

**Synthese und Anwendung funktionalisierter Bisenoylacetate:
Neue Werkzeuge zur Aufklärung der Wundverschlussreaktion
der Grünalge *Caulerpa taxifolia* und zur selektiven Markierung
von Esterasen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Diplomchemiker Jerrit Weißflog
geboren am 6. Oktober 1980 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter

1. Prof. Dr. Georg Pohnert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Rainer Beckert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 16. 06. 2010

1	Einleitung.....	7
1.1	<i>Caulerpa taxifolia</i>	8
1.2	Verbreitung von <i>C. taxifolia</i> im Mittelmeer.....	10
1.3	Die Wundverschlusreaktion von <i>Caulerpa taxifolia</i>	12
1.4	Proteinquervernetzung.....	15
1.5	Der Sekundärmetabolit Caulerpenin.....	17
1.6	Modellreaktionen mit Caulerpenin.....	19
1.7	Synthese von Caulerpenin.....	23
2	Aufgabenstellung.....	25
3	Ergebnisse und Diskussion.....	27
3.1	Synthese eines fluoreszenten Analogons von Caulerpenin.....	27
3.1.1	Design der fluoreszenten Sonde.....	27
3.1.2	Syntheseplanung.....	28
3.1.3	Testreaktionen für den Aufbau der Bisenoylacetatfunktion.....	29
3.1.4	Testreaktionen zum Aufbau des Kohlenstoffgerüsts.....	38
3.1.5	Testreaktionen unter Verwendung der "Click"-Reaktion.....	45
3.1.6	Synthese der fluoreszenten Sonde mittels „Click“-Reaktion.....	49
3.2	In Vivo Experimente mit <i>Caulerpa taxifolia</i>	53
3.2.1	Verwundungsaktivierter Abbau von DY™-490-Bisenoylacetat.....	53
3.2.2	Beteiligung von DY™-490-Bisenoylacetat an der Proteinquervernetzung.....	57
3.2.3	Colokalisation von DY™-490-Bisenoylacetat und Protein im Wundverschluss.....	58
3.3	In-vitro-Untersuchungen mit DY™-490-Bisenoylacetat.....	67
3.3.1	Enzymatische Deacetylierung von DY™-490-Bisenoylacetat.....	67
3.3.2	Deacetylierungsversuche von DY™-490-Bisenoylacetat durch Base und Säure.....	74
3.3.3	In-vitro-Proteinquervernetzung mit DY™-490-Bisenoylacetat und Caulerpenin.....	77
3.3.4	Selektive kovalente Markierung von Esterasen mit DY™-490-Bisenoylacetat..	79
3.4	Bioassays zur Untersuchung der Fraßabwehr von <i>C. taxifolia</i>	87
3.4.1	Bioassays mit <i>Ulva spp.</i> und Caulerpenin.....	88
3.4.2	Bioassays mit „intakter“ und „verwundeter“ <i>C. taxifolia</i>	89
3.4.3	Bioassays mit verwundeter <i>C. taxifolia</i> und zugesetzten Lysin und Cystein.....	92
3.4.4	Bioassays mit verwundeter <i>C. taxifolia</i> und zugesetzten Protein.....	93
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	97
5	Abkürzungsverzeichnis.....	101

