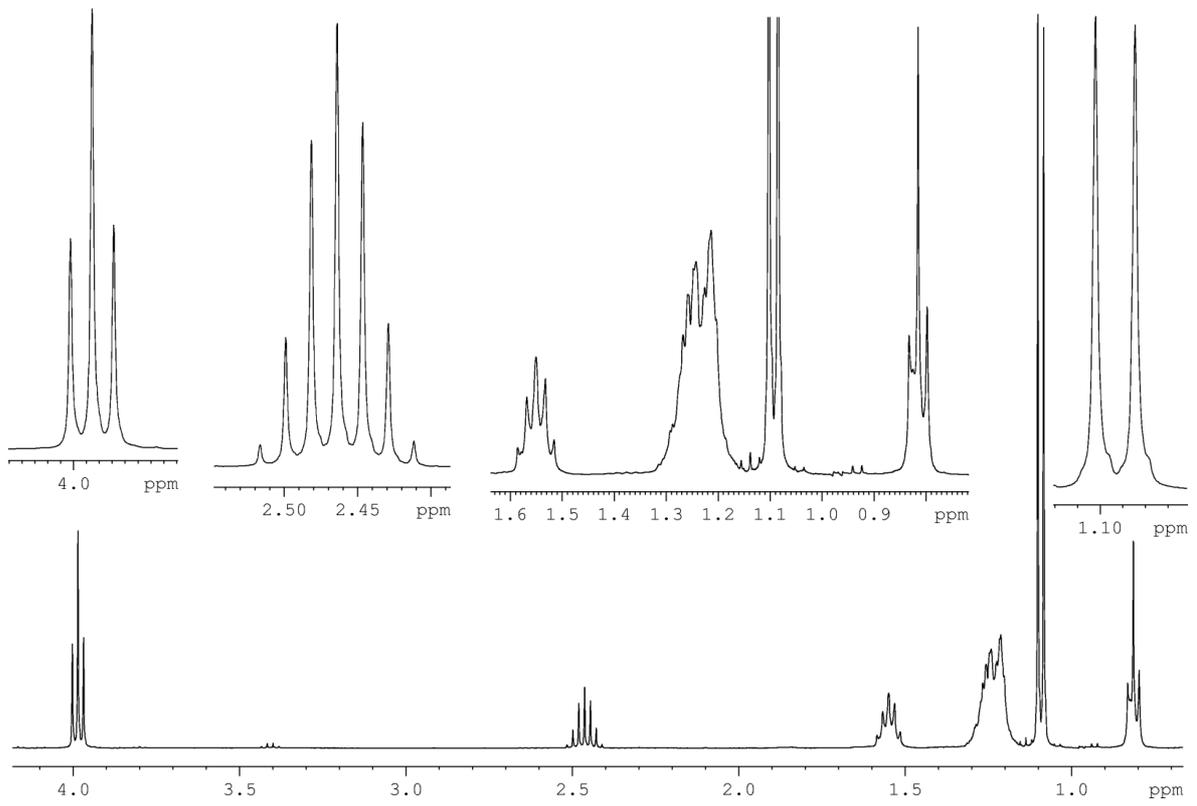
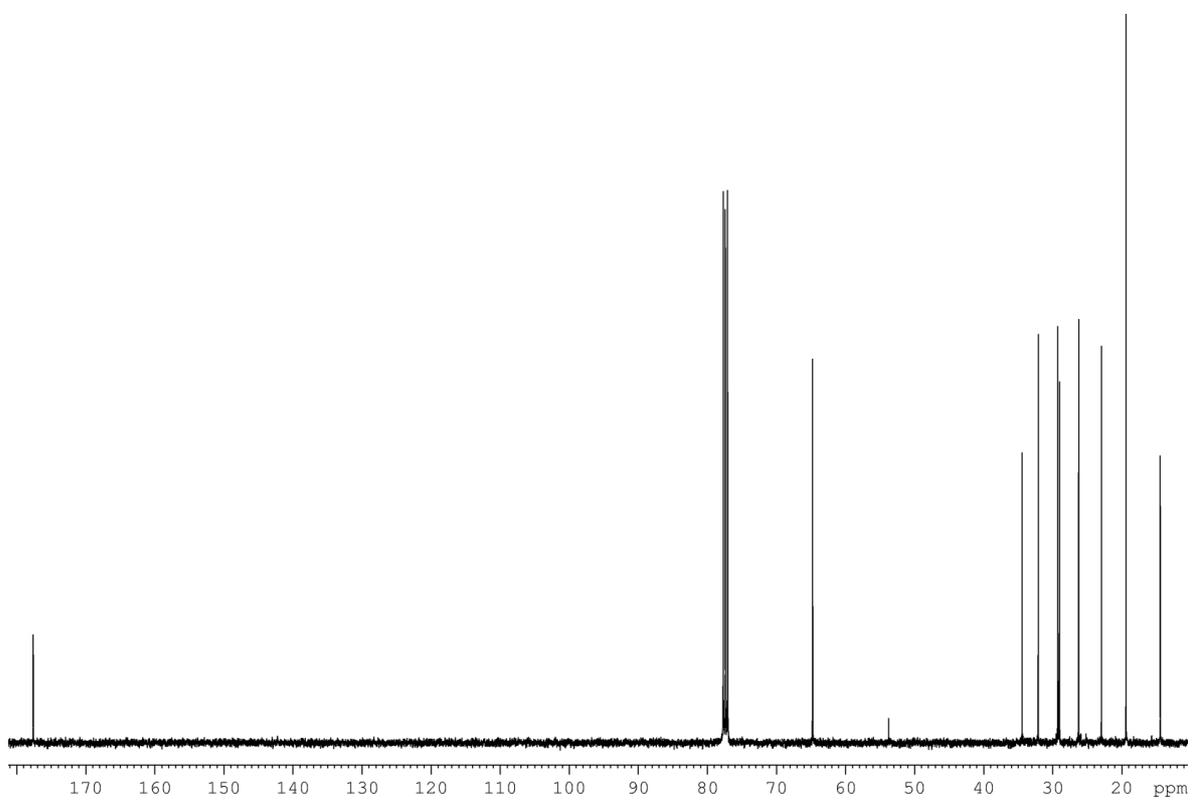


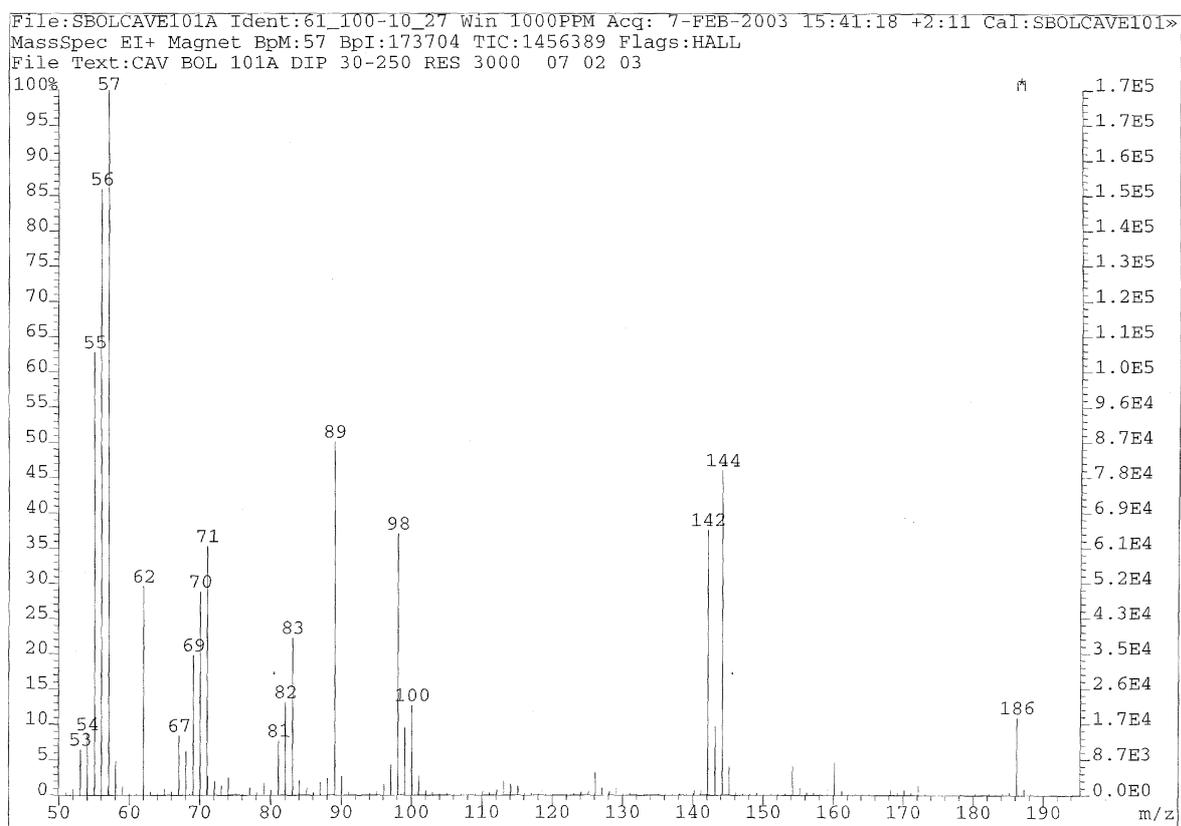
MS-Spektrum

Spektren von Heptylisobutyrat 82



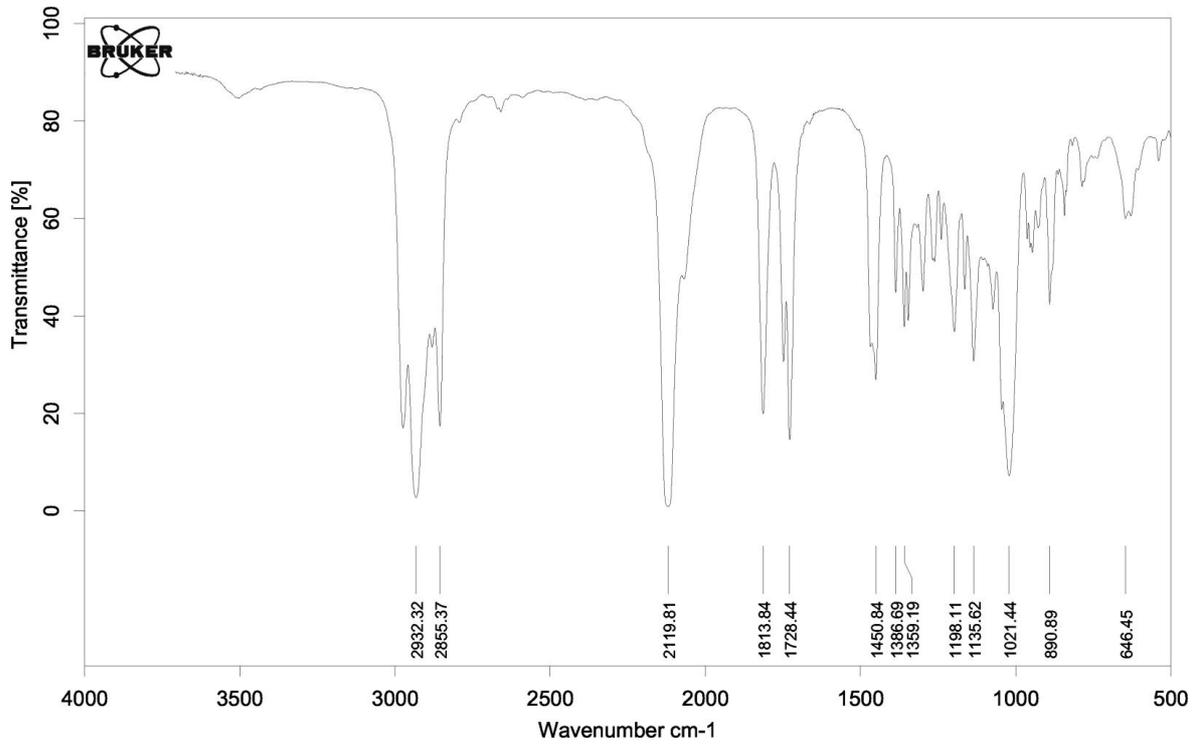
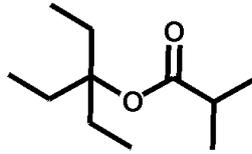
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

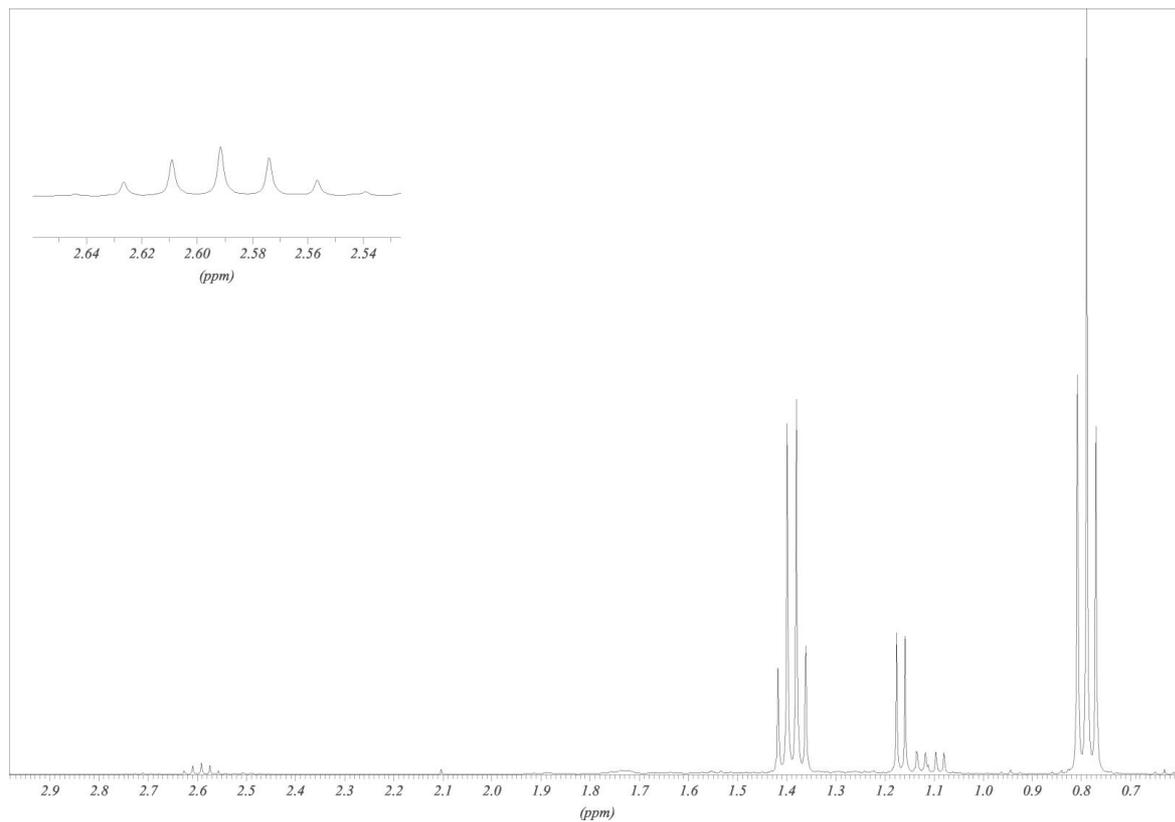
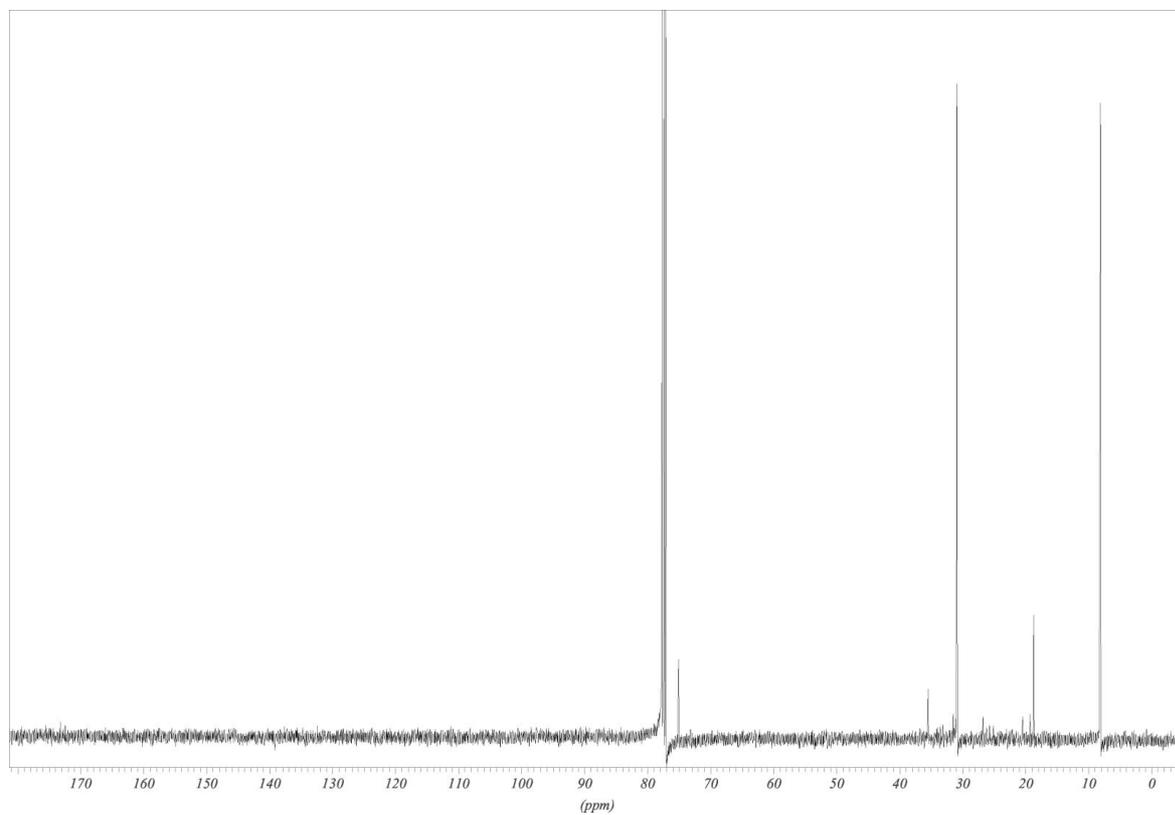


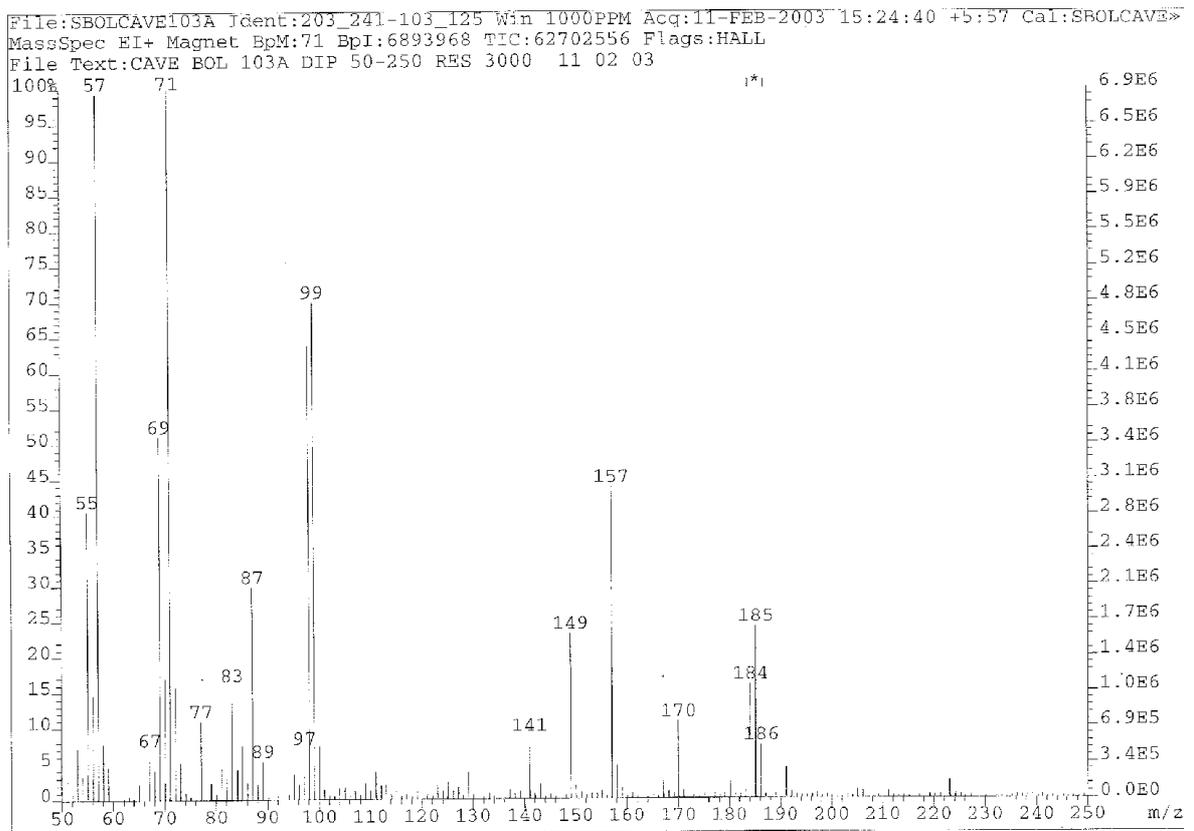
MS-Spektrum

Spektren von 3-Ethylpentan-3-yl-isobutyrat 84



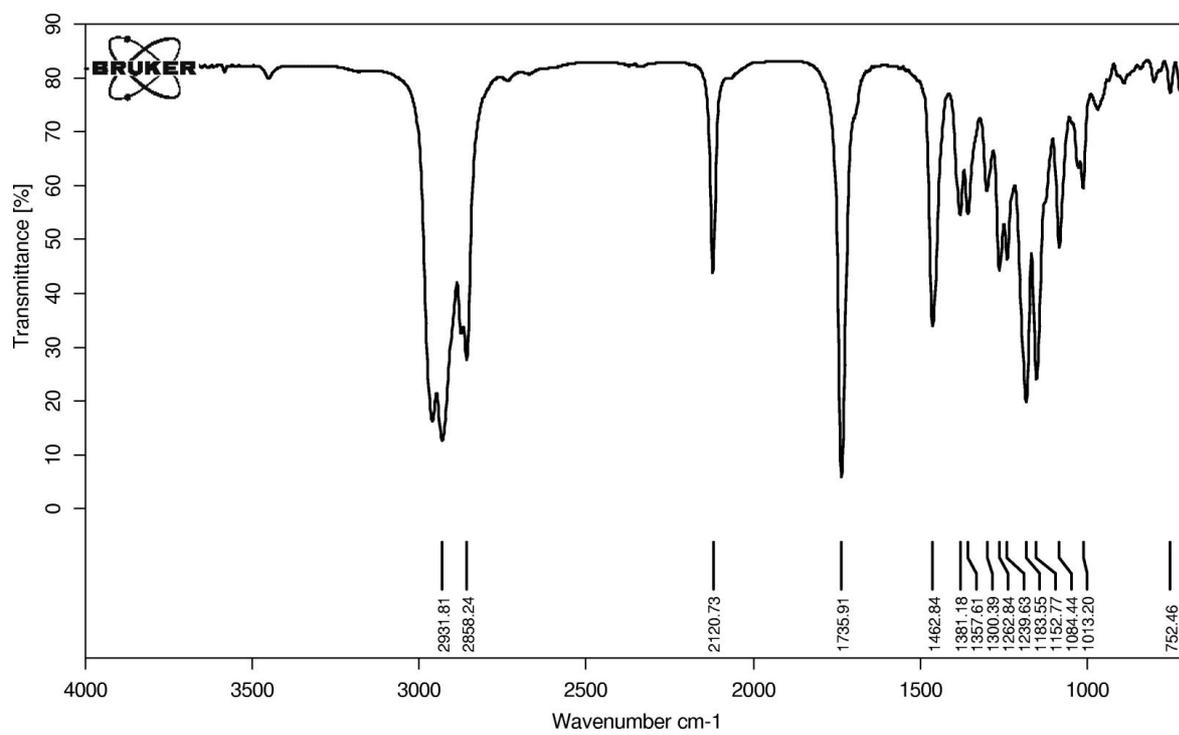
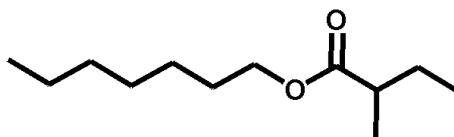
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