6 Experimenteller Teil.....	105
6.1 Materialien und Geräte.....	105
6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	105
6.1.2 Chromatographische Trenn- und Analysemethoden.....	105
6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie.....	105
6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS).....	106
6.1.2.3 preparative Flüssigkeitschromatographie (prep. HPLC).....	107
6.1.2.4 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC).....	107
6.1.2.5 Säulenchromatographie.....	107
6.1.3 Puffer für Enzymreaktionen.....	108
6.1.3.1 Herstellung des Hydrogencarbonatpuffers (pH = 8,3).....	108
6.1.3.2 Herstellung des Phosphatpuffers bzw. Elutionspuffers (pH = 7,4).....	108
6.1.4 Gelelektrophorese.....	108
6.1.4.1 Herstellung eines 12 % Acrylamidgels.....	108
6.1.4.2 Herstellung des Ladepuffers.....	109
6.1.4.3 Herstellung des Elektrophoresepuffers.....	109
6.1.4.4 Proteinstandard.....	109
6.1.4.5 Entwicklung der Gele.....	109
6.1.5 Laser-Scanning-Mikroskopie.....	110
6.2 Kulturbedingungen der Versuchsorganismen.....	110
6.2.1 Herstellung von künstlichem Seewasser.....	110
6.2.1.1 Herstellung von künstlichem Seewasser mit Instant Ocean.....	110
6.2.1.2 Herstellung von künstlichem Seewasser nach Maier und Calenberg.....	110
6.2.2 Kultivierung von <i>C. taxifolia</i>	112
6.2.3 Haltung der Flohkrebse.....	112
6.3 Isolierung von Caulerpenin aus <i>C. taxifolia</i>	112
6.4 Bioassays.....	113
6.4.1 Herstellung von künstlichem Futter auf Agarbasis.....	113
6.4.1.1 reines Kontrollfutter aus <i>Ulva</i> spp. („Kontrolle“).....	113
6.4.1.2 Caulerpenin-haltiges Futter aus <i>Ulva</i> spp. („Cyn.“).....	113
6.4.1.3 Futter aus <i>Ulva</i> spp. mit BSA bzw. Lysin und Cystein („Kontrolle + BSA“ bzw. „Kontrolle + Lys + Cys“).....	114
6.4.1.4 Futter basierend auf intakter <i>C. taxifolia</i> („Caul. intakt“).....	114
6.4.1.5 Futter basierend auf verwundeter <i>C. taxifolia</i> („Caul. verw.“).....	114
6.4.1.6 Futter basierend auf verwundeter <i>C. taxifolia</i> . mit BSA bzw. Lysin und Cystein („Caul. ver. + BSA“ bzw. „Caul. verw. + Lys + Cys“).....	114
6.4.2 Allgemeiner Versuchsaufbau der Choice Assays.....	115

6.4.3 Durchgeführte Choice Assays.....	115
6.5 <i>In-vivo</i> -Experimente mit DY™-490-Bisenoylacetat.....	116
6.5.1 <i>In-vivo</i> -Reaktion von DY™-490-Propargylamid und DY™-490-Bisenoylacetat in Gegenwart verwundeter <i>C. taxifolia</i>	116
6.5.2 Proteinanalyse von <i>C. taxifolia</i> mittels SDS-PAGE und DY™-490-Bisenoylacetat.....	116
6.5.2.1 Proteinextraktion aus intakter Alge.....	116
6.5.2.2 Proteinextraktion aus intakter Alge in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat.....	116
6.5.2.3 Proteinextraktion aus verwundeter Alge.....	117
6.5.2.4 Proteinextraktion aus verwundeter Alge in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat.....	117
6.5.3 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE, DY™-490-Bisenoylacetat und DY™-481XL-markierten Histons.....	117
6.5.3.1 Markieren von Histon (H1) mit DY™-481XL.....	117
6.5.3.2 SDS-PAGE der in Gegenwart der fluoreszenten Verbindungen extrahierten Algenproteine.....	118
6.5.4 Untersuchungen des Wundverschlusses von <i>C. taxifolia</i> mit Laser-scanning Mikroskopie.....	119
6.6 <i>In-vitro</i> -Experimente mit DY™-490-Bisenoylacetat.....	120
6.6.1 Deacetylierung von DY™-490-Bisenoylacetat.....	120
6.6.1.1 enzymatische Deacetylierung.....	120
6.6.1.2 Deacetylierung bei pH = 12.....	120
6.6.1.3 Deacetylierung bei pH = 2.....	120
6.6.2 Proteinquervernetzung mit Caulerpenin und Ovalbumin.....	121
6.6.3 Reaktion von DY™-490-Bisenoylacetat mit immobilisierter Schweineleberesterase.....	122
6.6.4 Reaktion von DY™-490-Bisenoylacetat mit DY™-481XL-Histon (H1) in Gegenwart von Esterase und Analyse mittels SDS-PAGE.....	122
6.6.5 Reaktion von DY™490-NHS Ester, DY™-490-Propargylamid und DY™490-Bisenoylacetat mit Ovalbumin in Gegenwart von Esterase und Analyse mittels SDS-PAGE.....	123
6.6.6 Reaktion von DY™-490-Bisenoylacetat mit nativen und denaturierten Esterasen und Analyse mittels SDS-PAGE.....	124
6.6.7 Reaktion von DY™490-Bisenoylacetat mit Lipasen und Esterasen.....	125
6.6 Chemische Synthesen.....	126
6.6.1 Synthese über Ozonolyse.....	126