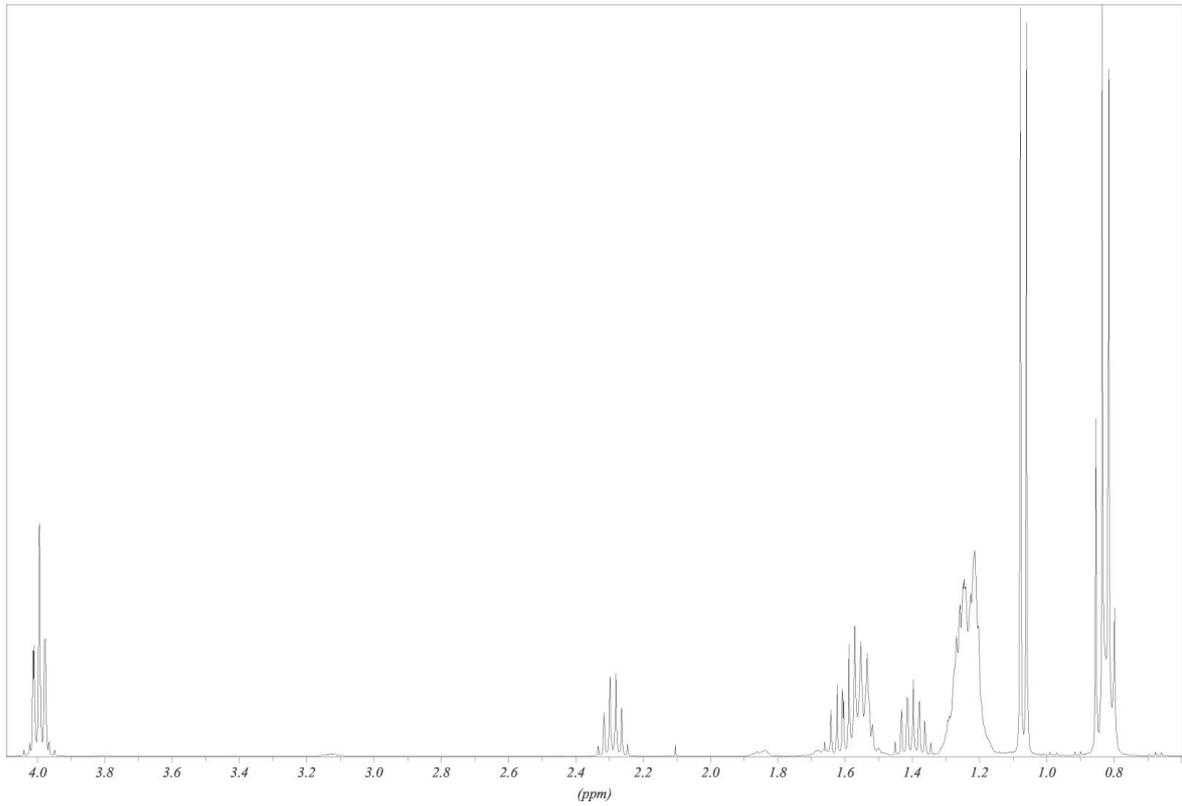
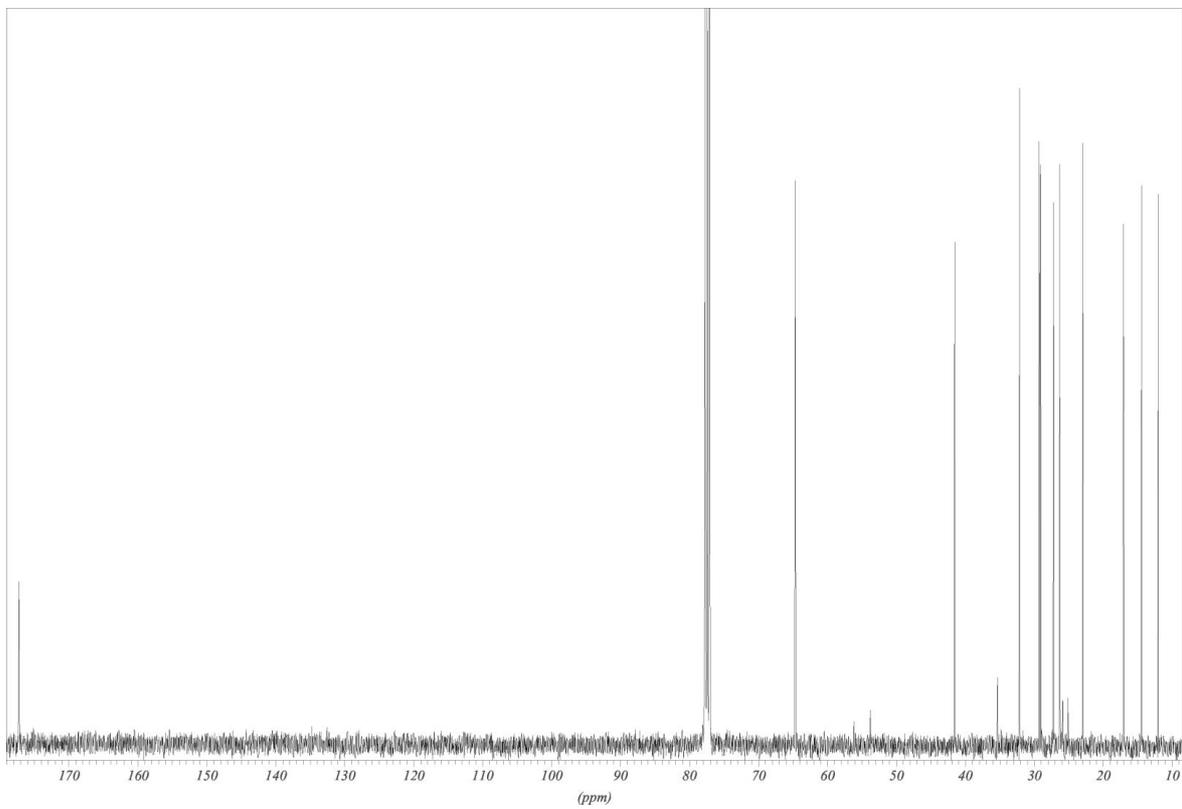


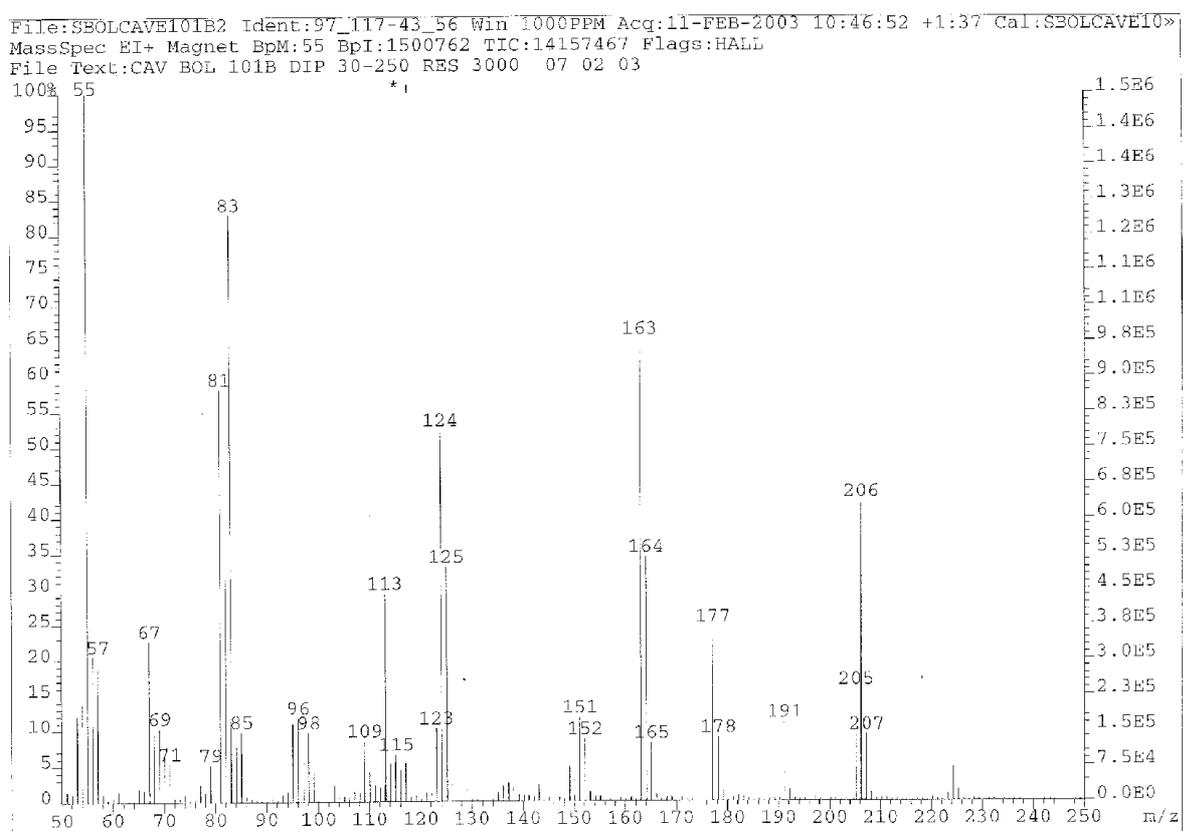
MS-Spektrum

Spektren von Heptyl-2-methylbutanoat 85



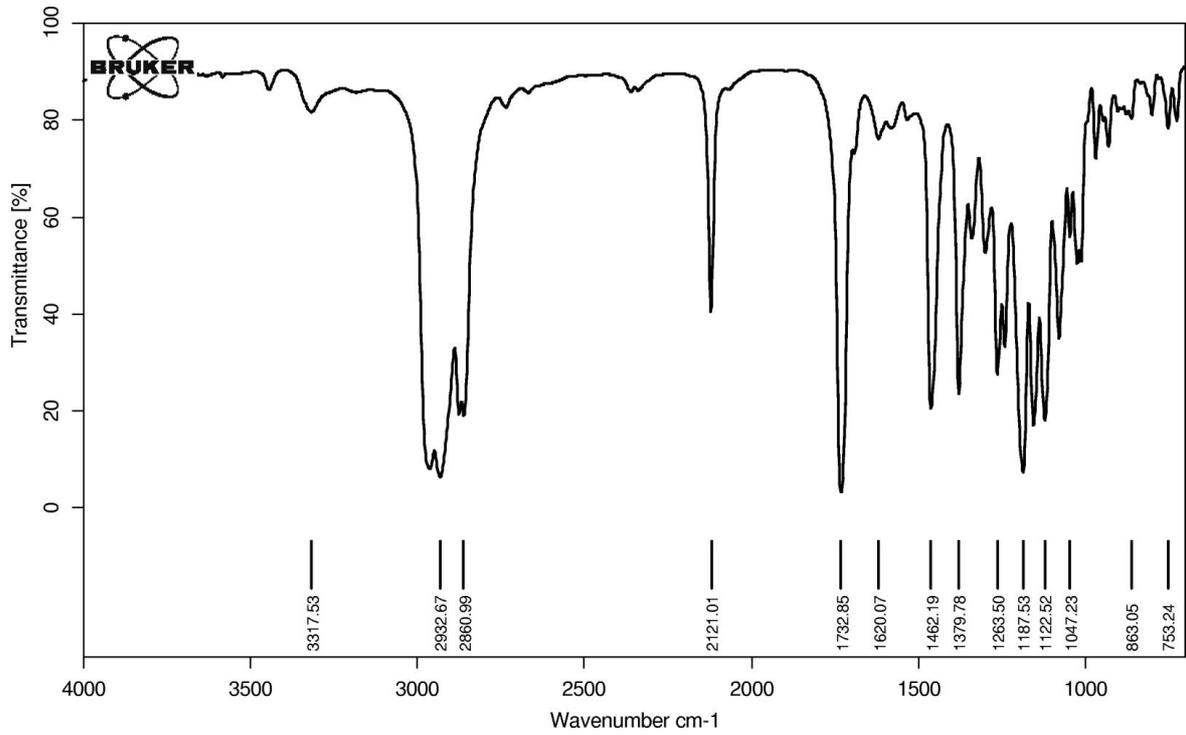
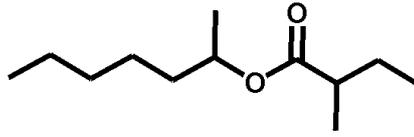
IR-Spektrum

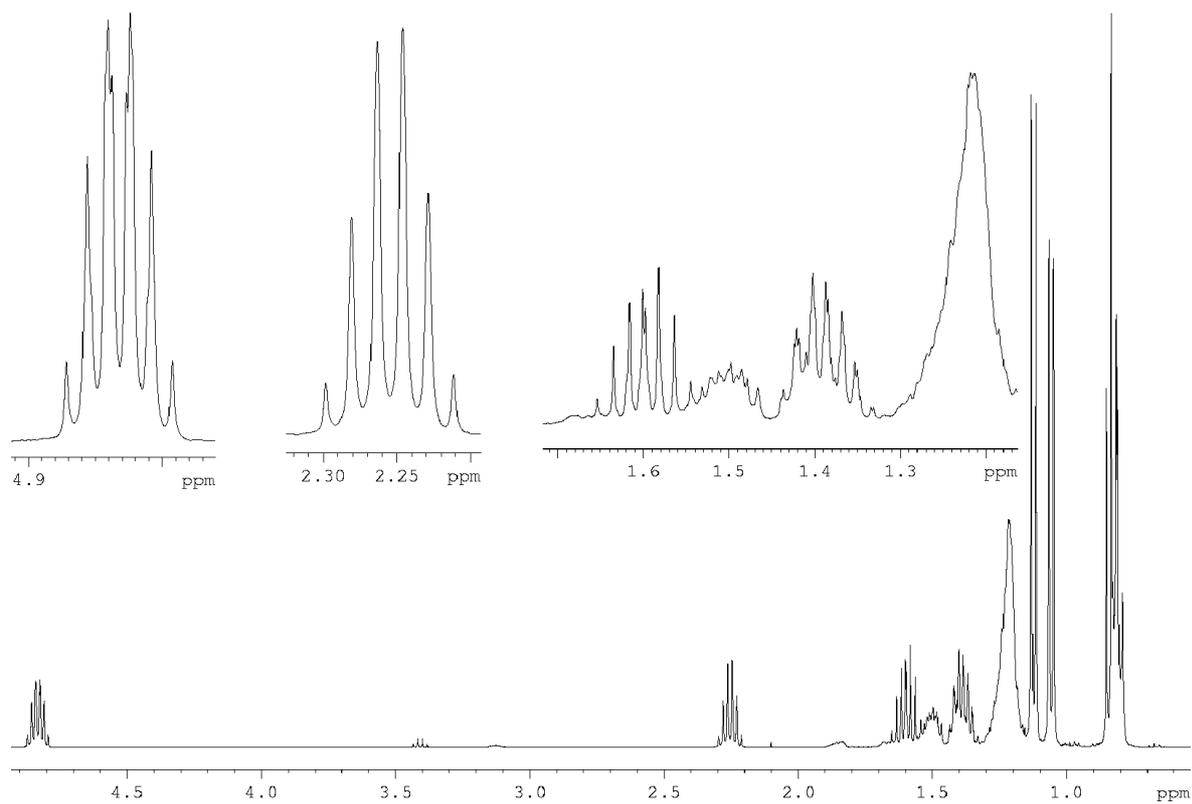
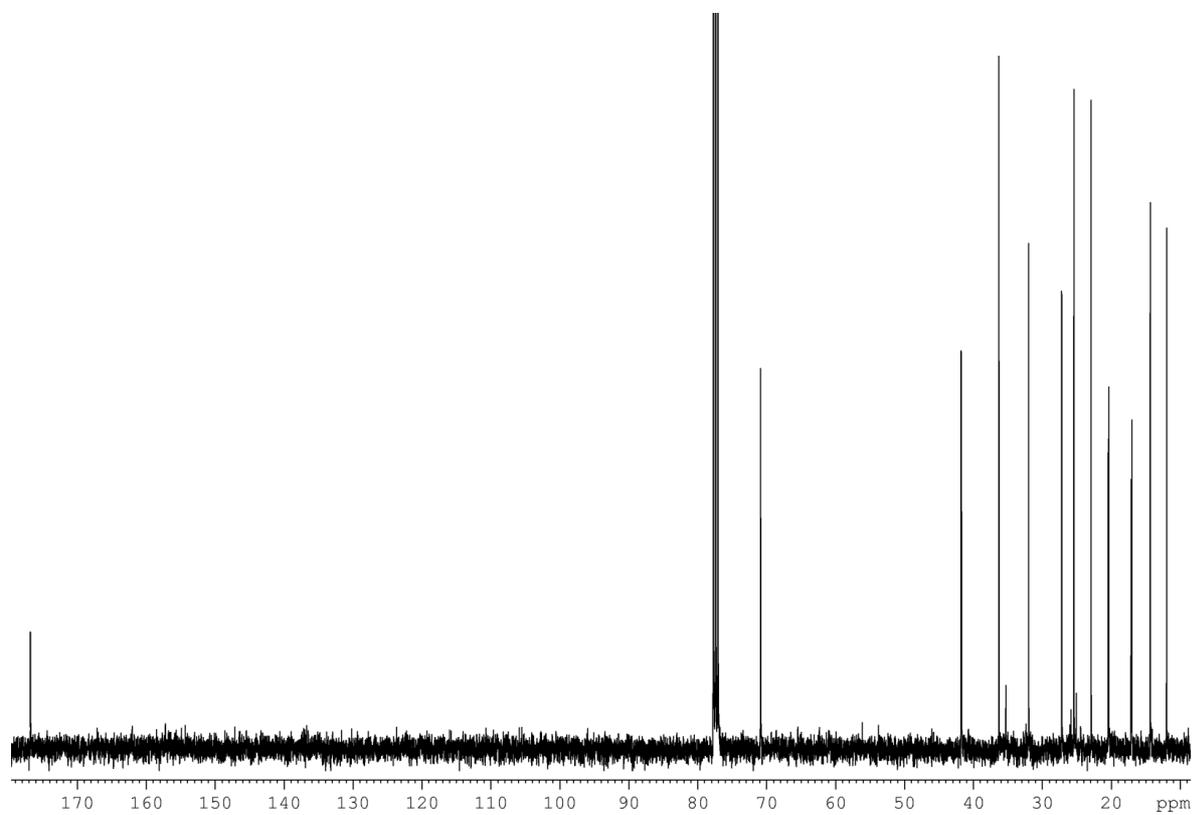
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum



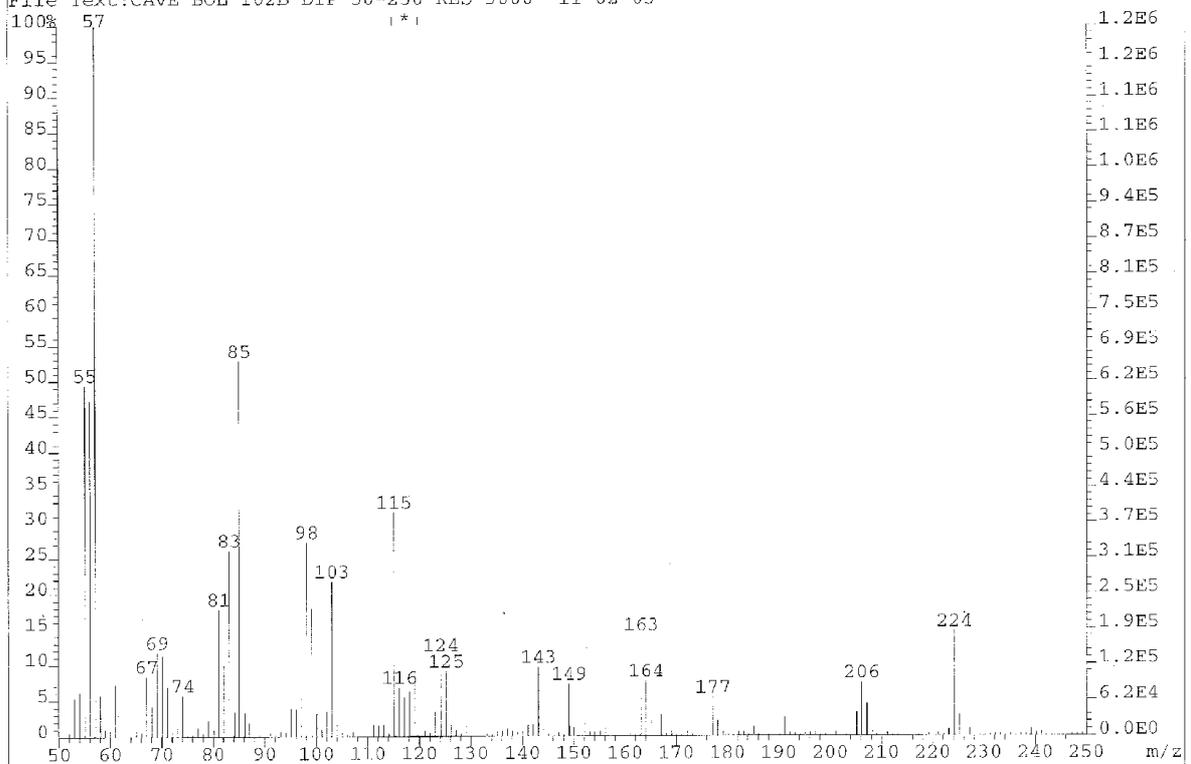
MS-Spektrum

Spektren von Heptan-2-yl-2-methylbutanoat 86



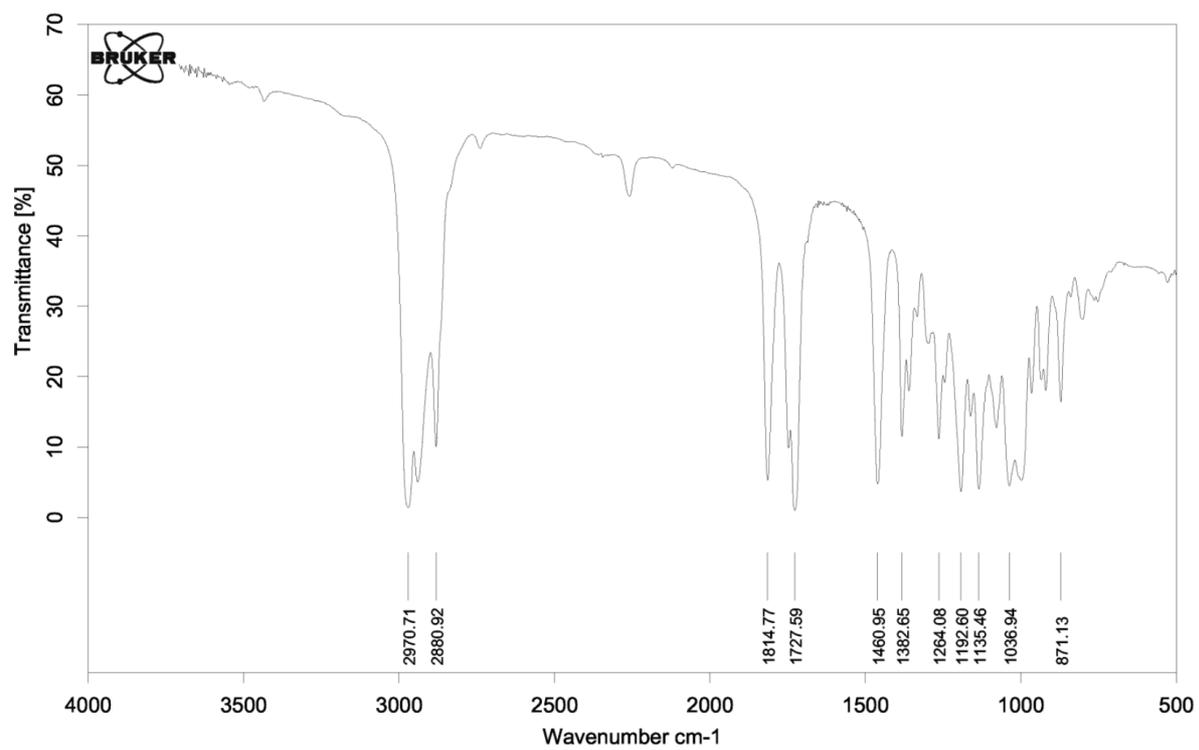
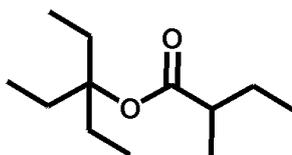
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

File:SBOLCAVE102B2 Ident:82_186-33_43 Win 1000PPM Acq:11-FEB-2003 11:11:20 +2:01 Cal:SBOLCAVE10>
MassSpec EI+ Magnet BpM:57 BpI:1248162 TIC:8511072 Flags:HALL
File Text:CAVE BOL 102B DIP 50-250 RES 3000 11 02 03

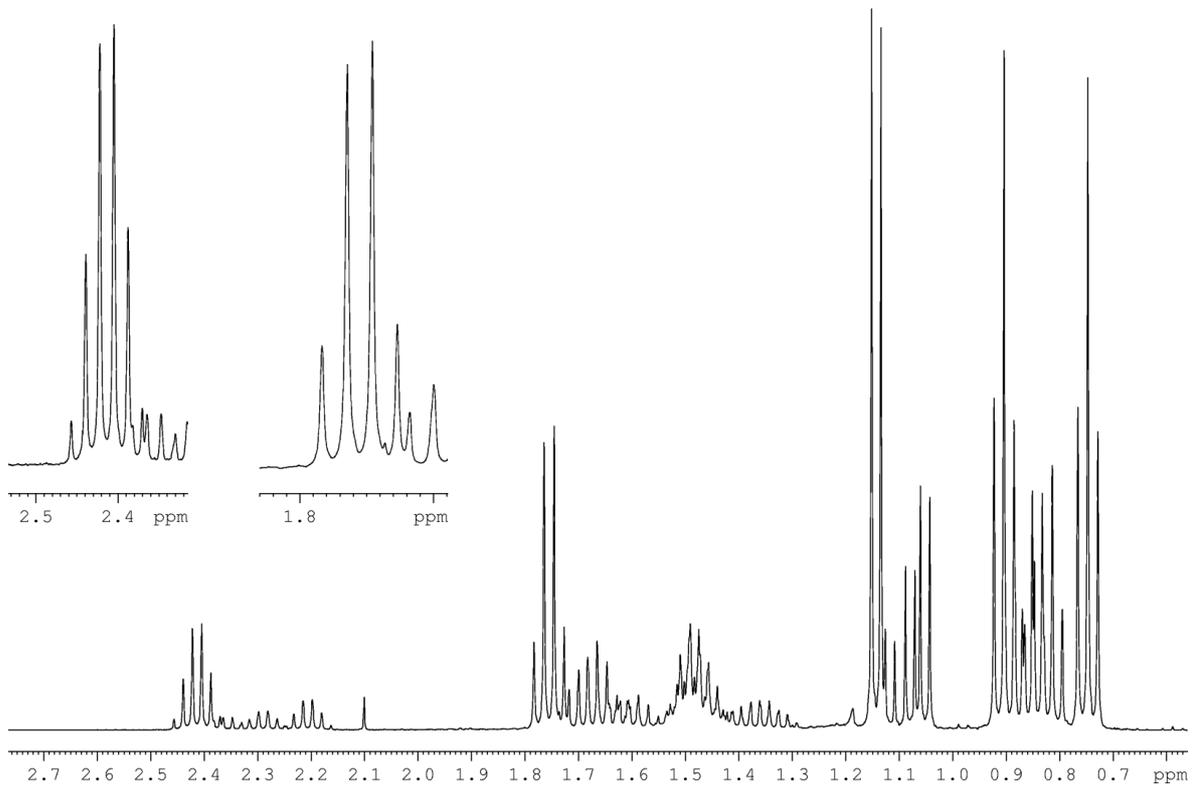
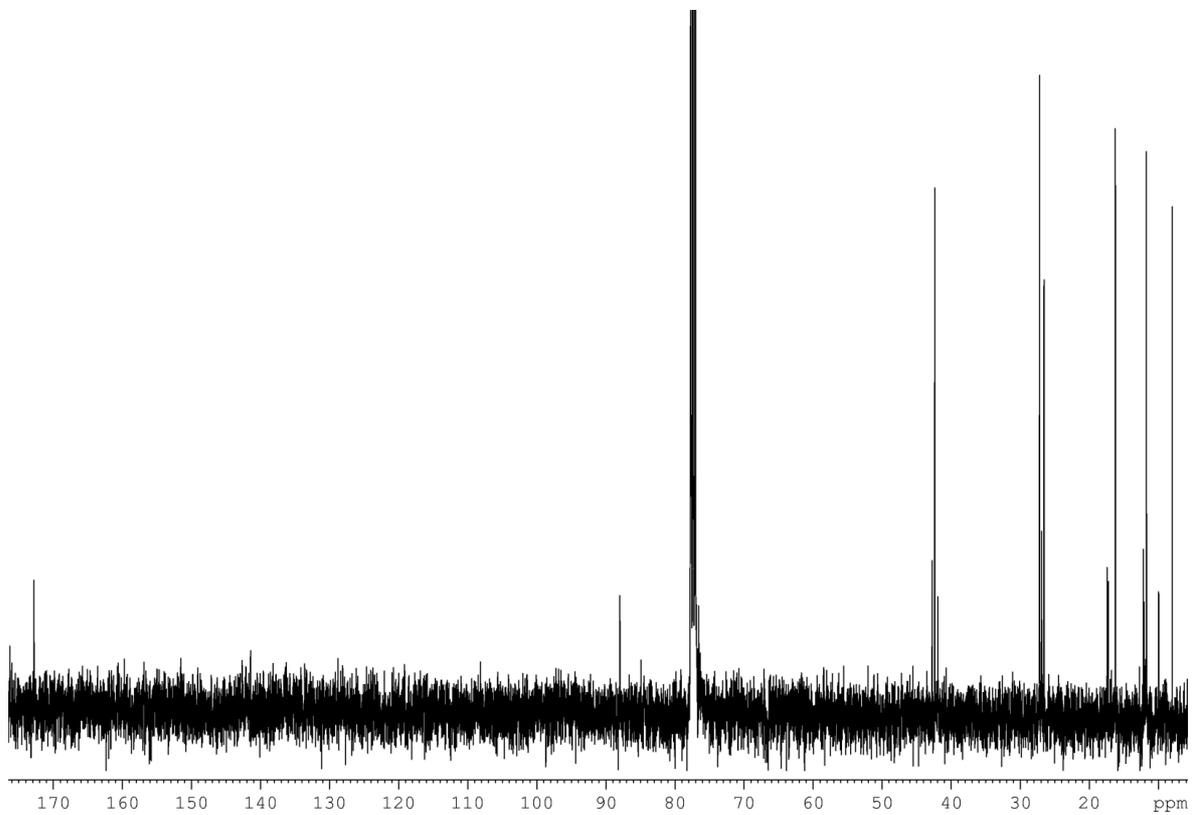


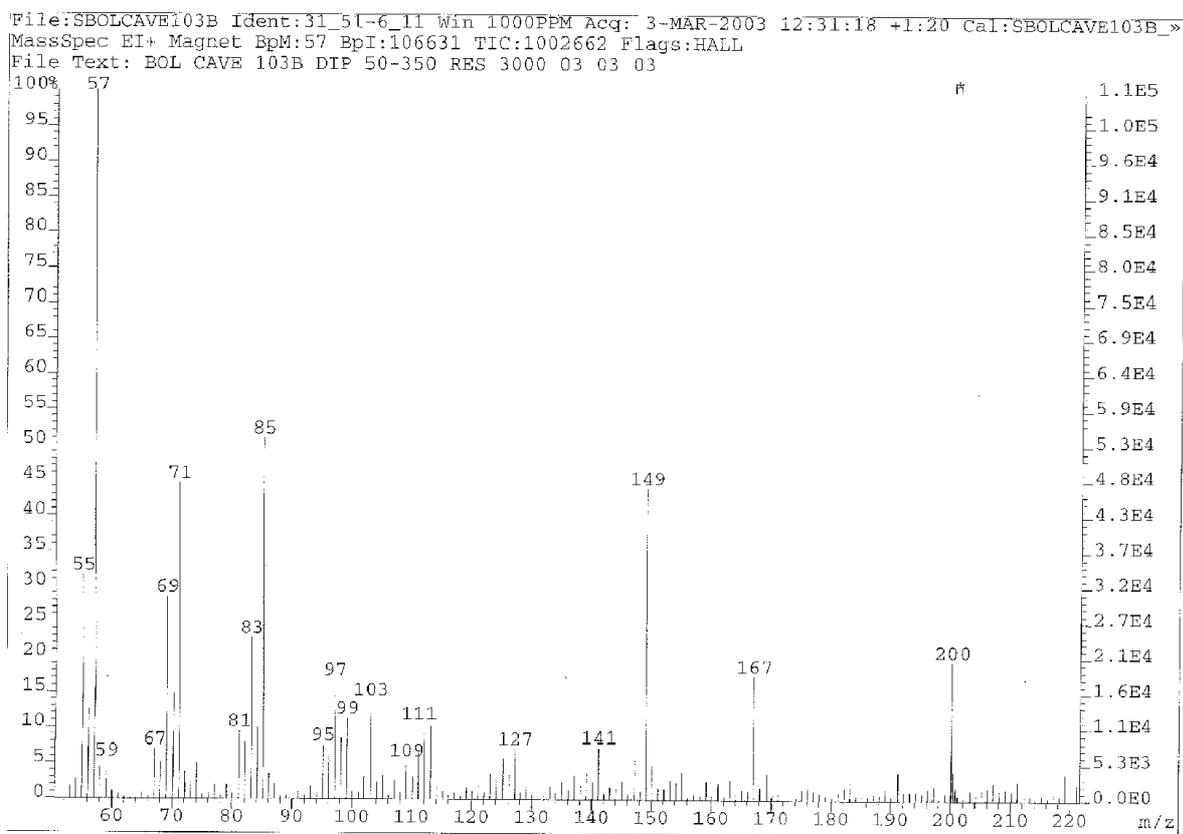
MS-Spektrum

Spektren von 3-Ethylpentan-3-yl-2-methylbutanoat 87



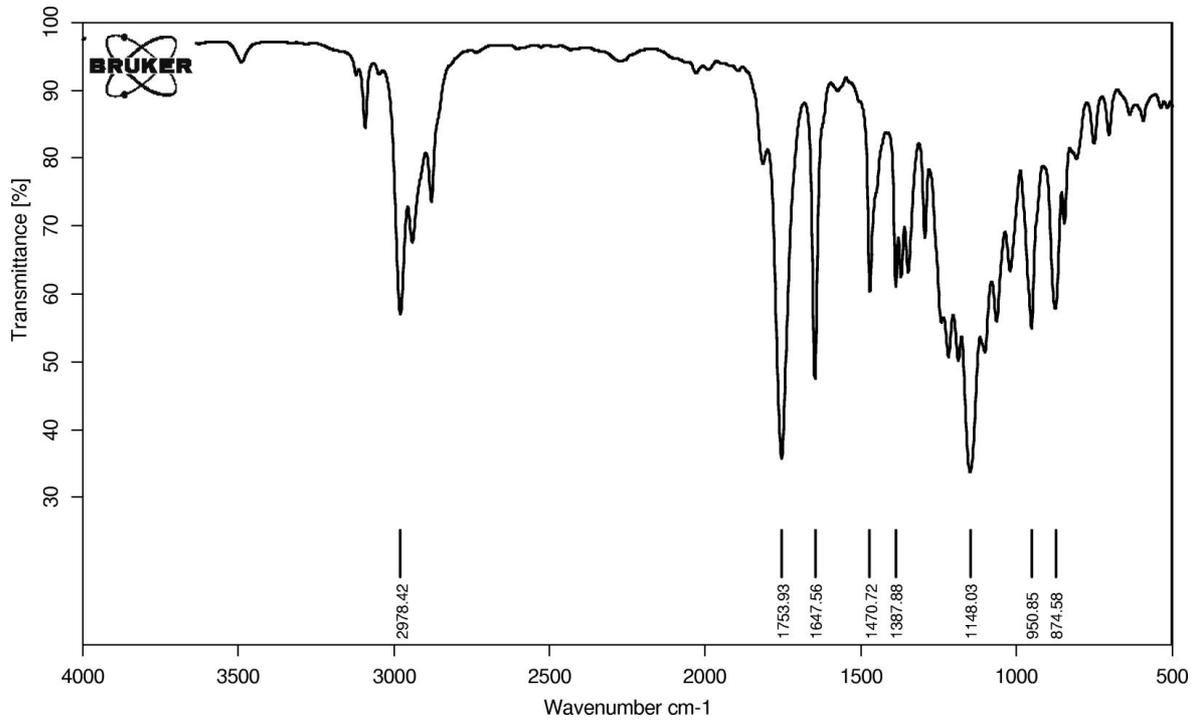
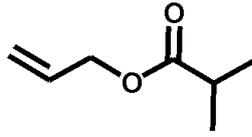
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

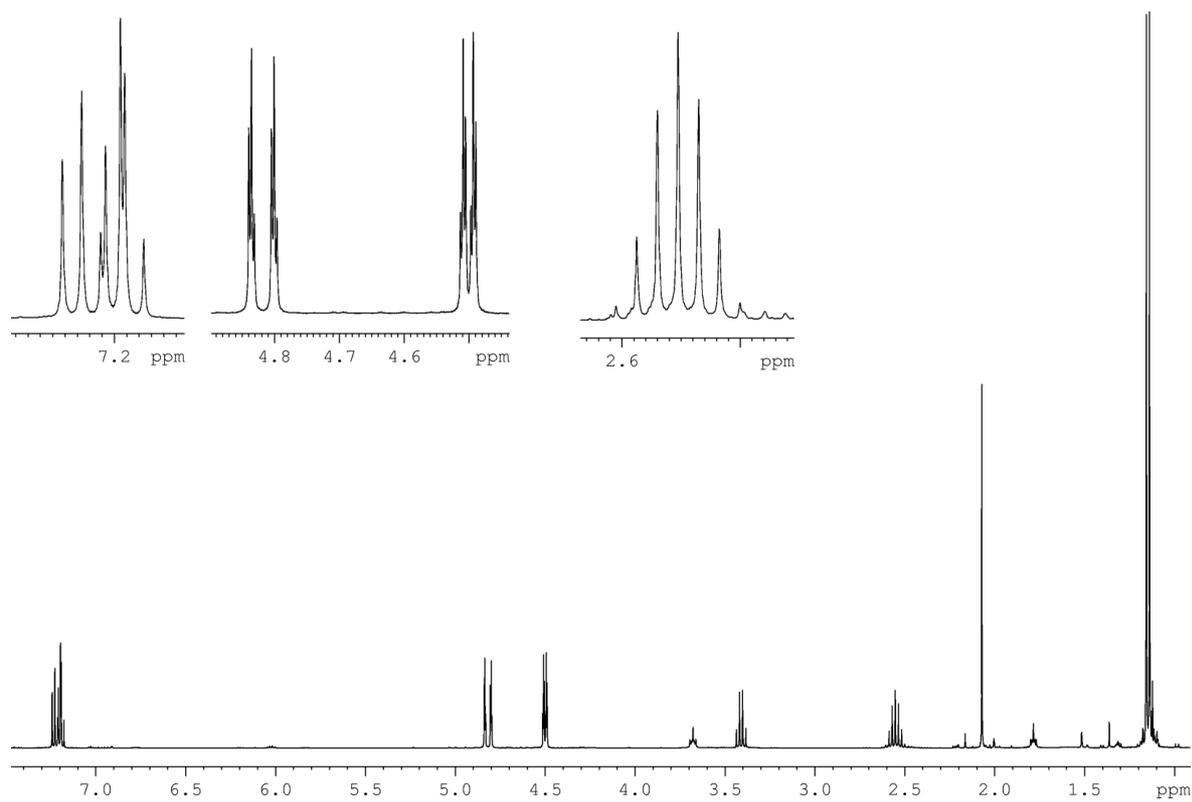
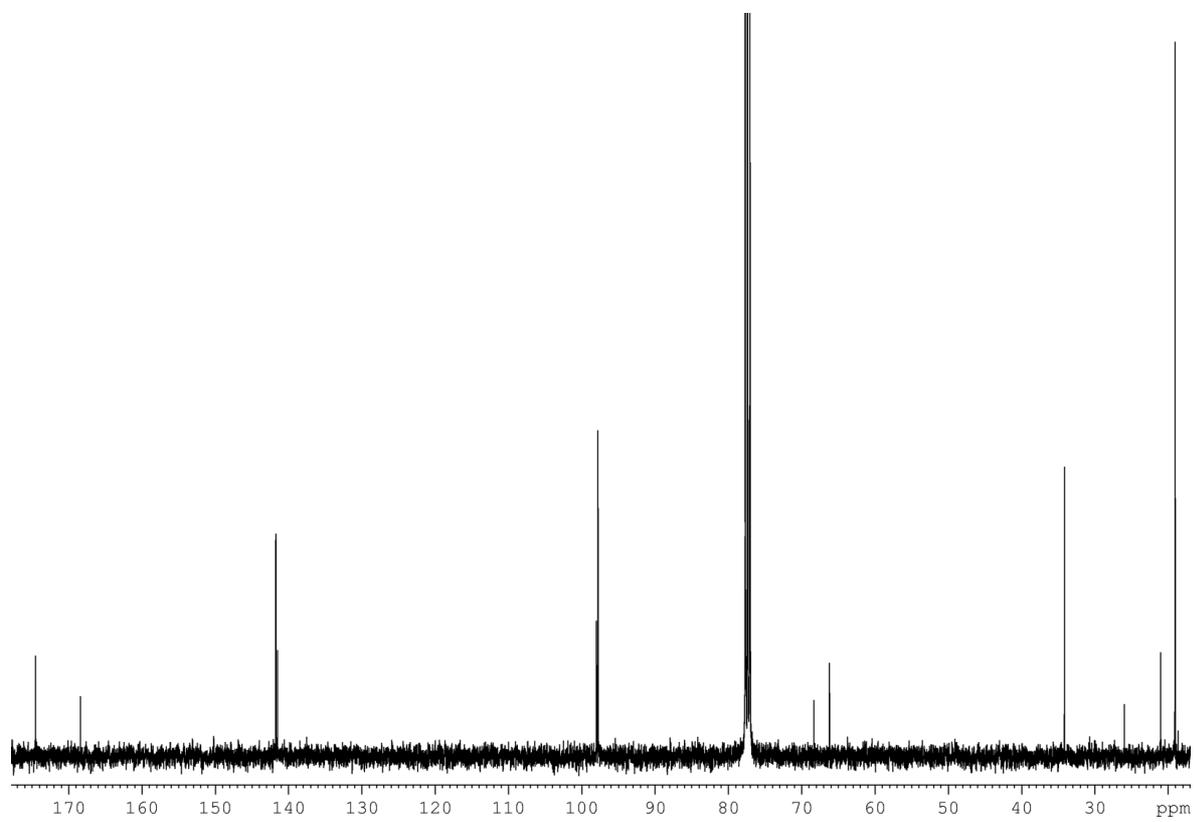


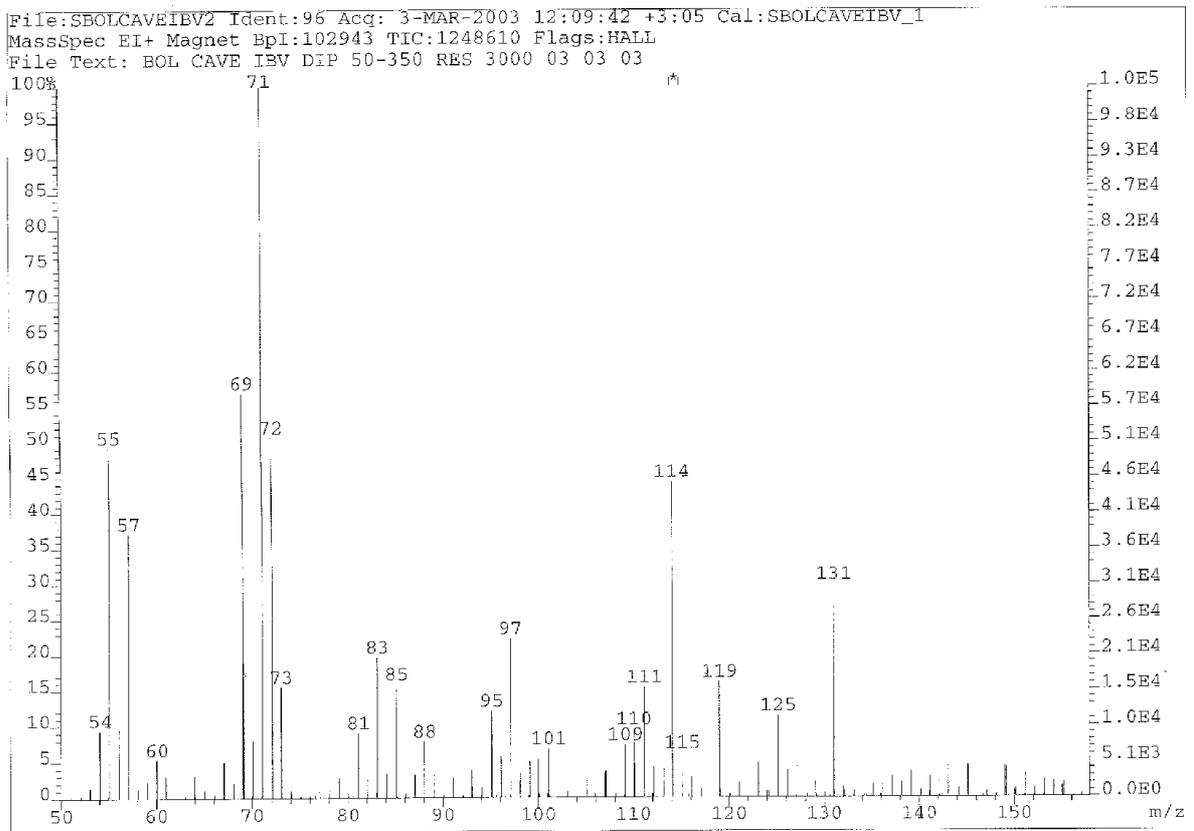
MS-Spektrum

Spektren von Vinylisobutyrat



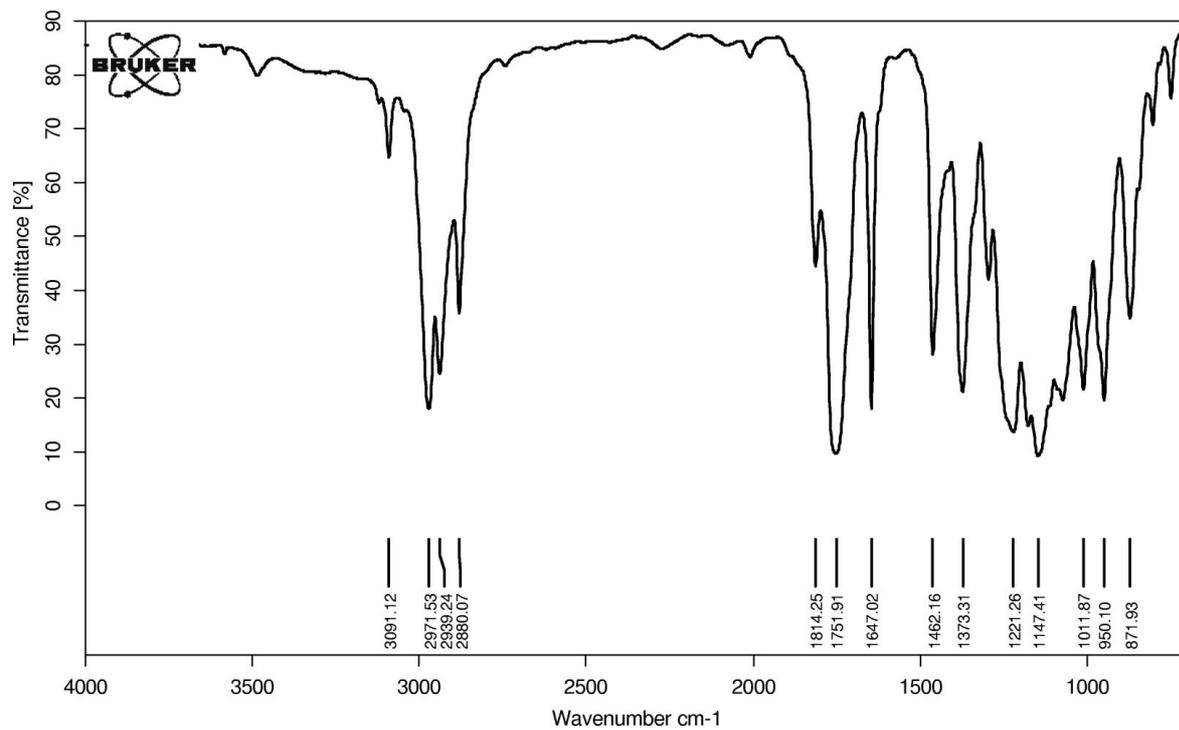
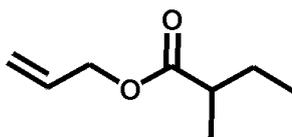
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