6.6.1.1	Synthese von 2-Vinyl-pent-4-ennitrile.....	126
6.6.2	Syntheseroute über 5H-2-Furanone.....	126
6.6.2.1	Synthese von 4-Brom-5H-2-furanon.....	126
6.6.2.2	Synthese von 5-Oxo-2,5-dihydro-3-furanyltriflat.....	127
6.6.2.3	Synthese von 4-Vinyl-5H-2-furanon.....	127
6.6.2.4	Syntheseversuche von 2-Brom-4-oxo-2-butenylacetat.....	128
6.6.3	Syntheseroute über Cyclobutene.....	129
6.6.3.1	Synthese von 6-Hydroxymethyl-2,4-dioxabicyclo-[3.2.0]- 6-hepten-3-on.....	129
6.6.3.2	Synthese von 6-(2-Tetrahydropyranloxy)methyl)-2,4- dioxabicyclo-[3.2.0]-6-hepten-3-on.....	130
6.6.3.3	Synthese von 3-(2-Tetrahydropyranloxy)methyl)-3-cyclobuten-1,2-diol.....	131
6.6.3.4	Synthese von 1,2-Diacetoxy-3-(2-tetrahydropyranloxy)methyl)-3- Cyclobuten.....	132
6.6.3.5	Synthese von 3-Hydroxymethyl-3-cyclobuten-1,2-diol.....	133
6.6.4	Synthese von C4-Synthons und Kupplungspartnern.....	134
6.6.4.1	Synthese von 4-Acetoxybut-2-inol.....	134
6.6.4.2	Synthese von Essigsäure 4-(tetrahydropyran-2-yloxy)-but-2-inylester....	134
6.6.4.3	Synthese von (<i>E/Z</i>)-Essigsäure-4-(tetrahydropyran-2-yloxy)-2-iodbut-2- enylester.....	135
6.6.4.4	Synthese von 4-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-but-2-inol.....	135
6.6.4.5	Synthese von (<i>E/Z</i>)-4-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-3-iodbut-2-enol.....	136
6.6.4.6	Synthese von (<i>E</i>)-2-Tributylstannyl-2-buten-1,4-diol.....	137
6.6.4.7	Synthese von (<i>E</i>)-4- <i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy-2-tributylstannyl-2- butenol.....	137
6.6.4.8	Synthese von (<i>E</i>)-Essigsäure-4- <i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy-2-iod-2- Butenylester.....	138
6.6.4.9	Synthese von <i>N</i> -Boc-2-iodethylamin.....	139
6.6.4.10	Synthese von <i>N</i> -Boc-2- aminoethanal.....	140
6.6.5	Syntheseroute via „Click-Reaktion“.....	140
6.6.5.1	Synthese von 3-Azidopropanal.....	140
6.6.5.2	Synthese von (<i>E</i>)-5-Azido-2-[2-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-ethyliden]- pentan-1,3-diol.....	141
6.6.5.3	Synthese von (<i>E</i>)-5-Azido-2-[2-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)- ethyliden]-1,3 diacetoxypentan.....	142
6.6.5.4	Synthese von (<i>E</i>)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enol.....	143

6.6.5.5	Synthese von (<i>E</i>)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enal.....	144
6.6.5.6	Synthese von (1 <i>E/Z</i> , 3 <i>Z</i>) Essigsäure-4-acetoxy-2-(1-acetoxy-3-azidopropyl)-buta-1,3-dienylester.....	145
6.6.5.7	Synthese von DY™-490-Propargylamid.....	146
6.6.5.8	Synthese von (1 <i>E/Z</i> , 3 <i>Z</i>) N-(DY™-490)-Essigsäure-4-acetoxy-2-[1-acetoxy-3-(4-aminomethyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-propyl]-buta-1,3-dienylester (DY™-490-Bisenoylacetat).....	147
7	Literatur.....	149
8	Anhang.....	153