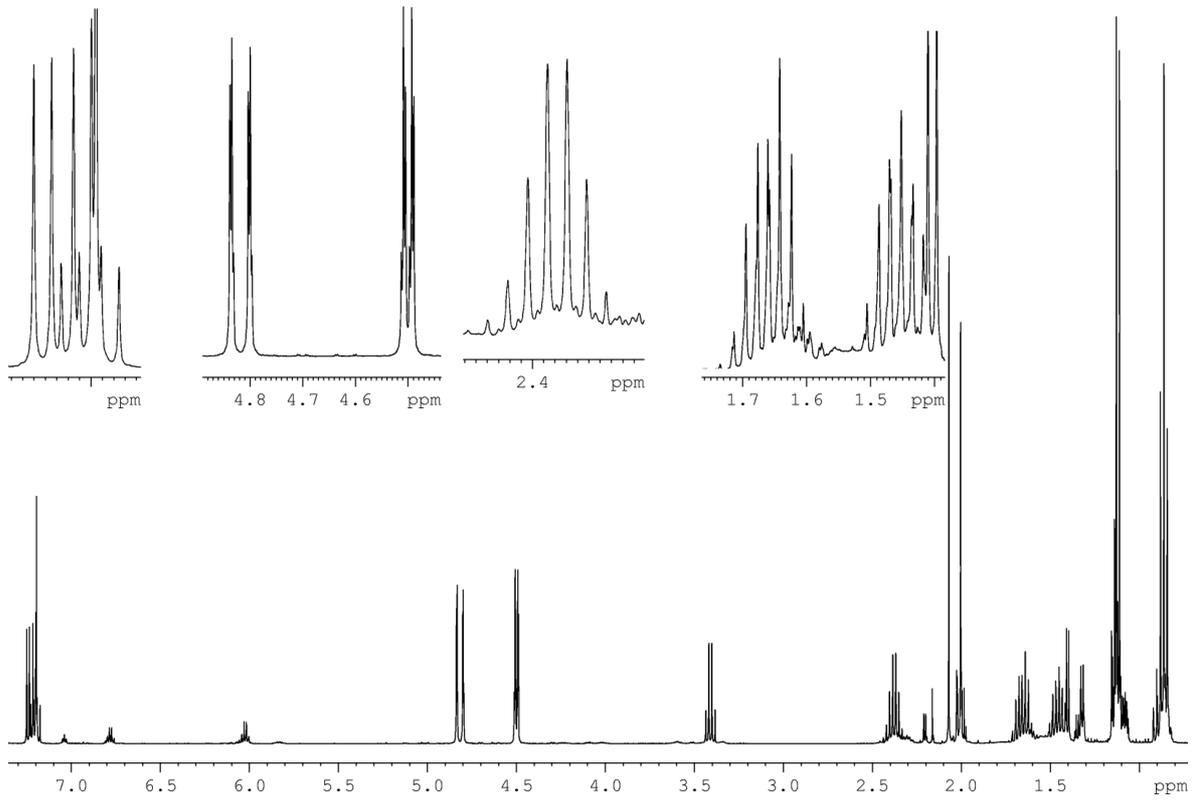
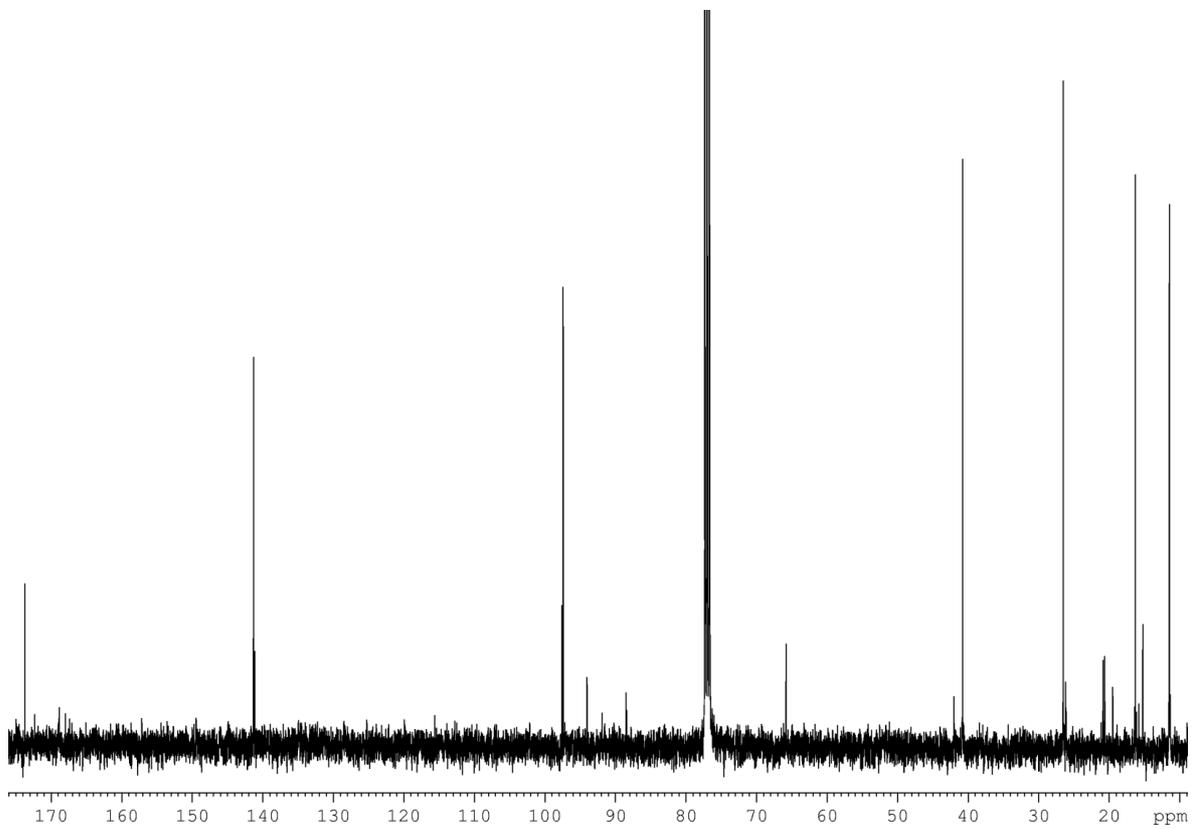


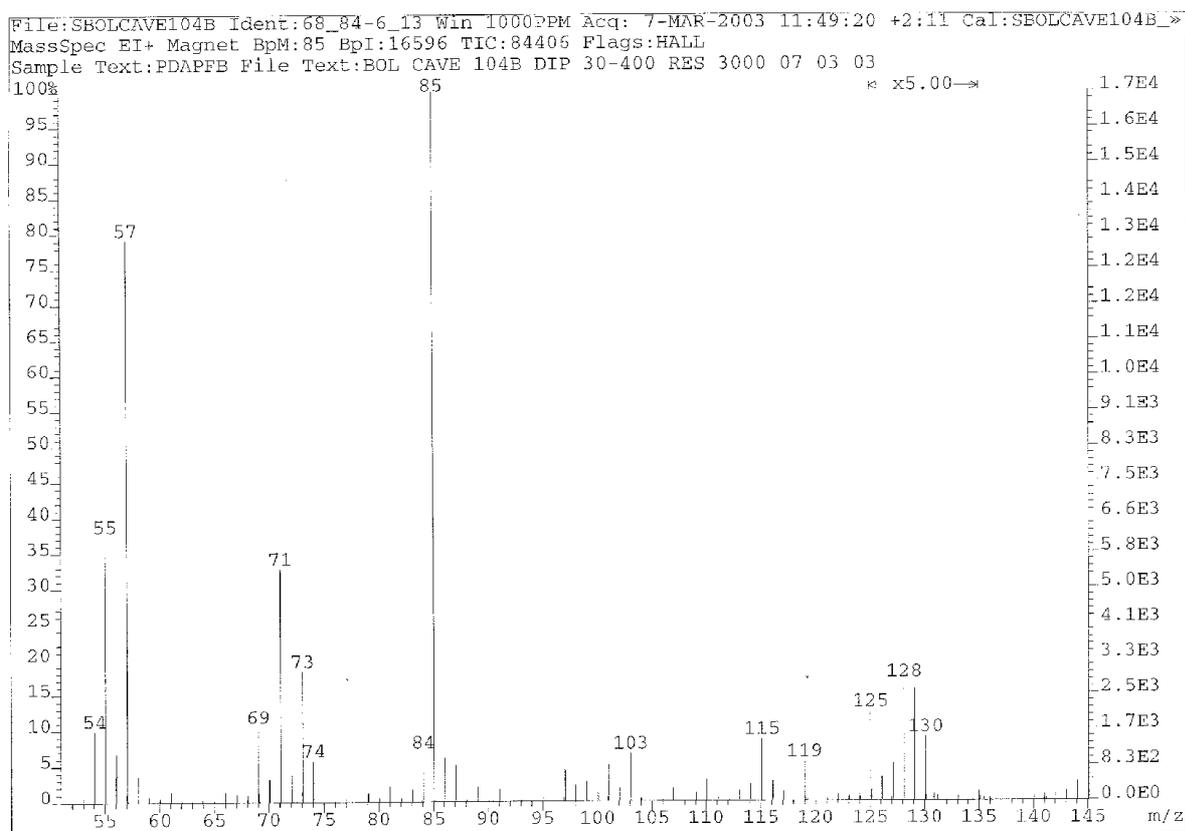
MS-Spektrum

Spektren von Vinyl-2-methylbutanoat

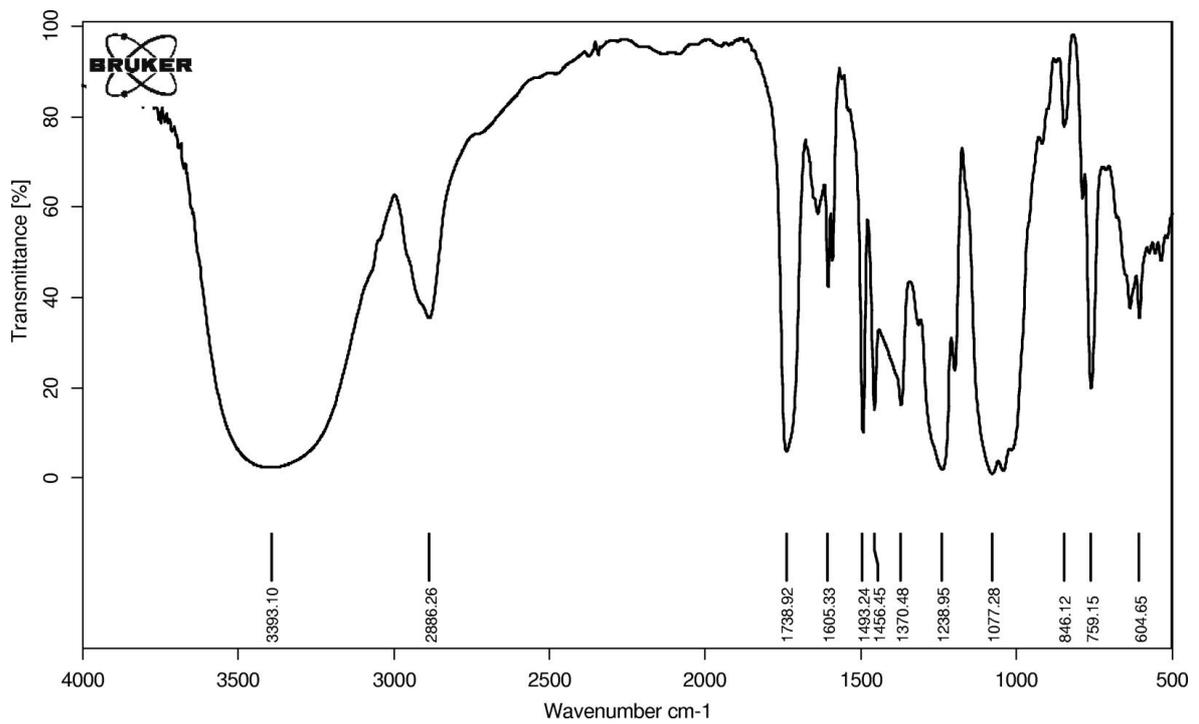
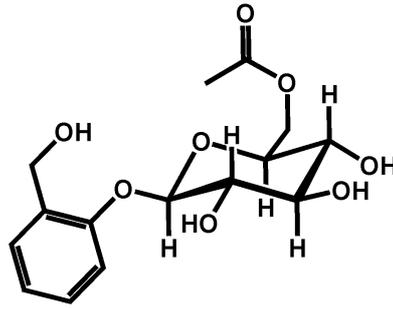


IR-Spektrum

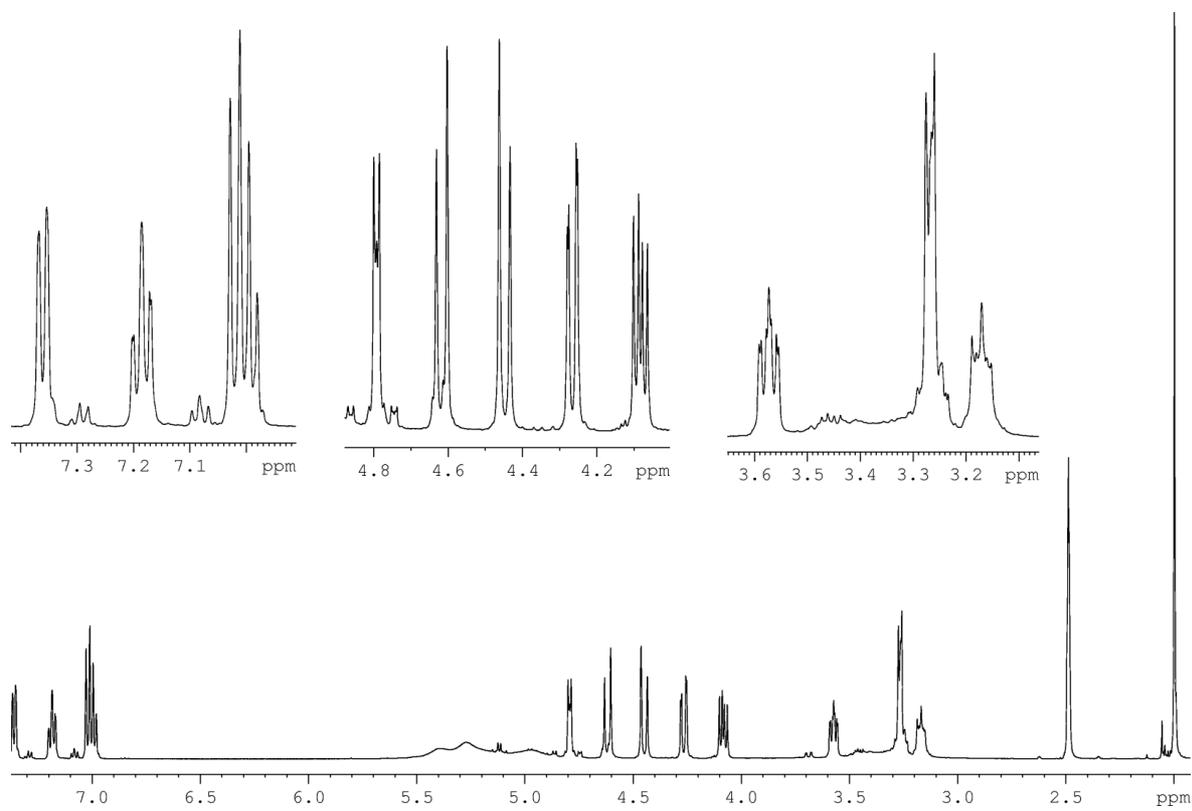
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum

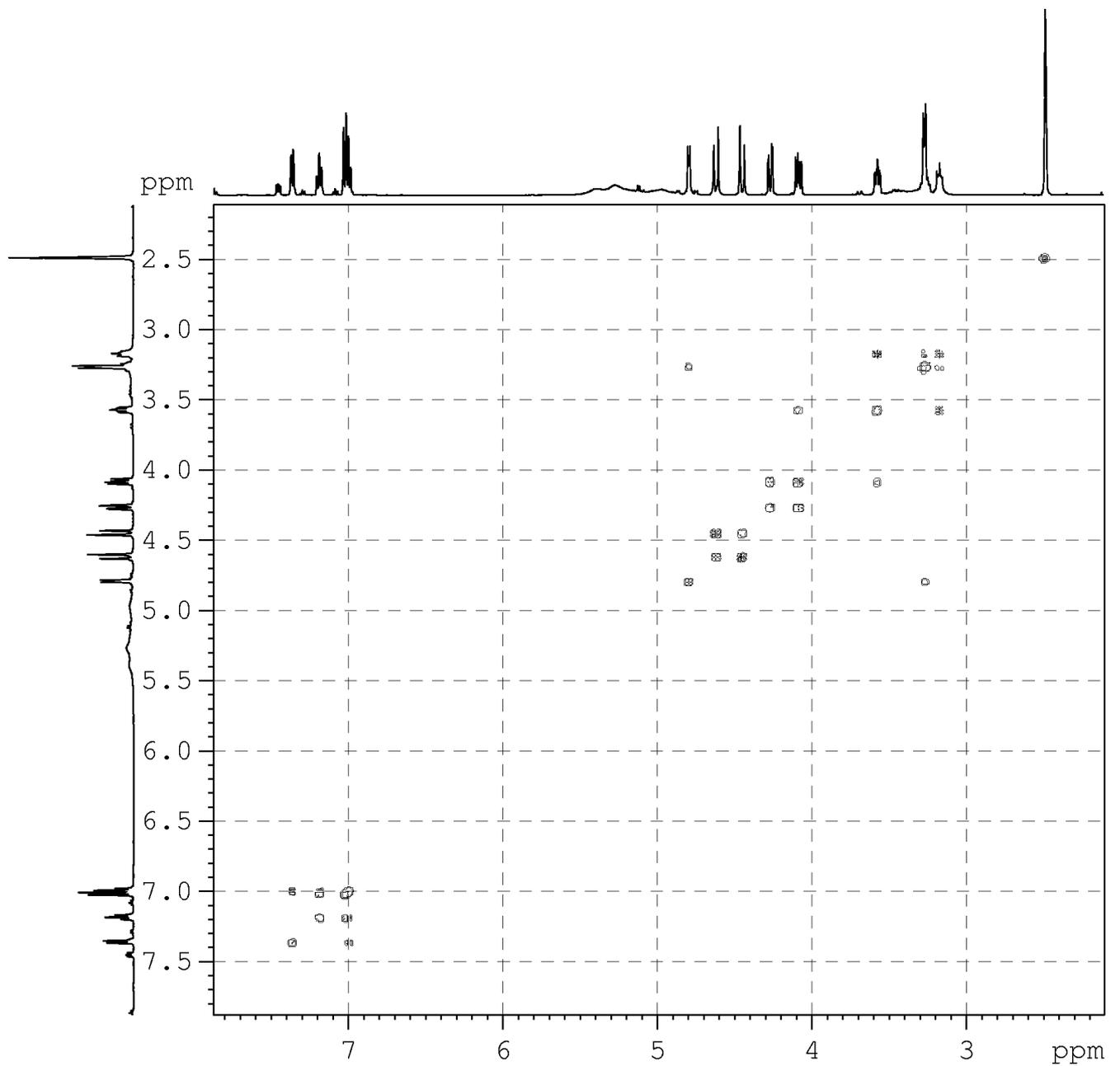


MS-Spektrum

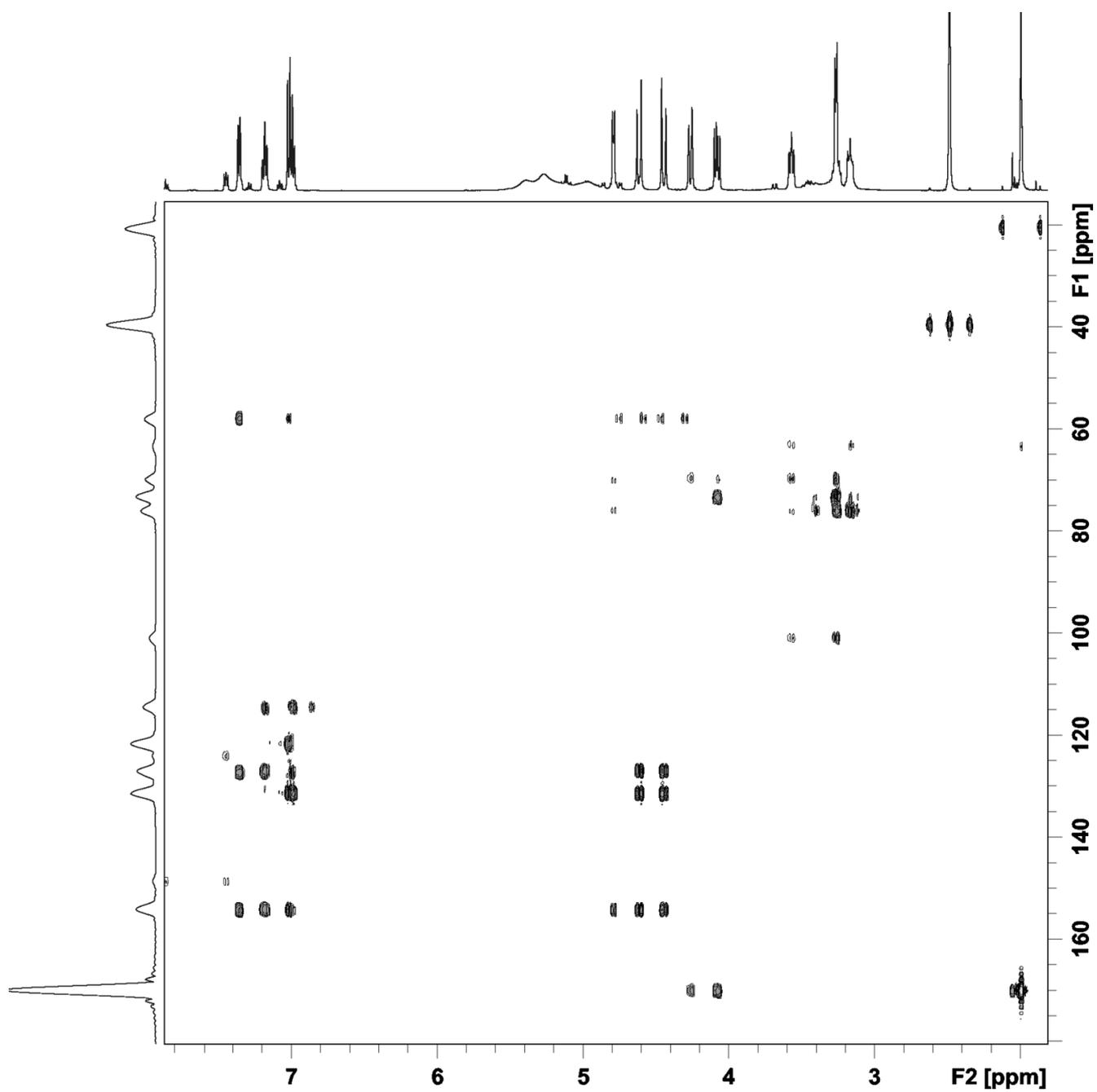
Spektren von 2-Hydroxymethyl-phenyl-6'-*O*-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 79

IR-Spektrum

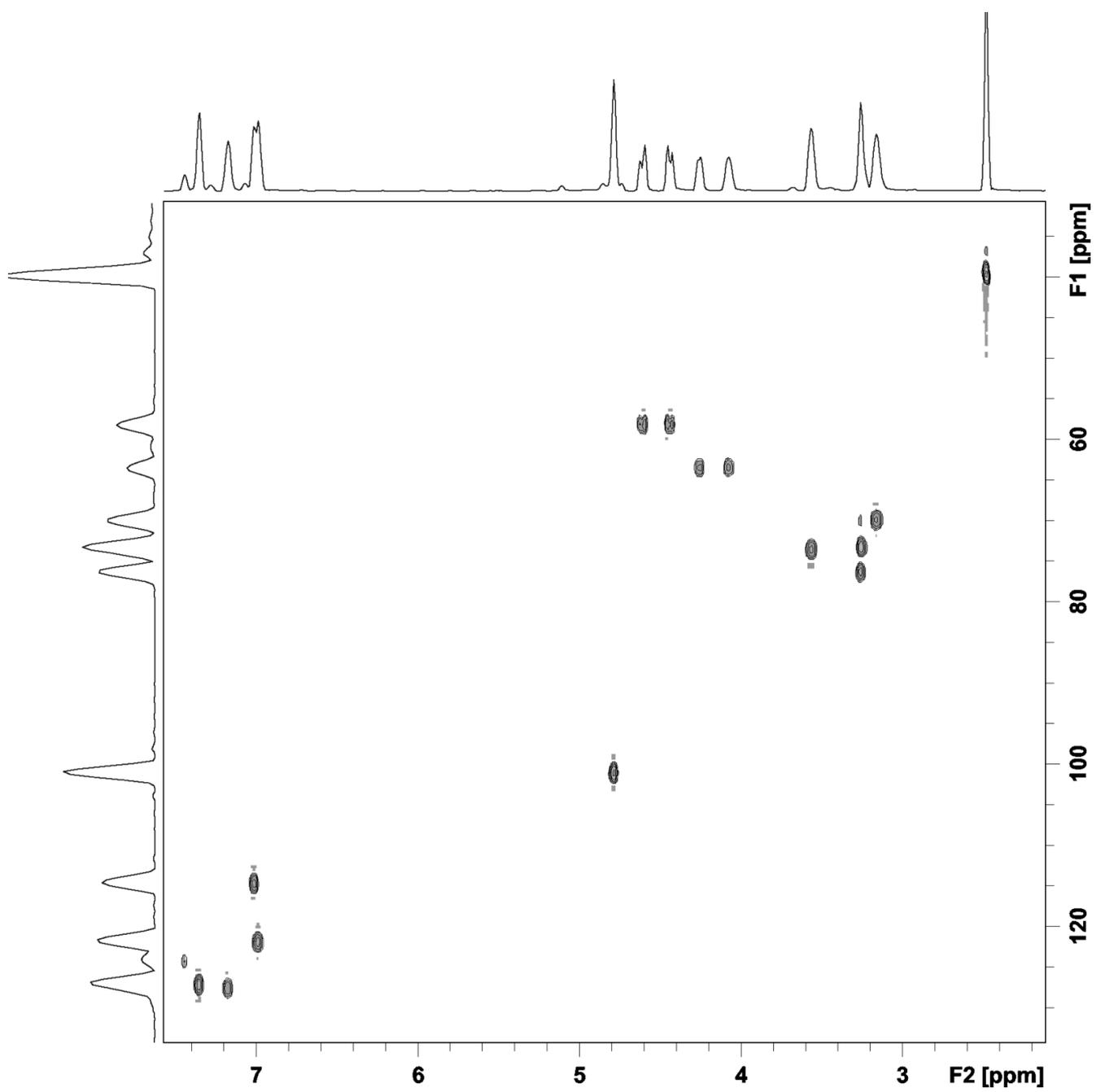
 ^1H -Spektrum



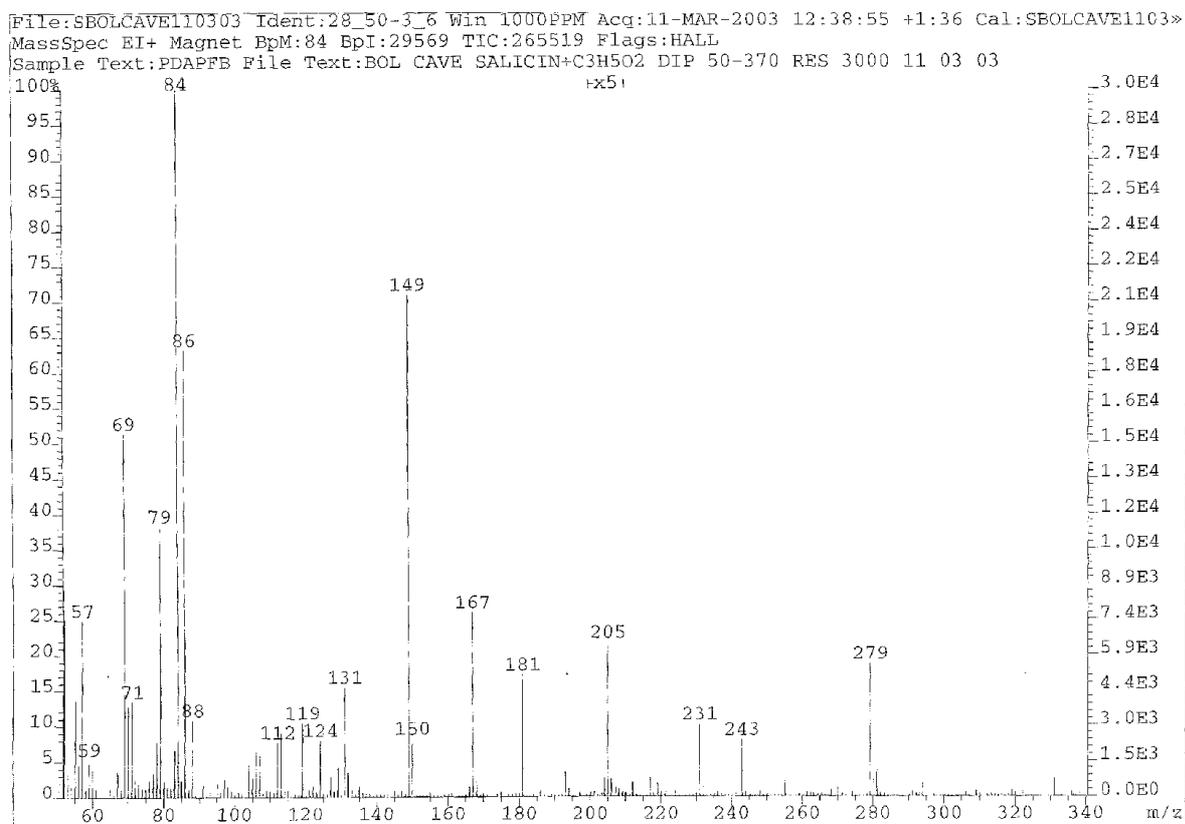
COSY-NMR-Spektrum



HMBC-NMR-Spektrum

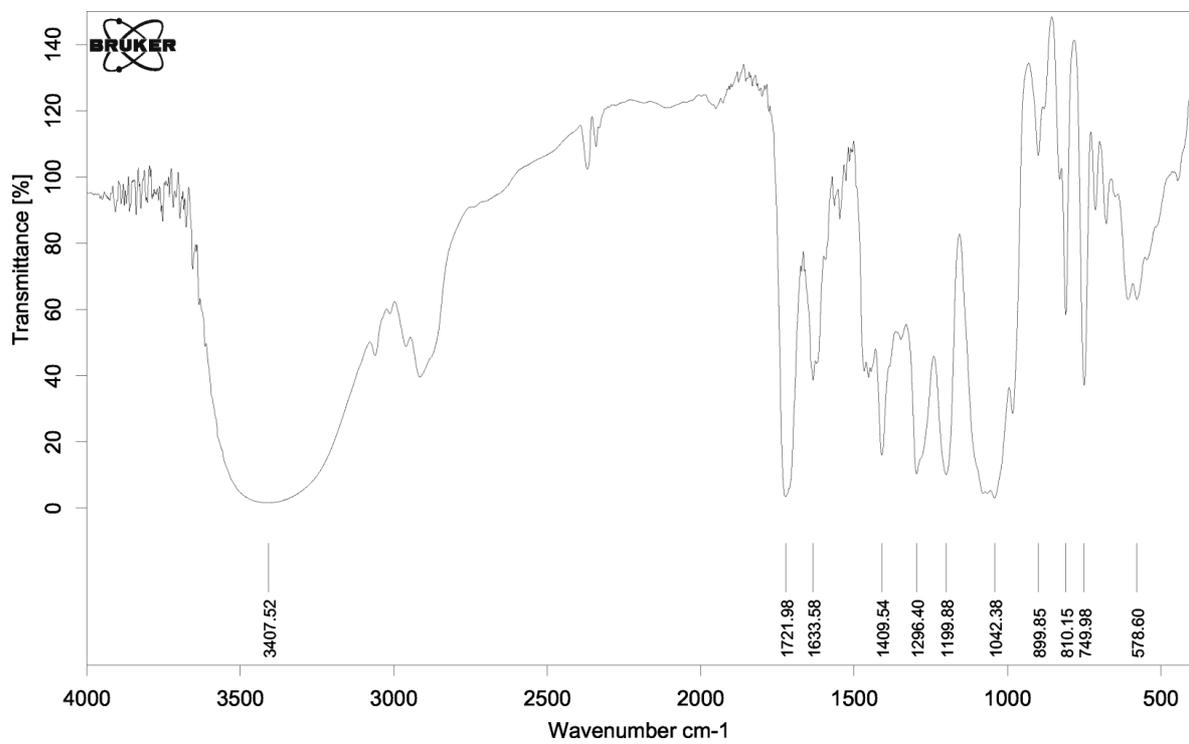
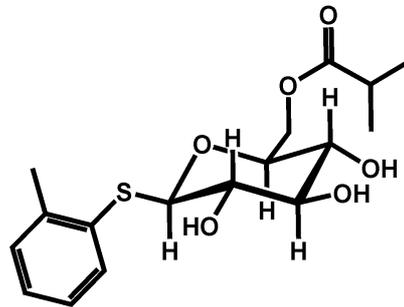


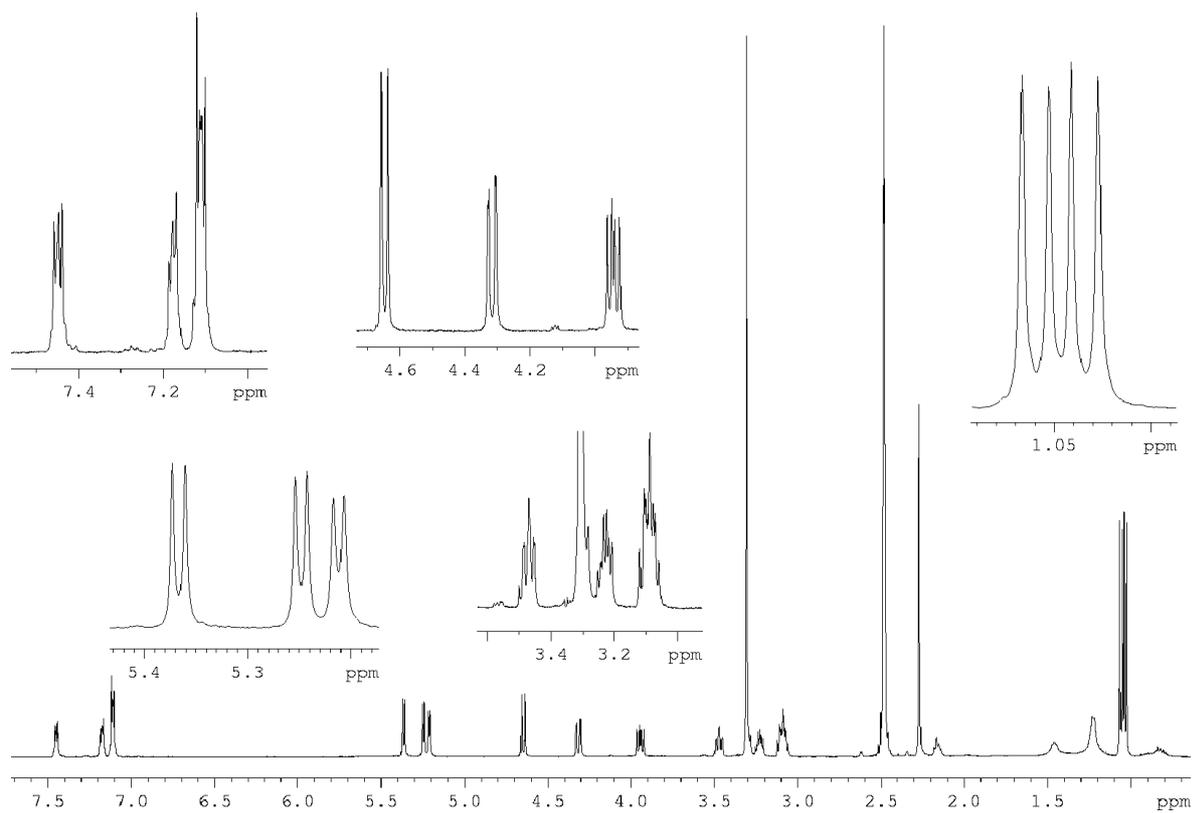
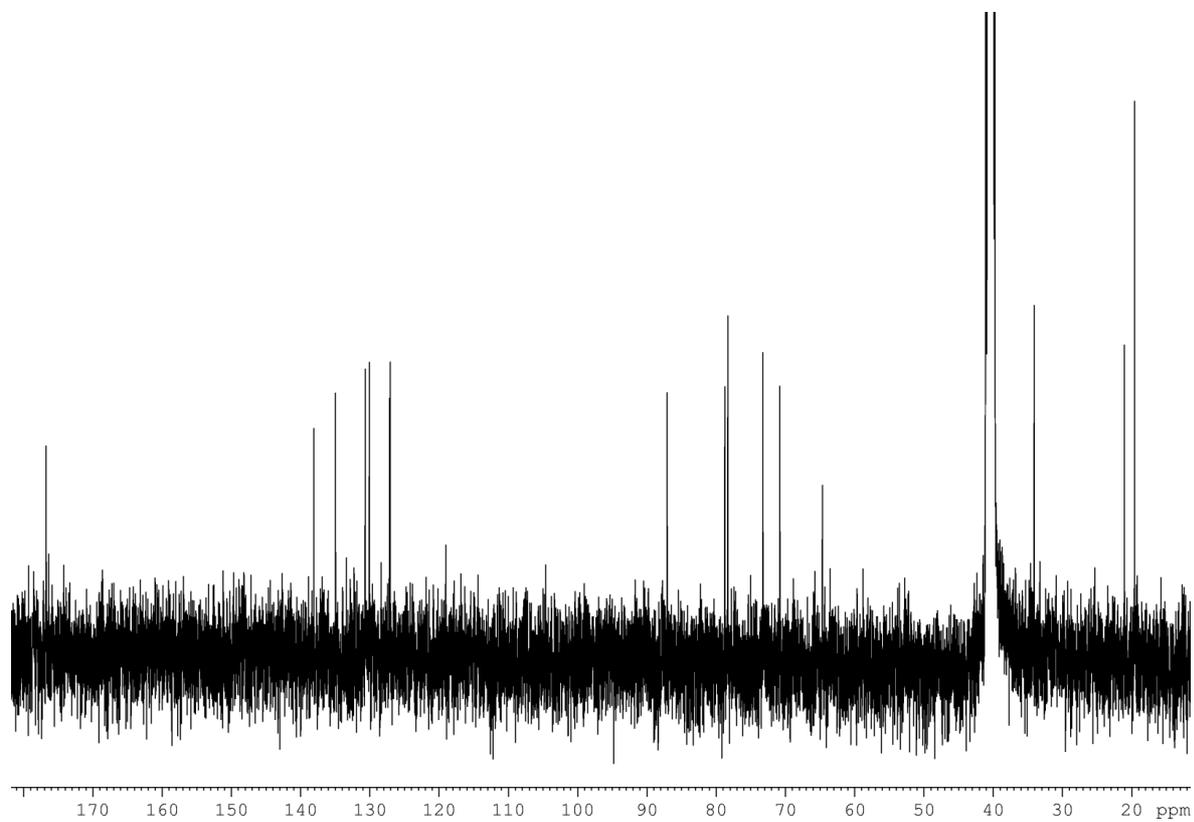
HMQC-NMR-Spektrum

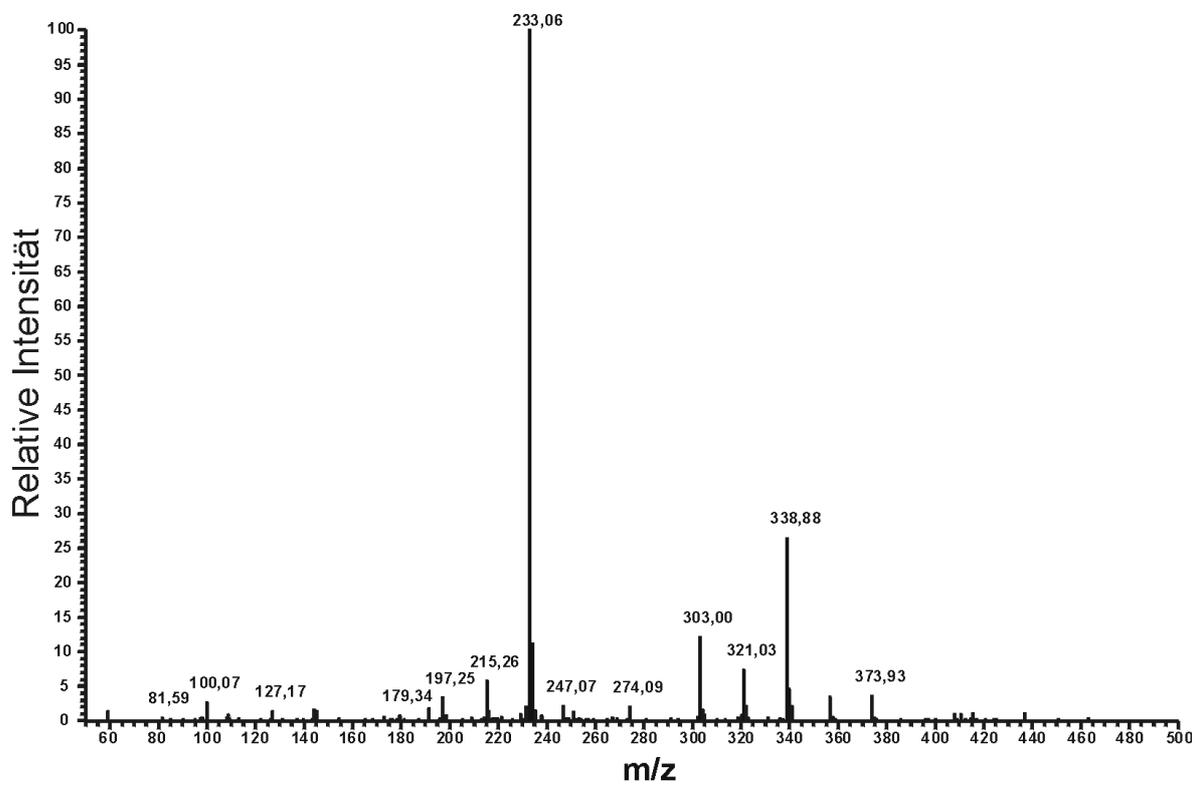


MS-Spektrum

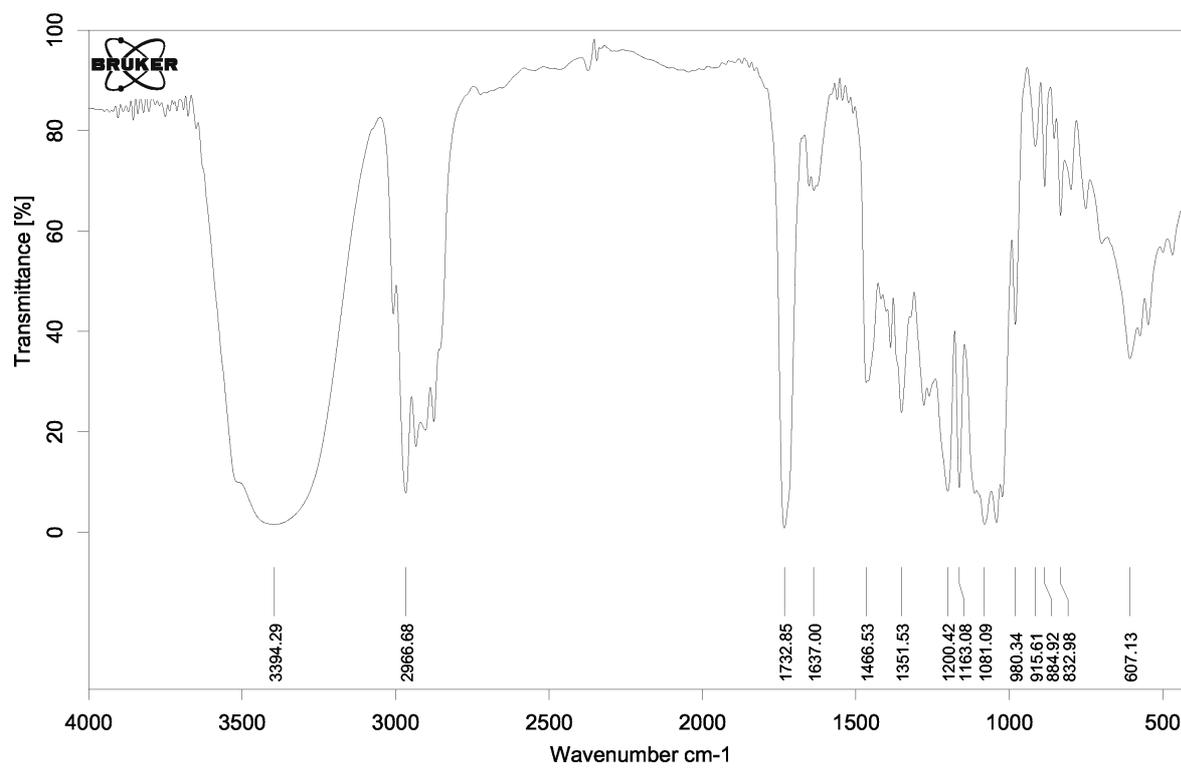
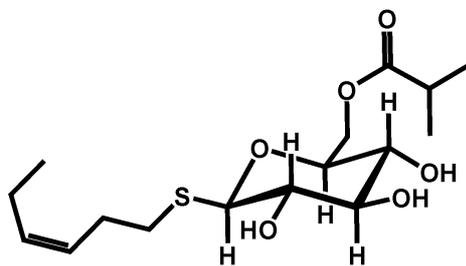
Spektren von 2-Methyl-phenyl-6'-O-(2-Methylpropanyl)-1'-thio- β -D-gluco- pyranosid 80