1 Einleitung

Während Tiere in der Lage sind vor Gefahren zu flüchten, sind sessile Organismen wie Pflanzen und Algen nicht in der Lage, schädlichen Umwelteinflüssen wie zum Beispiel Fraßfeinden durch Änderung des Standortes zu entgehen. Viele dieser Organismen entwickelten im Laufe ihrer Evolution Abwehrmechanismen gegen Fraßfeinde und Pathogene. Dabei können zwei grundlegende Strategien beobachtet werden. Die konstitutive Verteidigung umfasst physische Barrieren, wie z. B. Dornen oder verstärktes Gewebe, und chemische Abwehrstoffe, wie z. B. Toxine die permanent bei dem Organismus vorhanden sind. Bei der dynamischen Verteidigung werden die Abwehrmechanismen erst als Antwort auf eine bereits stattgefundene Verletzung oder Infektion in Gang gesetzt. Diese Abwehrmechanismen können unterschiedlicher Art sein. So können biochemische Prozesse eingeleitet werden, die beispielsweise zu einer Verstärkung der Zellwand führen, um weitere Beschädigung der Biomasse zu verhindern oder es werden giftige oder abschreckend wirkende Substanzen gebildet, die den angreifenden Herbivoren direkt abwehren.^[1, 2]

Aufgrund der hohen Aktivität und Selektivität der bei solchen Wundreaktionen gebildeten Verbindungen besteht ein großes Interesse daran, deren chemische Struktur und Wirkungsweise zu charakterisieren und deren Biosynthese bzw. Aktivierungsmechanismus aufzuklären. Oft werden diese Verbindungen durch organische Synthesechemie nachgebildet, um deren Eigenschaften auch außerhalb des Organismus zu erforschen und nutzbar machen zu können.

Eine sehr faszinierende Art der Wundreaktion wird bei der Klasse der siphonalen Grünalgen (Bryopsidophyceae) beobachtet. Diese Makroalgen sind dadurch charakterisiert, dass sie trotz ihrer Größe nur aus einer einzigen Zelle bestehen. Mehrzellige Organismen sind in der Lage eine verletzte Zelle durch Zellteilung im angrenzenden Gewebe zu ersetzen. Siphonale Grünalgen sind jedoch gezwungen ihre einzige Zelle zu reparieren, um das Ausfließen des gesamten Zellinhaltes zu verhindern. Aus diesem Grund bilden sie innerhalb von Sekunden nach Verletzung einen gelartigen Wundverschluss über der verwundeten Region aus, welcher die Wunde nach außen abgrenzt und Pathogene daran hindert, in die Zelle einzudringen und die Bildung einer neuen Zellwand ermöglicht (Abb. 1.1.1).

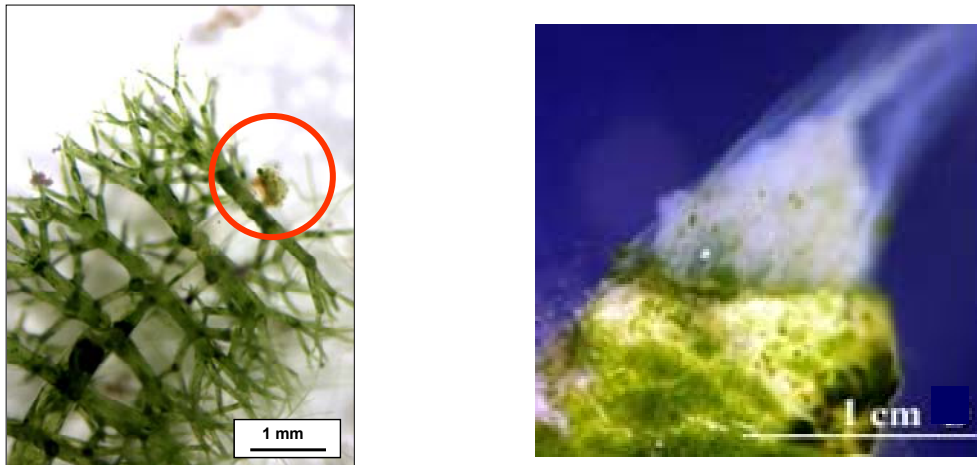


Abbildung 1.1.1: Wundverschlussbildung in verschiedenen siphonalen Grünalgen; links: *Dasycladus vermicularis*, rechts: *Halimeda tuna*.^[3]

1.1 *Caulerpa taxifolia*

Die ausschließlich marin vorkommende Alge *Caulerpa taxifolia* gehört zu den bekanntesten Vertretern der Bryopsidophyceae. Diese Klasse zählt taxonomisch zu den Grünalgen, daher sind diese Algen mit terrestrischen Pflanzen enger verwandt als mit den ebenfalls aquatisch vorkommenden Rot- und Braunalgen.