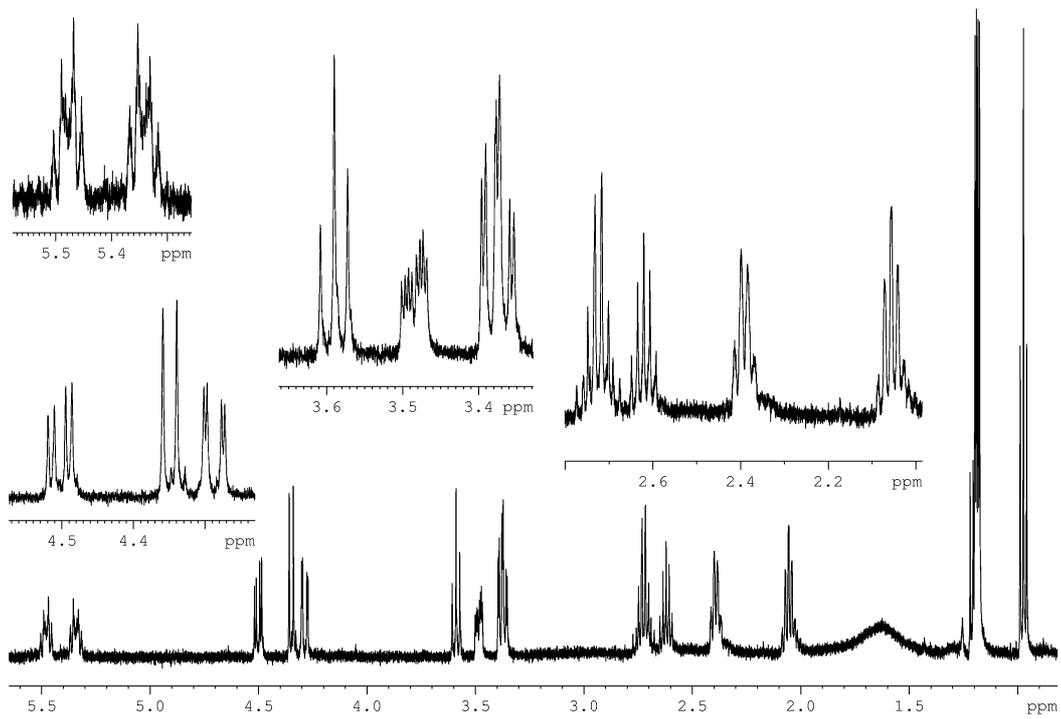
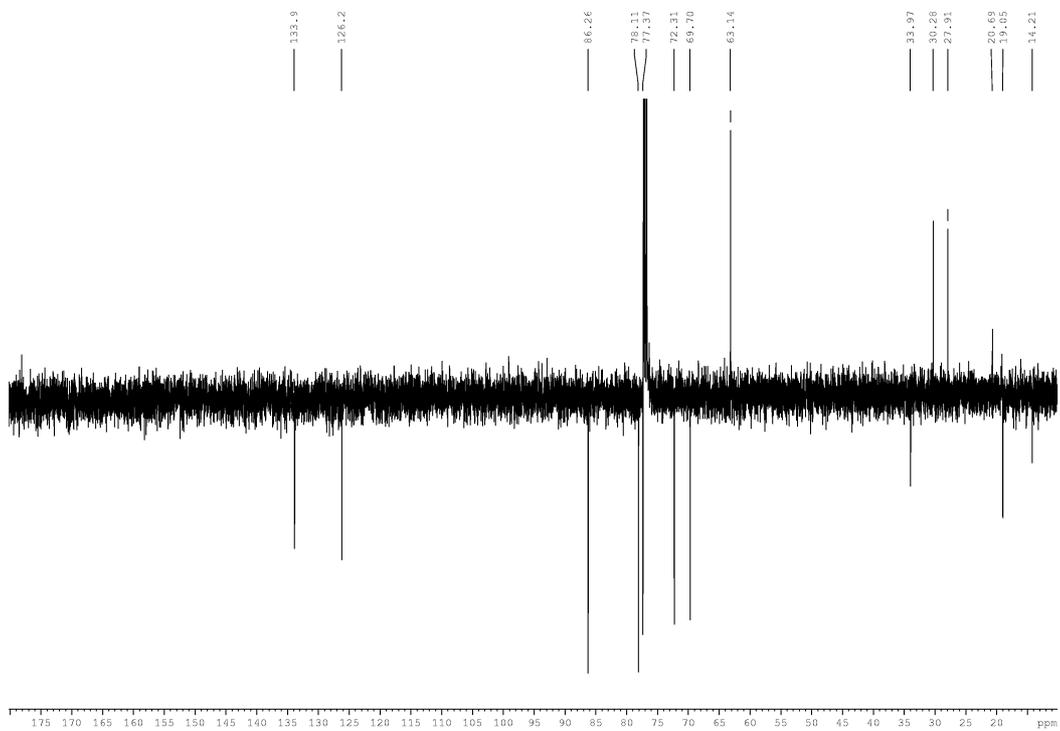
 ^1H -Spektrum ^{13}C -Spektrum



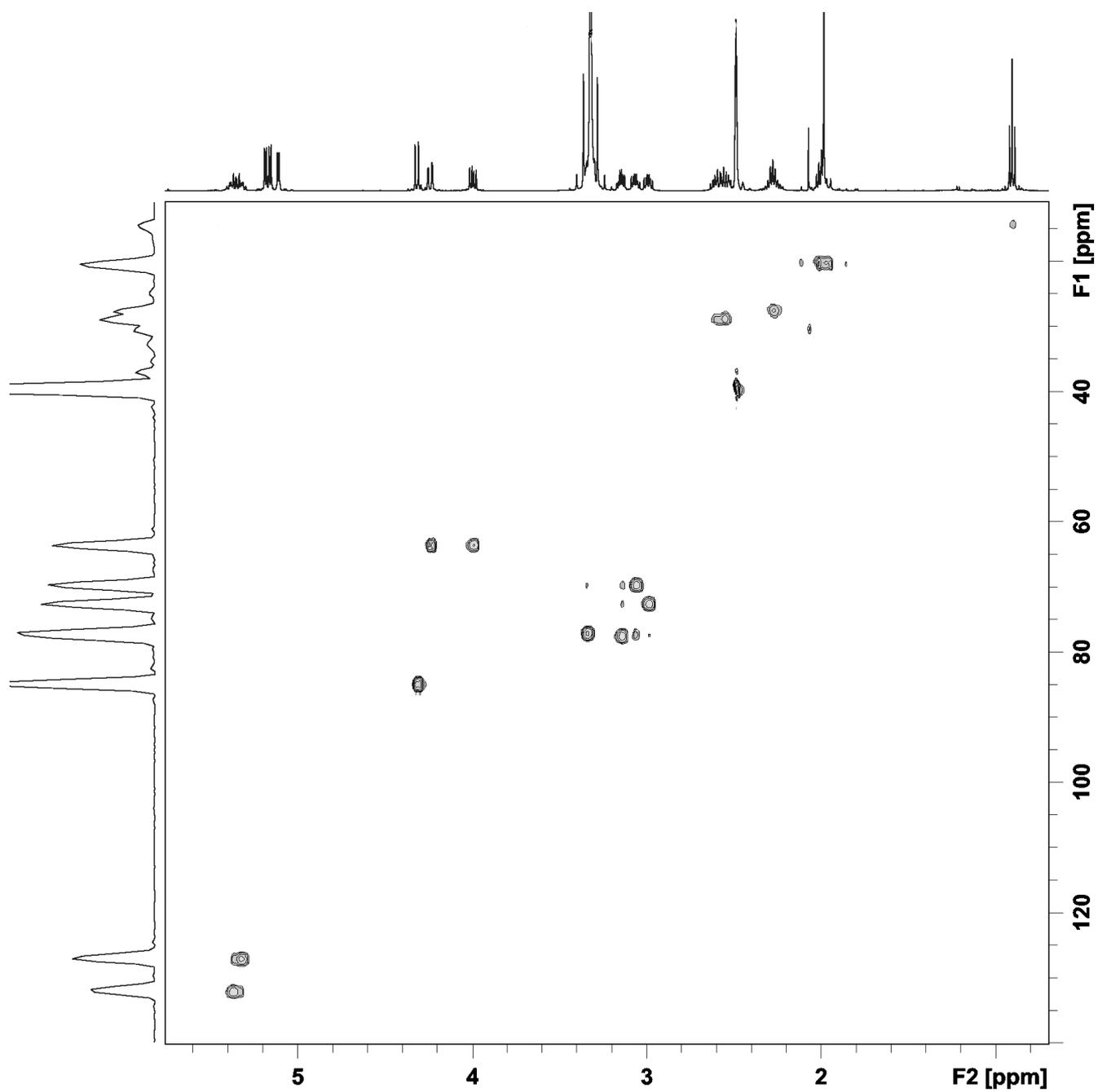
Spektren von (3Z)-Hex-3-en-1-yl-6'-O-(2-Methylpropanyl)-1'-thio- β -D-glucopyranosid 81



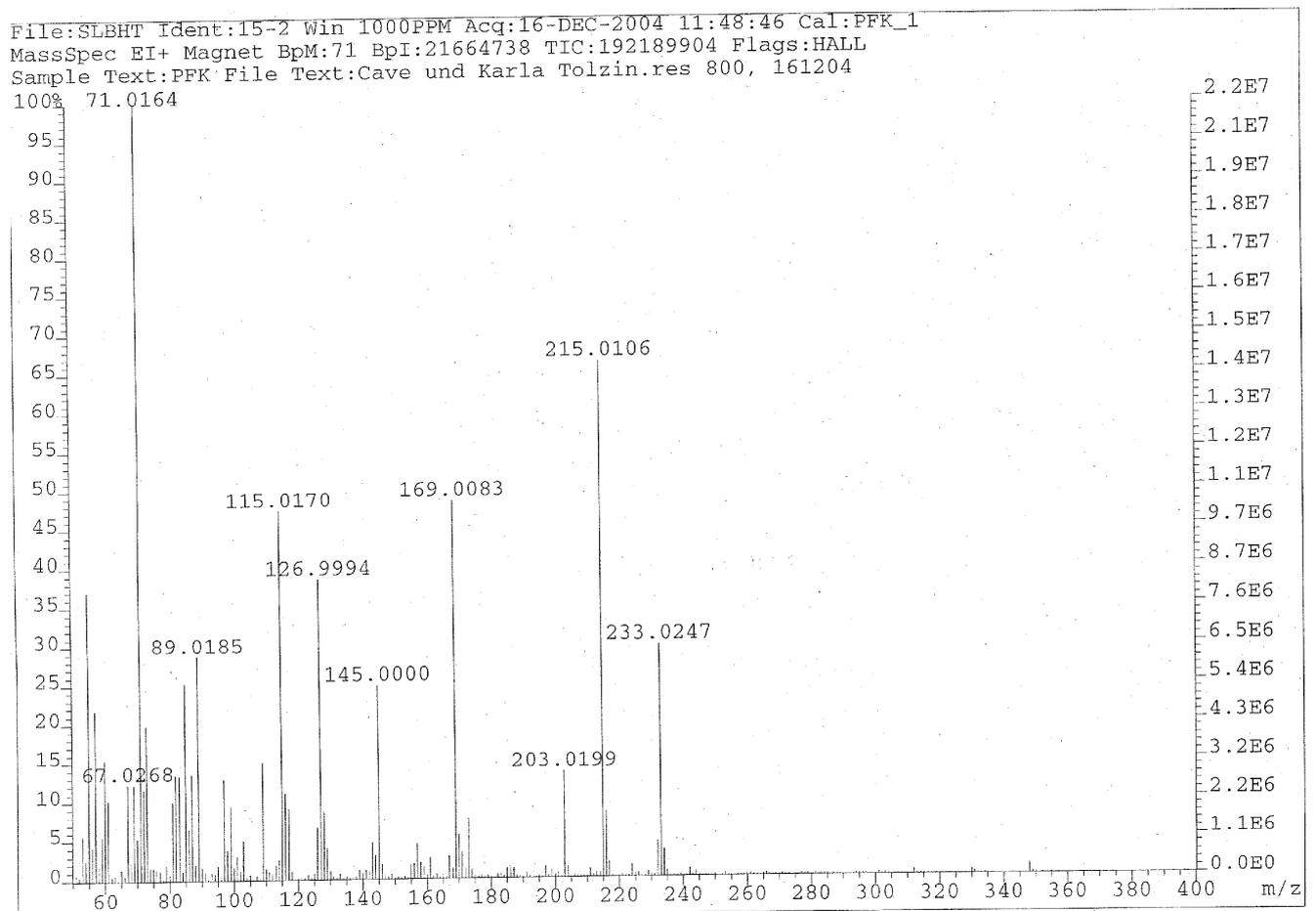
IR-Spektrum

 ^1H -Spektrum

APT-NMR-Spektrum



HMQC-NMR-Spektrum



MS-Spektrum

Literaturverzeichnis

- [1] FARRELL, B. D.: "Inordinate fondness" explained: Why are there so many beetles? In: *Science* 281 (1998), Nr. 5376, S. 555–559
- [2] LABANDEIRA, C. C. ; SEPKOSKI, J. J.: Insect Diversity in the Fossil Record. In: *Science* 261 (1993), Nr. 5119, S. 310–315
- [3] GRIMALDI, D.: The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86 (1999), Nr. 2, S. 373–406
- [4] LUNAU, K.: Adaptive radiation and coevolution - pollination biology case studies. In: *Organisms Diversity & Evolution* 4 (2004), Nr. 3, S. 207–224
- [5] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M.: The Chemical Ecology of Herbivory On Willows. In: *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B- Biological Sciences* 98 (1992), S. 63–73
- [6] PONEL, P. ; ORGEAS, J. ; SAMWAYS, M. J. ; ANDRIEU-PONEL, V. ; DE BEAULIEU, J. L. ; REILLE, M. ; ROCHE, P. ; TATONI, T.: 110 000 years of Quaternary beetle diversity change. In: *Biodiversity & Conservation* 12 (2003), Nr. 10, S. 2077–2089
- [7] BECERRA, Judith X.: Synchronus coadaptation in an ancient case of herbivory. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 22, S. 12804–12807
- [8] SCRIBER, J. M.: Evolution of insect-plant relationships: chemical constraints, coadaptation, and concordance of insect/plant traits. In: *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 104 (2002), Nr. 1, S. 217–235
- [9] M., Schoonhoven L. ; A., Van Loon J. J.: *Insect-Plant Biology*. London : Chapman & Hall, 1998 (1st edn.)
- [10] SYMONS, F. B. ; BECCALONI, G. W.: Phylogenetic indices for measuring the diet breadths of phytophagous insects. In: *Oecologia* 119 (1999), Nr. 3, S. 427–434
- [11] WITTSTOCK, U. ; GERSHENZON, J.: Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. In: *Current Opinion in Plant Biology* 5 (2002), Nr. 4, S. 300–307
- [12] HILKER, M.: *Chemische Ökologie juveniler Entwicklungsstadien der Blattkäfer (Coleoptera, Chrysomelidae)*, Universität Bayreuth, Habilitationsschrift, 1993

- [13] MÜLLER, C. ; HILKER, M.: Host finding and oviposition behavior in a chrysomelid specialist - The importance of host plant surface waxes. In: *Journal of Chemical Ecology* 27 (2001), Nr. 5, S. 985–994
- [14] DOBLER, S.: Evolutionary aspects of defense by recycled plant compounds in herbivorous insects. In: *Basic and Applied Ecology* 2 (2001), Nr. 1, S. 15–26
- [15] NISHIDA, R.: Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. In: *Annual Review of Entomology* 47 (2002), S. 57–92
- [16] THEIS, N. ; LERDAU, M.: The evolution of function in plant secondary metabolites [Review]. In: *International Journal of Plant Sciences* 164 (2003), Nr. 3 Suppl S, S. S93–S102
- [17] SCHILDKNECHT, H.: Protective Substances of arthropods and plants. In: *pontificiae academiae scientiarum scripta varia* 41 (1977), S. 59–107
- [18] HARTMANN, T.: Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. In: *Planta* 219 (2004), Nr. 1, S. 1–4
- [19] MA, R. L. ; COHEN, M. B. ; BERENBAUM, M. R. ; SCHULER, M. A.: Black Swallowtail (*Papilio polyxenes*) Alleles Encode Cytochrome P450s That Selectively Metabolize Linear Furanocoumarins. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310 (1994), Nr. 2, S. 332–340
- [20] DUFFEY, S. S.: Sequestration of Plant Natural-Products by Insects. In: *Annual Review of Entomology* 25 (1980), S. 447–477
- [21] KARBAN, R. ; AGRAWAL, A. A.: Herbivore offense [Review]. In: *Annual Review of Ecology and Systematics* 33 (2002), S. 641–664
- [22] HARTMANN, T. ; OBER, D.: Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores [Review]. In: *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* 209 (2000), S. 207–243; aromatic polyketides
- [23] TRIGO, J. R.: The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in neotropical Lepidoptera: Facts, perspectives and caveats [Review]. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11 (2000), Nr. 6, S. 551–561
- [24] MALCOLM, S. B. ; BROWER, L. P.: Evolutionary and Ecological Implications of Cardenolide Sequestration in the Monarch Butterfly. In: *Experientia* 45 (1989), Nr. 3, S. 284–295
- [25] NISHIDA, R.: Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera [Review]. In: *Annual Review of Entomology* 47 (2002), S. 57–92

- [26] HARTMANN, T. ; WITTE, L.: In: PELLETIER, S. W. (Hrsg.): *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Oxford : Pergamon, 1995, S. 155–233
- [27] FRICK, C. ; WINK, M.: Uptake and sequestration of ouabain and other cardiac glycosides in *Danaus plexippus* (Lepidoptera, danaidae) - evidence for a carrier-mediated process. In: *Journal of Chemical Ecology* 21 (1995), Nr. 5, S. 557–575
- [28] WINK, M. ; VONNICKISCHROSENEGK, E.: sequence data of mitochondrial 16s rdna of arctiidae and nymphalidae - evidence for a convergent evolution of pyrrolizidine alkaloid and cardiac glycoside sequestration [Review]. In: *Journal of Chemical Ecology* 23 (1997), Nr. 6, S. 1549–1568
- [29] NAHRSTEDT, A.: Relationships between the defense systems of plants and insects : the cyanogenic system of the Moth *Zygaena trifolii*. In: ROMEO, John T. (Hrsg.) ; SAUNDERS, James A. (Hrsg.) ; BARBOSA, Pedro (Hrsg.): *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. New York : Plenum Press, 1996 (Recent Advances in Phytochemistry ; 30), S. 217–230
- [30] DYER, L. A. ; BOWERS, M. D.: The importance of sequestered iridoid glycosides as a defense against an ant predator. In: *Journal of Chemical Ecology* 22 (1996), Nr. 8, S. 1527–1539
- [31] BOWERS, M. D. ; COLLINGE, S. K.: Fate of Iridoid Glycosides in Different Life Stages of the Buckeye, *Junonia coenia* (Lepidoptera, Nymphalidae). In: *Journal of Chemical Ecology* 18 (1992), Nr. 6, S. 817–831
- [32] BOWERS, M. D. ; STAMP, N. E.: Effect of Hostplant Genotype and Predators on Iridoid Glycoside Content of Pupae of a Specialist Insect Herbivore, *Junonia coenia* (Nymphalidae). In: *Biochemical Systematics & Ecology* 25 (1997), Nr. 7, S. 571–580
- [33] CAMARA, M. D.: Predator Responses to Sequestered Plant Toxins in Buckeye Caterpillars - Are Tritrophic Interactions Locally Variable. In: *Journal of Chemical Ecology* 23 (1997), Nr. 9, S. 2093–2106
- [34] PEREYRA, P. C. ; BOWERS, M. D.: Iridoid Glycosides as Oviposition Stimulants for the Buckeye Butterfly, *Junonia coenia* (Nymphalidae). In: *Journal of Chemical Ecology* 14 (1988), Nr. 3, S. 917–928
- [35] SUOMI, J. ; SIREN, H. ; JUSSILA, M. ; WIEDMER, S. K. ; RIEKKOLA, M. L.: Determination of iridoid glycosides in larvae and adults of butterfly *Melitaea cinxia* by partial filling micellar electrokinetic capillary chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. In: *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 376 (2003), Nr. 6, S. 884–889
- [36] BOWERS, M. D. ; LARIN, Z.: Acquired Chemical Defense in the Lycaenid Butterfly, *Eumaeus atala*. In: *Journal of Chemical Ecology* 15 (1989), Nr. 4, S. 1133–1146

- [37] MÜLLER, C. ; AGERBIRK, N. ; OLSEN, C. E.: Lack of sequestration of host plant glucosinolates in *Pieris rapae* and *P. brassicae*. In: *Chemoecology* 13 (2003), Nr. 1, S. 47–54
- [38] MÜLLER, C. ; BOEVE, J. L. ; BRAKEFIELD, P.: Host plant derived feeding deterrence towards ants in the turnip sawfly *Athalia rosae*. In: *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 104 (2002), Nr. 1, S. 153–157
- [39] MÜLLER, C. ; BRAKEFIELD, P. M.: Analysis of a chemical defense in sawfly larvae: Easy bleeding targets predatory wasps in late summer. In: *Journal of Chemical Ecology* 29 (2003), Nr. 12, S. 2683–2694
- [40] BROWER, L. P. ; VANE-WRIGHT, R.I. (Hrsg.) ; ACKERY, P.R. (Hrsg.): *Chemical defense in butterflies*. New York : Academic Press, 1984 (The Biology of Butterflies, Symposium of the Royal Entomology Society 11). – 109–134 S
- [41] ROTHSCHILD, M. ; HEATH, J. (Hrsg.) ; EMMET, A.M. (Hrsg.): *British aposematic lepidoptera*. Essex, England : Harley Books, 1985 (The Moths and Butterflies of Great Britain and Ireland). – 9–62 S
- [42] JOLIVET, Pierre H. A. ; JOLIVET, Pierre H. A. (Hrsg.) ; PETITPIERRE, E. (Hrsg.) ; HSIAO, T. H. (Hrsg.): *Biology of Chrysomelidae*. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher, 1988 (Series Entomologica ; 42). – 1–24 S
- [43] PASTEELS, J. M. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; OTTINGER, R.: Chemical Defense in Chrysomelid Larvae and Adults. In: *Tetrahedron* 38 (1982), Nr. 13, S. 1891–1897
- [44] KOPF, A. ; RANK, N. E. ; ROININEN, H. ; JULKUNEN-TIITTO, R. ; PASTEELS, J. M. ; TAHVANAINEN, J.: The evolution of host-plant use and sequestration in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). In: *Evolution* 52 (1998), Nr. 2, S. 517–528
- [45] LAURENT, P. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: An ecdysteroid (22-acetyl-20-hydroxyecdysone) from the defense gland secretion of an insect: *Chrysolina carnifex* (Coleoptera : Chrysomelidae). In: *Chemoecology* 13 (2003), Nr. 3, S. 109–111
- [46] LAURENT, P. ; DOOMS, C. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; HABIB-JIWAN, J. L. ; ROZENBERG, R. ; TERMONIA, A. ; PASTEELS, J. M.: Recycling plant wax constituents for chemical defense: hemi-biosynthesis of triterpene saponins from beta-amyrin in a leaf beetle. In: *Naturwissenschaften* 90 (2003), Nr. 11, S. 524–527
- [47] NARBERHAUS, I. ; THEURING, C. ; HARTMANN, T. ; DOBLER, S.: Uptake and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera : Chrysomelidae) adapted and non-adapted to alkaloid-containing host plants. In: *Journal of Comparative Physiology - B, Biochemical, Systemic, & Environmental Physiology* 173 (2003), Nr. 6, S. 483–491

- [48] NARBERHAUS, I. ; THEURING, C. ; HARTMANN, T. ; DOBLER, S.: Time course of pyrrolizidine alkaloid sequestration in Longitarsus flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Chemoecology* 14 (2004), Nr. 1, S. 17–23
- [49] WILLINGER, G. ; DOBLER, S.: Selective sequestration of iridoid glycosides from their host plants in Longitarsus flea beetles. In: *Biochemical Systematics & Ecology* 29 (2001), Nr. 4, S. 335–346
- [50] HENNIG, W.: Übersicht über die Larven der wichtigsten deutschen Chrysomelinen. In: *Arb. phys. angew. Ent.* 5 (1938), Nr. 2, S. 85–138
- [51] GROSS, J.: *On the Evolution of Host Plant Specialization in Leaf Beetles (Coleoptera: Chrysomelina)*, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2001
- [52] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D.: Chemical Defenses in Leaf Beetles and Their Larvae - the Ecological, Evolutionary and Taxonomic Significance. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 12 (1984), Nr. 4, S. 395–406
- [53] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M.: Proximate and Ultimate Causes For Host Plant Influence On Chemical Defense of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Entomologia Generalis* 15 (1991), Nr. 4, S. 227–235
- [54] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; DUFFEY, S.: Evolution of Exocrine Chemical Defense in Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Experientia* 45 (1989), Nr. 3, S. 295–300
- [55] BLUM, Murray S.: Antipredator devices in larvae of the Chrysomelidae: a unified synthesis for defensive eclecticism. In: *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae* (1994), S. 277–288
- [56] PASTEELS, J. M. ; EGGENBERGER, F. ; ROWELL-RAHIER, M. ; EHMKE, A. ; HARTMANN, T.: Chemical Defense in Chrysomelid Leaf Beetles - Storage of Host-Derived Pyrrolizidine Alkaloids Versus *de novo* Synthesized Cardenolides. In: *Naturwissenschaften* 79 (1992), Nr. 11, S. 521–523
- [57] DALOZE, D. ; BRAEKMAN, J. C. ; DELBRASSINE, A. ; PASTEELS, J. M.: Polyoxygenated Steroid Sophorosides From the Defense Glands of *Chrysolina quadrigemina*. In: *Journal of Natural Products* 54 (1991), Nr. 6, S. 1553–1557
- [58] HARTMANN, T. ; THEURING, C. ; SCHMIDT, J. ; RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M.: Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. In: *Journal of Insect Physiology* 45 (1999), Nr. 12, S. 1085–1095
- [59] DEROE, C. ; PASTEELS, J. M.: Distribution of Adult Defense Glands in Chrysomelids (Coleoptera, Chrysomelidae) and Its Significance in the Evolution of Defense-Mechanisms Within the Family. In: *Journal of Chemical Ecology* 8 (1982), Nr. 1, S. 67–82

- [60] PASTEELS, J. M.: The Value of Defensive Compounds As Taxonomic Characters in the Classification of Leaf Beetles. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 21 (1993), Nr. 1, S. 135–142
- [61] RANDOUX, T. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: *De novo* Biosynthesis of Delta-3-Isoxazolin-5-One and 3- Nitropropanoic Acid-Derivatives in *Chrysomela-Tremulae*. In: *Naturwissenschaften* 78 (1991), Nr. 7, S. 313–314
- [62] DALOZE, D. ; BRAEKMAN, J. C. ; PASTEELS, J. M.: A Toxic Dipeptide From the Defense Glands of the Colorado Beetle. In: *Science* 233 (1986), Nr. 4760, S. 221–223
- [63] TIMMERMANS, M. ; RANDOUX, T. ; DALOZE, D. ; BRAEKMAN, J. C. ; PASTEELS, J. M. ; LESAGE, L.: The Chemical Defense of Doryphorina Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Biochemical Systematics and Ecology* 20 (1992), Nr. 4, S. 343–349
- [64] RANDOUX, T. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M. ; RICCIO, R.: New Polyoxygenated Steroid Glycosides From the Defense Glands of Several Species of Chrysolina Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Tetrahedron* 46 (1990), Nr. 11, S. 3879–3888
- [65] DALOZE, D. ; BRAEKMAN, J. C. ; PASTEELS, J. M.: New Polyoxygenated Steroidal Glucosides From *Chrysolina hyperici* (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Tetrahedron Letters* 26 (1985), Nr. 19, S. 2311–2314
- [66] DALOZE, D. ; BROEDERS, F. ; BRAEKMAN, J. C. ; ARAUJO, J. ; PASTEELS, J. M.: New Cardiac-Glycosides Containing 2-Deoxyhexoses From the Defensive Secretion of Adult *Chrysolina banksi* (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Biochemical Systematics and Ecology* 23 (1995), Nr. 2, S. 113–119
- [67] EGGENBERGER, F. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M.: Identification and Seasonal Quantification of Defensive Secretion Components of *Oreina gloriosa* (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Experientia* 48 (1992), Nr. 11-12, S. 1173–1179
- [68] HILKER, M. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: Cardenolide Glycosides From the Adults and Eggs of *Chrysolina fuliginosa* (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Experientia* 48 (1992), Nr. 10, S. 1023–1027
- [69] DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: Production of Cardiac-Glycosides By Chrysomelid Beetles and Larvae. In: *Journal of Chemical Ecology* 5 (1979), Nr. 1, S. 63–77
- [70] VAN OYCKE, S. ; RANDOUX, T. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: New Cardenolide Glycosides From the Defense Glands of Chrysolina Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Bulletin Des Societes Chimiques Belges* 97 (1988), Nr. 4, S. 297–311

- [71] PASTEELS, J. M. ; DALOZE, D.: Cardiac-Glycosides in Defensive Secretion of Chrysomelid Beetles - Evidence For Their Production By Insects. In: *Science* 197 (1977), Nr. 4298, S. 70–72
- [72] VAN OYCKE, S. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: Cardenolide Biosynthesis in Chrysomelid Beetles. In: *Experientia* 43 (1987), Nr. 4, S. 460–462
- [73] OBER, D. ; HARTMANN, T.: Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. In: *Plant Molecular Biology* 44 (2000), Nr. 4, S. 445–450
- [74] HARTMANN, T.: Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. In: *Planta* 207 (1999), Nr. 4, S. 483–495
- [75] HARTMANN, T. ; THEURING, C. ; WITTE, L. ; SCHULZ, S. ; PASTEELS, J. M.: Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 (2003), Nr. 5, S. 515–523
- [76] PASTEELS, J. M. ; DOBLER, S. ; ROWELL-RAHIER, M. ; EHMKE, A. ; HARTMANN, T.: Distribution of Autogenous and Host-Derived Chemical Defenses in *Oreina* Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Journal of Chemical Ecology* 21 (1995), Nr. 8, S. 1163–1179
- [77] HARTMANN, T. ; THEURING, C. ; WITTE, L. ; PASTEELS, J. M.: Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 (2001), Nr. 11, S. 1041–1056
- [78] HARTMANN, T. ; WITTE, L. ; EHMKE, A. ; THEURING, C. ; ROWELL-RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M.: Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. In: *Phytochemistry* 45 (1997), Nr. 3, S. 489–497
- [79] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M. ; RANDOUX, T. ; BRAEKMAN, J. C. ; DALOZE, D.: Pyrrolizidine Alkaloids of Probable Host-Plant Origin in the Pronotal and Elytral Secretion of the Leaf Beetle *Oreina cacaliae*. In: *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 49 (1988), Nr. 1-2, S. 55–58
- [80] HARTMANN, T. ; OBER, D.: Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* Bd. 209. Berlin : SPRINGER-VERLAG BERLIN, 2000, S. 207–243
- [81] EHMKE, A. ; RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M. ; THEURING, C. ; HARTMANN, T.: Sequestration, maintenance, and tissue distribution of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in larvae of two *Oreina* species. In: *Journal of Chemical Ecology* 25 (1999), Nr. 10, S. 2385–2395
- [82] ROWELL-RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M. ; ALONSOMEJIA, A. ; BROWER, L. P.: Relative Unpalatability of Leaf Beetles With Either Biosynthesized or Sequestered Chemical Defense. In: *Animal Behaviour* 49 (1995), Nr. 3, S. 709–714

- [83] PASTEELS, J. M. ; THEURING, C. ; WITTE, L. ; HARTMANN, T.: Sequestration and metabolism of protoxic pyrrolizidine alkaloids by larvae of the leaf beetle *Platyphora boucardi* and their transfer via pupae into defensive secretions of adults. In: *Journal of Chemical Ecology* 29 (2003), Nr. 2, S. 337–355
- [84] MARDULYN, P. ; MILINKOVITCH, M. C. ; PASTEELS, J. M.: Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that Gonioctena leaf beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shifts. In: *Systematic Biology* 46 (1997), Nr. 4, S. 722–747
- [85] BALLABENI, P. ; RAHIER, M.: Performance of leaf beetle larvae on sympatric host and non- host plants. In: *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 97 (2000), Nr. 2, S. 175–181
- [86] DOBLER, S. ; MARDULYN, P. ; PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M.: Host-plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. In: *Evolution* 50 (1996), Nr. 6, S. 2373–2386
- [87] EHRLICH, P. R. ; RAVEN, P. H.: Butterflies and Plants - A Study in Coevolution. In: *Evolution* 18 (1964), Nr. 4, S. 586–608
- [88] TERMONIA, Arnaud ; PASTEELS, Jaques M.: Larval chemical defence and evolution of host shifts in *Chrysomela* leaf beetles. In: *Chemoecology* (1999), Nr. 9, S. 13–23
- [89] TERMONIA, A. ; HSIAO, T. H. ; PASTEELS, J. M. ; MILINKOVITCH, M. C.: Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001), Nr. 7, S. 3909–3914
- [90] MORTON, T. C. ; VENCL, F. V.: Larval beetles form a defense from recycled host-plant chemicals discharged as fecal wastes. In: *Journal of Chemical Ecology* 24 (1998), Nr. 5, S. 765–785
- [91] BLUM, Murray S. ; BRAND, John M. ; WALLACE, J. B. ; FALES, Henry M.: Chemical Characterization of the defensive secretion of a Chrysomelid Larva. In: *Life Sciences* 11 (1972), S. 525–531
- [92] GARB, Gerson: The Eversible Glands of a Chrysomelid Larva, *Melasoma lapponica*. In: *Journal of Entomology and Zoologie* (1915), Nr. 8, S. 88–97
- [93] RENNER, Klaus: Über die ausstülpbaren Hautblasen der Larven von *Gastroidea viridula* De Geer und ihre ökologische Bedeutung. In: *Beiträge zur Entomologie*
- [94] HINTON, H. E.: On A Little Known Protective Device Of Some Chrysomelid Pupae (Coleoptera). In: *Proceedings of the Royal Entomological Society of London Series A-General Entomology* 25 (1951), S. 67–73

- [95] MOORE, B. P.: Hydrogen Cyanide in the Defensive Secretions of Larval Paropsini (Coleoptera: Chrysomelidae). In: *Journal of the Australian entomological Society* (1966), Nr. 6, S. 36–38
- [96] PASTEELS, J. M. ; DUFFEY, S. ; ROWELL-RAHIER, M.: Toxins in Chrysomelid Beetles - Possible Evolutionary Sequence From *de novo* Synthesis to Derivation From Food-Plant Chemicals. In: *Journal of Chemical Ecology* 16 (1990), Nr. 1, S. 211–222
- [97] BLUM, M. S. ; WALLACE, J. B. ; DUFFIELD, R. M. ; BRAND, J. M. ; FALES, H. M. ; SOKOLOSKI, E. A.: Chrysomelidial in Defensive Secretion of Leaf Beetle *Gastrophysa cyanea* Melsheimer. In: *Journal of Chemical Ecology* 4 (1978), Nr. 1, S. 47–53
- [98] SUGAWARA, F. ; MATSUDA, K. ; KOBAYASHI, A. ; YAMASHITA, K.: Defensive Secretion of Chrysomelid Larvae *Linnaeidea aenea* Linne and *Plagioderma versicolora distincta* Baly. In: *Journal of Chemical Ecology* 5 (1979), Nr. 6, S. 929–934
- [99] MATSUDA, K. ; SUGAWARA, F.: Defensive Secretion of Chrysomelid Larvae *Chrysomela vigintipunctata* Costella (Marseul), *C. Populi* L and *Gastrolina depressa* Baly (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Applied Entomology and Zoology* 15 (1980), Nr. 3, S. 316–320
- [100] GROSS, J. ; MÜLLER, C. ; VILCINSKAS, A. ; HILKER, M.: Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 72 (1998), Nr. 3, S. 296–303
- [101] OLDHAM, N. J. ; VEITH, M. ; BOLAND, W. ; DETTNER, K.: Iridoid monoterpene biosynthesis in insects: Evidence for a *de novo* pathway occurring in the defensive glands of *Phaedon armoraciae* (Chrysomelidae) leaf beetle larvae. In: *Naturwissenschaften* 83 (1996), Nr. 10, S. 470–473
- [102] LORENZ, M. ; BOLAND, W. ; DETTNER, K.: Biosynthese von Iridodialen in Wehrdrüsen von Blattkäferlarven (Chrysomelinae). In: *Angewandte Chemie* 105 (1993), Nr. 6, S. 904–905
- [103] VEITH, M. ; LORENZ, M. ; BOLAND, W. ; SIMON, H. ; DETTNER, K.: Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes in Insects - Defensive Secretions From Larvae of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Tetrahedron* 50 (1994), Nr. 23, S. 6859–6874
- [104] VEITH, M. ; DETTNER, K. ; BOLAND, W.: Stereochemistry of an alcohol oxidase from the defensive secretion of larvae of the leaf beetle *Phaedon armoraciae* (Coleoptera: Chrysomelidae). In: *Tetrahedron* 52 (1996), Nr. 19, S. 6601–6612
- [105] FELD, B. K. ; PASTEELS, J. M. ; BOLAND, W.: *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera : Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes *de novo* and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors. In: *Chemoecology* 11 (2001), Nr. 4, S. 191–198

- [106] DALOZE, D. ; PASTEELS, J. M.: Isolation of 8-Hydroxygeraniol-8-*O*-Beta-D-Glucoside, a Probable Intermediate in Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes, From Defensive Secretions of *Plagioderma-versicolora* and *Gastrophysa-viridula* (Coleoptera, Chrysomelidae). In: *Journal of Chemical Ecology* 20 (1994), Nr. 8, S. 2089–2097
- [107] VEITH, M. ; OLDHAM, N. J. ; DETTNER, K. ; PASTEELS, J. M. ; BOLAND, W.: Biosynthesis of defensive allomones in leaf beetle larvae: Stereochemistry of salicylalcohol oxidation in *Phratora vitellinae* and comparison of enzyme substrate and stereospecificity with alcohol oxidases from several iridoid producing leaf beetles. In: *Journal of Chemical Ecology* 23 (1997), Nr. 2, S. 429–443
- [108] SOETENS, P. ; PASTEELS, J. M. ; DALOZE, D.: A Simple Method For in-Vivo Testing of Glandular Enzymatic- Activity On Potential Precursors of Larval Defensive Compounds in *Phratora*-Species (Coleoptera, Chrysomelinae). In: *Experientia* 49 (1993), Nr. 11, S. 1024–1026
- [109] PASTEELS, J. M. ; ROWELL-RAHIER, M. ; BRAEKMAN, J. C. ; DUPONT, A.: Salicin From Host Plant As Precursor of Salicylaldehyde in Defensive Secretion of Chrysomeline Larvae. In: *Physiological Entomology* 8 (1983), Nr. 3, S. 307–314
- [110] BRUCKMANN, M. ; TERMONIA, A. ; PASTEELS, J. M. ; HARTMANN, T.: Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretions of *Chrysomela populi* and *Phratora vitellinae* (Chrysomelina). In: *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 32 (2002), Nr. 11, S. 1517–1523
- [111] HILKER, M. ; SCHULZ, S.: Composition of Larval Secretion of *Chrysomela lapponica* (Coleoptera, Chrysomelidae) and Its Dependence on Host-Plant. In: *Journal of Chemical Ecology* 20 (1994), Nr. 5, S. 1075–1093
- [112] SCHULZ, S. ; GROSS, J. ; HILKER, M.: Origin of the defensive secretion of the leaf beetle *Chrysomela lapponica*. In: *Tetrahedron* 53 (1997), Nr. 27, S. 9203–9212
- [113] OSSIPOV, V. ; NURMI, K. ; LOPONEN, J. ; HAUKIOJA, E. ; PIHLAJA, K.: High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. In: *Journal of Chromatography* 721 (1996), Nr. 1, S. 59–68
- [114] SOETENS, P. ; PASTEELS, J. M. ; DALOZE, D. ; KAISIN, M.: Host plant influence on the composition of the defensive secretion of *Chrysomela vigintipunctata* larvae (Coleoptera : Chrysomelidae). In: *Biochemical Systematics and Ecology* 26 (1998), Nr. 7, S. 703–712
- [115] LABEYRIE, E. ; DOBLER, S.: Molecular adaptation of Chrysochus leaf beetles to toxic compounds in their food plants. In: *Molecular Biology & Evolution* 21 (2004), Nr. 2, S. 218–221

- [116] BERG, Jeremy M. ; TYMOCZKO, John L. ; STRYER, Lubert: *Biochemie*. Heidelberg; Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 2003 (5. Auflage)
- [117] ATKINS, Peter W.: *Physikalische Chemie*. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo : VCH, 1996 (2. Auflage)
- [118] T., Arland ; HOTCHKISS, Jr. ; TOWNSEND, R. R. (Hrsg.): *Techniques in glycobiology*. New York; Basel; Hong Kong : Marcel Dekker, Inc., 1997
- [119] JACKSON, Peter (Hrsg.) ; GALLAGHER, John T. (Hrsg.): *A laboratory guide to glycoconjugate analysis*. Basel; Boston; Berlin : Birkhäuser, 1997
- [120] CAREY, Francis A. ; SUNDBERG, Richard J.: *Organische Chemie*. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1995
- [121] SMITH, Michael ; MARCH, Jerry: *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 2001 (5th ed.)
- [122] LINDHORST, Thisbe L.: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Weinheim : Wiley-VCH, 2000
- [123] BEAU, J. M. ; SINAY, P.: Preparation and Reductive Lithiation of 2-Deoxy-D- Glucopyranosyl Phenylsulfones - a Highly Stereoselective Route to C-Glycosides. In: *Tetrahedron Letters* 26 (1985), Nr. 50, S. 6185–6188
- [124] KUNZ, H. ; WEISSMÜLLER, J. ; MÜLLER, B.: Stereoselective C-Glycoside Synthesis through the Titanium(Iv) Catalyzed Addition of Silyl Enol Ethers to 3-Acyloxy-3-Keto- Glycals. In: *Tetrahedron Letters* 25 (1984), Nr. 33, S. 3571–3574
- [125] BEAU, J. M. ; SINAY, P.: D-Glycopyranosyl Phenylsulfones - Acylation of Their Lithiated Anions and Reductive Desulfonylation of the Resulting Acylated Sulfones - a Synthesis of Alpha-D-C-Glycosides. In: *Tetrahedron Letters* 26 (1985), Nr. 50, S. 6193–6196
- [126] LEHMANN, Jochen: *Kohlenhydrate: Chemie und Biologie*. Stuttgart; New York : Georg Thieme Verlag, 1996 (2., neubearbeitete und erweiterte Auflage)
- [127] SINAY, P.: Carbohydrate-Chemistry of the Anomeric Carbon-Sulfur Bond. In: *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* 95-6 (1994), Nr. 1-4, S. 89–102
- [128] WITCZAK, Z. J.: Thio sugars: Biological relevance as potential new therapeutics. In: *Current Medicinal Chemistry* 6 (1999), Nr. 2, S. 165–178
- [129] FELD, B. K.: *Evolution der Wehrchemie von Blattkäferlarven: Glucosid-Analoga zur Aufklärung von Transport-Mechanismen*, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Dissertation, 2001

- [130] SHIMAMOTO, T. ; SAITO, S. ; TSUCHIYA, T.: Value of Heptyl-Beta-D-Thiogluco-
side, a New Nonionic Detergent, in Studies on Membrane-Proteins. In: *Journal of Biochemistry* 97 (1985), Nr. 6, S. 1807–1810
- [131] TSUCHIYA, T. ; SAITO, S.: Use of Normal-Octyl-Beta-D-Thiogluco-
side, a New Nonionic Detergent, for Solubilization and Reconstitution of Membrane-
Proteins. In: *Journal of Biochemistry* 96 (1984), Nr. 5, S. 1593–1597
- [132] SONE, N.: Measurement of Proton Pump Activity of the Thermophilic Bacterium *Ps3* and
Nitrobacter-Agilis at the Cytochrome-Oxidase Level Using Total Membrane and Heptyl Thioglu-
co-
side. In: *Journal of Biochemistry* 100 (1986), Nr. 6, S. 1465–1470
- [133] YUASA, H. ; SAOTOME, C. ; KANIE, O.: Design syntheses of inhibitors of glycoenzymes. In:
Trends in Glycoscience and Glycotechnology 14 (2002), Nr. 78, S. 231–251
- [134] MIZUMA, T. ; HAGI, K. ; AWAZU, S.: Intestinal transport of beta-thioglycosides by Na⁺/glucose
cotransporter. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52 (2000), Nr. 3, S. 303–310
- [135] KOENIGS, W. ; KNORR, E.: Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. Mittei-
lung aus dem chemischen Laboratorium der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Mün-
chen. In: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft zu Berlin* 34 (1901), S. 957–981
- [136] TSVETKOV, Y. E. ; BYRAMOVA, N. E. ; BACKINOWSKY, L. V.: A Simple Preparation of Aromatic
1-Thioglycosides. In: *Carbohydrate Research* 115 (1983), Nr. APR, S. 254–258
- [137] GERZ, M. ; KESSLER, H. ; MATTER, H.: S-glycosylierte Cyclopeptide. In: *Angewandte Chemie*
105 (1993), Nr. 2, S. 311–314
- [138] MITSUNOBU, O.: The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and
Transformation of Natural Products. In: *Synthesis* (1981), Nr. 1, S. 1–28
- [139] FALCONER, R. A. ; JABLONKAI, I. ; TOTH, I.: Efficient synthesis of thioglycosides via a Mitsunobu
condensation. In: *Tetrahedron Letters* 40 (1999), Nr. 49, S. 8663–8666
- [140] UNELIUS, C. R. ; NORIN, T.: A short Synthesis of Gastrolactone. In: *Natural Product Letters* 5
(1994), S. 61–68
- [141] HOPFF, H. ; OSMAN, M. A.: Vinyl-Interchange Reaction .2. Vinyl Acetate with Carboxylic Acids
Weaker Than Acetic Acid. In: *Tetrahedron* 24 (1968), Nr. 10, S. 3887–
- [142] GAO, C. L. ; MAYON, P. ; MACMANUS, D. A. ; VULFSON, E. N.: Novel enzymatic approach to
the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. In: *Biotechnology and Bioengineering* 71
(2001), Nr. 3, S. 235–243

- [143] NAKAGAWA, H. ; OKIMOTO, Y. ; SAKAGUCHI, S. ; ISHII, Y.: Synthesis of enol and vinyl esters catalyzed by an iridium complex. In: *Tetrahedron Letters* 44 (2003), Nr. 1, S. 103–106
- [144] YAN, Y. C. ; BORNSCHEUER, U. T. ; CAO, L. Q. ; SCHMID, R. D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters - Removal of byproducts by azeotropic distillation. In: *Enzyme and Microbial Technology* 25 (1999), Nr. 8-9, S. 725–728
- [145] LJUNGER, G. ; ADLERCREUTZ, P. ; MATTIASSON, B.: Enzymatic-Synthesis of Octyl-Beta-Glucoside in Octanol at Controlled Water Activity. In: *Enzyme and Microbial Technology* 16 (1994), Nr. 9, S. 751–755
- [146] DANIELI, B. ; LUISETTI, M. ; SAMPOGNARO, G. ; CARREA, G. ; RIVA, S.: Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 3 (1997), Nr. 1-4, S. 193–201
- [147] KONTOGIANNI, A. ; SKOURIDOU, V. ; SERETI, V. ; STAMATIS, H. ; KOLISIS, F. N.: Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. In: *European Journal of Lipid Science and Technology* 103 (2001), Nr. 10, S. 655–660
- [148] BIANCO, A. ; MELCHIONI, C. ; ORTAGGI, G. ; ROMAGNOLI, P. ; BRUFANI, M.: Regioselective acetylation of primary hydroxyl function of sialic acid and selective hydrolysis of its derivatives with lipase from *Candida rugosa*. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 3 (1997), Nr. 1-4, S. 209–212
- [149] BOLAND, W. ; FROSSL, C. ; LORENZ, M.: Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic-Synthesis. In: *Synthesis-Stuttgart* (1991), Nr. 12, S. 1049–1072
- [150] CAO, L. Q. ; BORNSCHEUER, U. T. ; SCHMID, R. D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. In: *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 6 (1999), Nr. 3, S. 279–285
- [151] GODERIS, H. L. ; AMPE, G. ; FEYTEN, M. P. ; FOUWE, B. L. ; GUFFENS, W. M. ; VAN CAUWENBERGH, S. M. ; TOBBACK, P. P.: Lipase-Catalyzed Ester Exchange-Reactions in Organic Media with Controlled Humidity. In: *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987), Nr. 2, S. 258–266
- [152] BARTSCH, Dr.-Ing. Hans-Jochen: *Taschenbuch mathematischer Formeln*. Leipzig - Köln : Fachbuchverlag, 1994 (16., verbesserte Auflage)
- [153] GERTHSEN, Christian ; VOGEL, Helmut: *Physik*. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Brcelona; Budapest : Springer-Verlag, 1993 (17. Auflage)

- [154] SOETENS, P. ; ROWELL-RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M.: Influence of Phenolglucosides and Trichome Density On the Distribution of Insects Herbivores On Willows. In: *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 59 (1991), Nr. 2, S. 175–187
- [155] TOPP, W. ; KULFAN, J. ; ZACH, P. ; NICOLINI, F.: Beetle assemblages on willow trees: do phenolic glycosides matter? In: *Diversity & Distributions* 8 (2002), Nr. 2, S. 85–106
- [156] HALLGREN, P. ; IKONEN, A. ; HJALTEN, J. ; ROININEN, H.: Inheritance patterns of phenolics in F1, F2, and back-cross hybrids of willows: Implications for herbivore responses to hybrid plants. In: *Journal of Chemical Ecology* 29 (2003), Nr. 5, S. 1143–1158
- [157] RUUHOLA, T. M. ; SIPURA, M. ; NOUSIAINEN, O. ; TAHVANAINEN, J.: Systemic induction of salicylates in *Salix myrsinifolia* (Salisb.). In: *Annals of Botany* 88 (2001), Nr. 3, S. 483–497
- [158] SKATRUD, Paul L.: The impact of multiple drug resistance (MDR) proteins on chemotherapy and drug discovery. In: *Progress in Drug Research* 58 (2002), S. 99–131
- [159] ROWELL-RAHIER, M. ; PASTEELS, J. M.: Economics of Chemical Defense in Chrysomelinae. In: *Journal of Chemical Ecology* 12 (1986), Nr. 5, S. 1189–1203
- [160] JULKUNENTIITTO, R. ; ROUSI, M. ; BRYANT, J. ; SORSA, S. ; KEINANEN, M. ; SIKANEN, H.: Chemical diversity of several betulaceae species - comparison of phenolics and terpenoids in northern birch stems. In: *Trees Structure & Function* 11 (1996), Nr. 1, S. 16–22
- [161] MASSEY, V.: The chemical and biological versatility of riboflavin. In: *Biochemical Society Transactions* 28 (2000), S. 283–296
- [162] DAY, J. C. ; TISI, L. C. ; BAILEY, M. J.: Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. In: *Luminescence* 19 (2004), Nr. 1, S. 8–20
- [163] GOMI, K. ; KAJIYAMA, N.: Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 39, S. 36508–36513
- [164] GOMI, K. ; HIROKAWA, K. ; KAJIYAMA, N.: Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding luciferin-regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*. In: *Gene* 294 (2002), Nr. 1-2, S. 157–166
- [165] SUZUKI, N. ; GOTO, T.: Firefly Bioluminescence 2. Identification of 2-(6'-Hydroxybenzothiazol-2'-Yl)-4-Hydroxthiazole as a Product in Bioluminescence of Firefly Lanterns and as a Product in Chemiluminescence of Firefly Luciferin in DmsO. In: *Tetrahedron Letters* (1971), Nr. 22, S. 2021–
- [166] OKADA, K. ; IIO, H. ; KUBOTA, I. ; GOTO, T.: Firefly Bioluminescence 3. Conversion of Oxyluciferin to Luciferin in Firefly. In: *Tetrahedron Letters* (1974), Nr. 32, S. 2771–2774

- [167] BEUERLE, T. ; SCHWAB, W.: Biosynthesis of octane-1,3-diol in apple fruit. In: *Phytochemistry* 45 (1997), Nr. 6, S. 1153–1155
- [168] BEUERLE, T. ; SCHWAB, W.: Biosynthesis of R-(+)-octane-1,3-diol. Crucial role of beta-oxidation in the enantioselective generation of 1,3-diols in stored apples. In: *Lipids* 34 (1999), Nr. 6, S. 617–625
- [169] VURALHAN, Zeynep ; MORAIS, Marcos A. ; TAI, Siew-Leng ; PIPER, Matthew D. W. ; PRONK, Jack T.: Identification and Characterization of Phenylpyruvate Decarboxylase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), Nr. 8, S. 4534–4541
- [170] SÆ, Astrid R. B. ; BARTRAM, Stefan ; GATTO, Nathalie ; BOLAND, Wilhelm: Are Iridoids in Leaf Beetle Species Larvae Synthesized *de novo* or Derived from Plant Precursors? A Methodological Approach. In: *Isotopes in Environmental and Health Studies* 00 (2004), S. 1–6
- [171] KOHATA, K. ; MEGURO, H.: Chiroptical Studies of the Aromatic Glycosides 2. Extension of the Ring Oxygen Helicity Rule to Phenyl 1-Thioglycopyranosides. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (1982), Nr. 4, S. 919–925
- [172] MAHADEVAN, A. ; LI, C. ; FUCHS, P. L.: Silver Fluoroborate Promoted Sulfur Alkylation of Beta-Silyl Ethyl Sulfides - Selective Synthesis of Beta-Thioglycosides. In: *Synthetic Communications* 24 (1994), Nr. 21, S. 3099–3107
- [173] GRIFFIN, G. W. ; BANDARA, N. C. ; CLARKE, M. A. ; TSANG, W. S. ; GAREGG, P. J. ; OSCARSON, S. ; SILWANIS, B. A.: Photoinduced Generation of Glycosyl Cations from Thioglycosides. In: *Heterocycles* 30 (1990), Nr. 2, S. 939–947
- [174] STANEK, J. ; MALKOVSKY, K. ; NOVAK, M. ; PETRICEK, D.: The reaction of 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glucopyranosyl bromide with mercaptans. In: *Chemické Listy pro Vědu a Průmysl* 51 (1957), S. 1556–8
- [175] KONDO, H. ; AOKI, S. ; ICHIKAWA, Y. ; HALCOMB, R. L. ; RITZEN, H. ; WONG, C. H.: Glycosyl Phosphites as Glycosylation Reagents - Scope and Mechanism. In: *Journal of Organic Chemistry* 59 (1994), Nr. 4, S. 864–877
- [176] LIN, C. C. ; HSU, T. S. ; LU, K. C. ; HUANG, I. T.: Synthesis of beta-D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)-1-thiol-beta-glucosamine disaccharide derivative as building block for the synthesis of hyaluronic acid. In: *Journal of the Chinese Chemical Society* 47 (2000), Nr. 4B, S. 921–928
- [177] CHANG, C. J. ; FLOSS, H. G. ; STECK, W.: C-13 Magnetic-Resonance Spectroscopy of Coumarins - C-13-Proton Long-Range Couplings. In: *Journal of Organic Chemistry* 42 (1977), Nr. 8, S. 1337–1340

- [178] VANKAYALAPATI, H. ; SINGH, G.: Stereoselective synthesis of alpha-L-Fucp-(1,2)- and -(1,3)-beta-D-Galp(1)-4-methylumbelliferone using glycosyl donor substituted by propane-1,3-diyl phosphate as leaving group. In: *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (2000), Nr. 14, S. 2187–2193
- [179] ROWAN, D. D. ; LANE, H. P. ; ALLEN, J. M. ; FIELDER, S. ; HUNT, M. B.: Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996), Nr. 10, S. 3276–3285
- [180] MALET, Carles ; VILADOT, Josep L. ; OCHOA, Ana ; GALLEGO, Belen ; BROSA, Carme ; PLANAS, Antoni: Synthesis of 4-methylumbelliferyl-[beta]-D-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1 -> 3),(1 -> 4)-[beta]-D-glucan 4-glucanohydrolases. In: *Carbohydrate Research* 274 (1995), S. 285–301
- [181] MOTAWIA, Mohammed S. ; OLSEN, Carl E. ; ENEVOLDSEN, Karen ; MARCUSSEN, Jan ; MOLLER, Birger L.: Chemical synthesis of 6'-[alpha]-maltosyl-maltotriose, a branched oligosaccharide representing the branch point of starch. In: *Carbohydrate Research* 277 (1995), Nr. 1, S. 109–123
- [182] MONTGOMERY, E. M. ; RICHTMYER, N. K. ; HUDSON, C. S.: Attempts to Find New Antimalarials 8. Phenyl Beta-D-Glucothiosides, Diphenyl Disulfides, Phenyl Thiocyanates, and Related Compounds. In: *Journal of Organic Chemistry* 11 (1946), Nr. 3, S. 301–306
- [183] PAKULSKI, Zbigniew ; PIEROZYNSKI, Donat ; ZAMOJSKI, Aleksander: Reaction of sugar thiocyanates with Grignard reagents. New synthesis of thioglycosides. In: *Tetrahedron* 50 (1994), Nr. 9, S. 2975–2992
- [184] PURVES, C. B.: Relations between rotatory power and structure in the sugar group XXI. Beta-thiophenol glycoside of glucose, xylose, lactose and cellobiose. In: *Journal of the American Chemical Society* 51 (1929), S. 3619–3623
- [185] HOLLAND, C. V. ; HORTON, D. ; MILLER, M. J.: Nuclear Magnetic Resonance Studies on Acetylated 1-Thioaldopyranose Derivatives. In: *Journal of Organic Chemistry* 32 (1967), Nr. 10, S. 3077–3086
- [186] MAGNUSSON, G.: Carbohydrate Thio Ortho Esters 3. Transformation to Thioglycosides with Deactivated Raney-Nickel. In: *Journal of Organic Chemistry* 42 (1977), Nr. 5, S. 913–914
- [187] MAGNUSSON, G.: Carbohydrate Thio Ortho Esters - Synthesis and Characterization. In: *Journal of Organic Chemistry* 41 (1976), Nr. 26, S. 4110–4112

- [188] CHENG, M. S. ; WANG, Q. L. ; TIAN, Q. ; SONG, H. Y. ; LIU, Y. X. ; LI, Q. ; XU, X. ; MIAO, H. D. ; YAO, X. S. ; YANG, Z.: Total synthesis of methyl protodioscin: A potent agent with antitumor activity. In: *Journal of Organic Chemistry* 68 (2003), Nr. 9, S. 3658–3662
- [189] TSVETKOV, Y. E. ; BAKINOVSKII, L. V. ; KOCHETKOV, N. K.: The Effect of Substituents at the Sulfur Atom on the Glycosylating Activity of D-Glucose Thioorthoesters. In: *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* 32 (1983), Nr. 2, S. 397–401
- [190] JIANG, Y. J. ; ZHOU, L. M. ; WANG, Q. H. ; ZHU, D. Q. ; LIU, X. L.: Chiral separation mechanism of derivatized secondary alcohols on permethylated-beta-cyclodextrin stationary phase. In: *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 28 (2000), Nr. 1, S. 106–110
- [191] DING, Y. L. ; LIU, Y. T.: Stereoselective Syntheses of Acetylated Ortho-Tolyl 1-Thioglycosides. In: *Carbohydrate Research* 209 (1991), S. 306–310
- [192] OGAWA, T. ; MATSUI, M.: New Approach to 1-Thioglycosides by Lowering Nucleophilicity of Sulfur through Trialkylstannylation. In: *Carbohydrate Research* 54 (1977), Nr. 1, S. C17–C21
- [193] SHIMADATE, T. ; CHIBA, S. ; INOUE, K. ; IINO, T. ; HOSOYAMA, Y.: The Fusion Synthesis of Aryl 1-Thioglycosides. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 55 (1982), Nr. 11, S. 3552–3554
- [194] FERRIER, R. J. ; FURNEAUX, R. H.: 1,2-trans-1-Thioglycosides. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry* 8 (1980), S. 251–253
- [195] ISHIGURO, S. ; ARAI, Y. ; SEKIYA, M. ; TANOOKA, H.: Search for Radio-Protective Compounds in Thioglucoside Derivatives. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 20 (1972), Nr. 6, S. 1332–1334
- [196] HAUSER, C. R. ; CHAMBERS, W. J.: The Alkylation of Tertiary Esters of Dialkylacetic Acids by Means of Alkali Amides - Synthesis of Trialkylacetic Acids. In: *Journal of the American Chemical Society* 78 (1956), Nr. 15, S. 3837–3841
- [197] VARGAS-BERENGUEL, A. ; MELDAL, M. ; PAULSEN, H. ; JENSEN, K. J. ; BOCK, K.: Synthesis of Glycosyltyrosine Building-Blocks for Solid-Phase Glycopeptide Assembly - Use of Aryl Tert-Butyl Ethers as Glycosyl Acceptors in Aromatic Glycosylations. In: *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (1994), Nr. 22, S. 3287–3294
- [198] SACHS, Lothar: *Angewandte Statistik*. 9. Berlin : Springer Verlag, 1999

Persönliche Daten

Lebenslauf

Name: Jürgen Kuhn
Adresse: Friedrich-Körner-Str. 7
07745 Jena
Nationalität: Deutsch
Geburtsdatum: 02. September 1973

Schule und Wehrdienst

Jun. 1993 Abitur am Montessori-Gymnasium in Köln
Jul. 1993 - Jun. 1994 Wehrdienst als Sanitätssoldat

Studium

Okt. 1994 - Sep. 2000 Chemiestudium an der Universität zu Köln
29. April 1997 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Sep. 1997 - Sep. 1998 Urlaubssemester wegen Unfall
Apr. 1999 - Jul. 1999 Auslandssemester an der Universität in Bern, Schweiz; Arbeitskreis von Prof. Leumann; Synthese von Kohlenhydraten und Oligonucleotiden
Jan. 2000 - Jul. 2000 Diplomarbeit bei der BAYER AG, Leverkusen; Bestimmung der Hansen-Parameter von Polymeren und Wirkstoffen mit Hilfe thermodynamischer Überlegungen
09. August 2000 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Jan. 2001 - Dez. 2001 Beratertätigkeit bei der BAYER AG, Leverkusen; Entwicklung von Löslichkeit vorhersagender Software
Okt. 2001 - Feb. 2002 Codozent: Chemie für Optiker; Fachhochschule Jena

Okt. 2000 - Jan. 2005

Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Chemische
Ökologie, Jena; Diversität der Wehrchemie von Blatt-
käferlarven — Sequestrierung und *de novo* Synthese
als Aspekte der Evolution von Chrysomeliden

Liste der Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

KUHN, J.; PETTERSSON, E. M.; FELD, B. K.; BURSE, A.; TERMONIA, A.; PASTEELS, J. M.; BOLAND, W.: Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004), Nr. 38, S. 13808–13813

Juli 2000 KUHN, JÜRGEN: Bestimmung der Hansen-Parameter von Polymeren und Wirkstoffen mit Hilfe thermodynamischer Überlegungen. Universität zu Köln, BAYER Stiftungsprofessur Technische Chemie, Diplomarbeit, 2000 (Eigentum der BAYER AG, Leverkusen).

Vorträge

- April 2004 Symposiumsvortrag: Evolution der Wehrchemie von chrysomeliden Blattkäferlarven, Tagung: *Multitrophische Interaktionen*, Göttingen.
- Dezember 2002 Eingeladenes Seminar: Evolution des Transportsystems für Wehrsubstanzen bei Blattkäferlarven, Arbeitskreis Prof. Dr. Hilker, Institut für Biologie, Freie Universität Berlin.
- November 2002 Symposiumsvortrag: Understanding sequestration: Thioglycosides as valuable tools to study ingestion of plant derived glycosides by insects, *Meeting of the Green Max-Planck-Institutes*, Berlin.
- August 2002 Symposiumsvortrag: Selective thioglycoside-transport from gut to defence glands in chrysomelid leaf beetle larvae, *International Society of Chemical Ecology 19th Annual Meeting*, Hamburg.
- Oktober 2001 Symposiumsvortrag: Selektiver Transport von Thioglycosiden im Darm und Wehrdrüsen von chrysomeliden Blattkäferlarven, *Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen*, Bayreuth.

Posterpräsentationen

- Januar 2003 Sequestration of plant derived glucosides by leaf beetle larvae: phylogeny and mechanism of glycoside transporters, *DFG-Schwerpunktprogramm 1152 „Evolution of metabolic diversity“*.
- Februar 2002 Selektiver Transport von Thioglycosiden im Darm und Wehrdrüsen von chrysomeliden Blattkäferlarven, *14. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e. V.*

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die interessante Themenstellung und umfassende Betreuung meiner Arbeit, Herrn Prof. Dr. Jacques Pasteels für die Versorgung mit Abermillionen von Blattkäferlarven und seine hilfreichen Diskussionen und Anregungen aus der Sicht eines Biologen und Herrn Prof. Dr. Ernst Anders für die Betreuung von Seiten der Universität Jena.

Herrn Prof. Dr. David Haeckel danke ich für die umfangreiche Hilfe bei den BLAST-Suchen.

Außerdem danke ich Dr. Birte Feld für die Einarbeitung in das Thema, und natürlich Dr. Antje Burse, Dr. Eva Petterson und Claes Johansson, die meine Arbeit während meiner Krankenhausaufenthalte weitergeführt haben.

Dr. Jürgen Gross möchte ich für die Beschaffung der tschechischen *C. lapponica* und Dr. Seppo Neuvonen für die Versorgung mit finnischen *C. lapponica* danken.

Sabrina Discher war so nett, mir einige ihrer Käferphotos und die Larvenzeichnung zur Verfügung zu stellen, wofür ihr mein herzlicher Dank gebührt.

Ich danke meinen Arbeitskollegen Sven Adolph, Dr. Susanna Andersson, Dr. Gen Arimura, Dr. Stefan Bartram, Dr. Christoph Beckmann, Vera Bauke, Dr. Nicolas Delaroque, Dr. Rüdiger Dietrich, Matthias Funke, Dr. Nathalie Gatto, Andreas Habel, Dr. Martin Heil, Dr. Dequan Hui, Christian Kost, Margit Leitner, Dr. Ulrich Lion, Dr. Mathias Maitrejean, Sandy Manthej, Dr. Axel Mithöfer, Dr. Kristina Münich, Dr. Lihua Nie, Dr. Jörn Piel, Liyan Ping, Kerstin Ploß, Dr. Georg Pohnert, Mareike Richter, Doreen Schachtschnabel, Annika Schmidt, Birgit Schulze, Dr. Astrid Søre, Jian-Wen Tan, Karla Tolzin, Agnes Walter, Thomas Wichard, Theresa Wiesemeier, Katrin Zimmermann, Dr. Christoph Steinbeck, Yvonne Höfer, Dr. Dieter Spittler, Dr. Verena Jung, Dr. Oliver Fietz, Dr. Göde Schüler, Ryan Lauchli für das angenehme Arbeitsklima und ihre Unterstützung.

Dank gebührt ebenfalls meinem HiWi Swen Körsten.

Grit Winnefeld bin ich außerordentlich dankbar für die hilfreiche Unterstützung bei allen zeit- und nervenraubenden Verwaltungsangelegenheiten.

Daneben möchte ich noch Janine Rattke, Dr. Ales Svatos und Sybille Koch für die Aufnahme von MS-Spektren sowie Dr. Renate Ellinger und Dr. Bernd Schneider für die Aufnahme von NMR-Spektren danken.

Dr. Rita Büchler danke ich für die Unterstützung bei allen biochemischen Problemen, insbesondere bei den Arbeiten mit Proteinen.

Für die liebevolle Betreuung meiner Larven möchte ich Angelika Berg, Andrea Lehr und Anja Biedermann danken.

Linda Müller und Simone Bieniek danke ich ganz besonders für die freundliche Hilfe, Betreuung und Versorgung mit Literatur von Seiten der Bibliothek.

Für das Korrekturlesen möchte ich mich bei Dr. Antje Burse, Dr. Georg Pohnert und Dr. Christian Hoppe bedanken.

Ich danke meinem Neurochirurgen Dr. Andreas Schmitz und meiner Physiotherapeutin Manuela Mattes für die Wiederherstellung meiner Gesundheit, so daß diese Arbeit überhaupt entstehen konnte.

Für moralische Unterstützung gilt besonderer Dank Herrn Günter Hoffmann, meinem Kajaktrainer, Dr. Dr. Farshid Delshad, meinem Arabischlehrer, meiner Filmquelle Dr. John D'Auria, Dirk Schwethelm, Sandra Höttermann und Dr. Anna Ekberg.

Ein abschließendes Dankeschön allen Personen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, deren Wirken aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Selbstständigkeitserklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift der Verfassers