Abbildung 1.1.2: links: Verwandtschaftsgrad ausgewählter Abteilungen ermittelt durch 18S-rRNA-Analyse nach Mc Fadden et al.,^[4] Mitte: taxonomische Einordnung von *Caulerpa taxifolia*; rechts: *C. taxifolia* (Foto: Verena Jung)

Verglichen mit Landpflanzen ist *C. taxifolia* sehr einfach aufgebaut. So besteht diese einzige Zelle hauptsächlich aus einer zentralen Vakuole, welche, getrennt durch eine innere Zellwand, von einer dünnen Schicht Cytoplasma umgeben ist. Diese enthält sämtliche Zellorganellen sowie eine Vielzahl von Zellkernen. Um die Stabilität der schlauchförmigen Zelle zu gewährleisten, sind die inneren Zellwände mit Zellwandausstülpungen, sogenannter Trabekel, vernetzt.^[5,6] Der Aufbau von *C. taxifolia* ist schematisch in Abbildung 1.1.3 wiedergegeben.

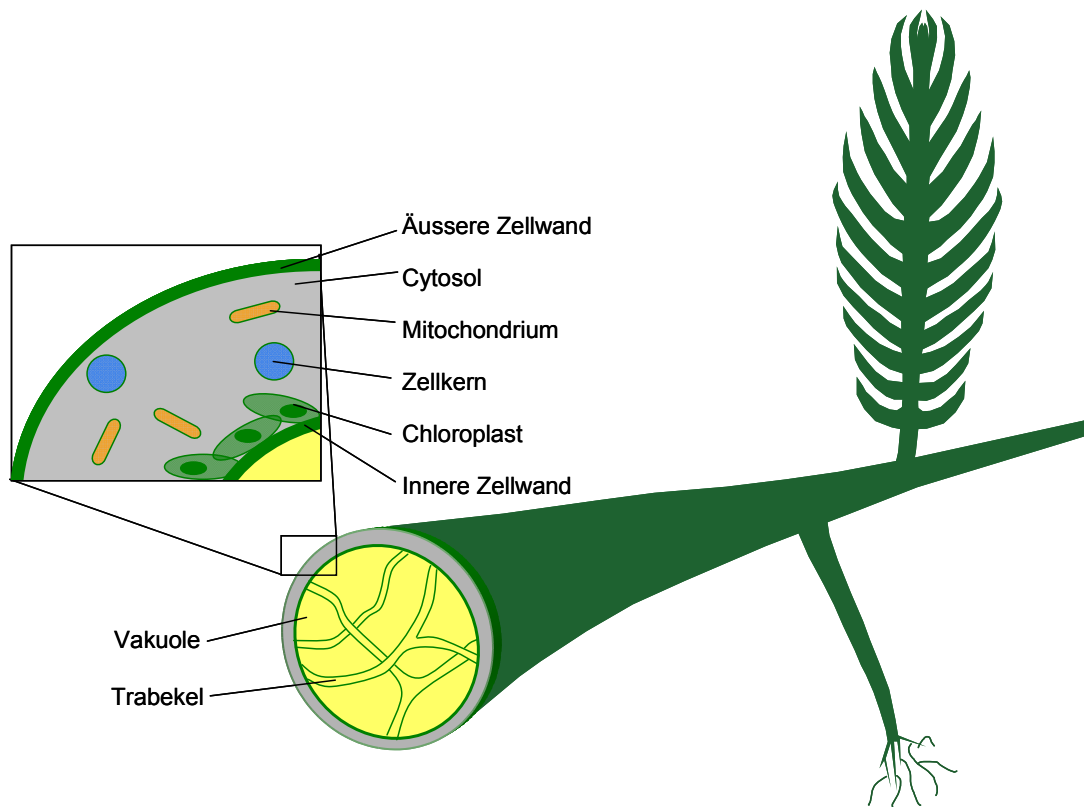


Abbildung 1.1.3: Schematischer Aufbau von *C. taxifolia*, die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Zusammensetzung des Cytoplasmas.

Trotz des einzelligen Charakters bildet die Alge drei morphologisch unterschiedliche Einheiten aus (Abb. 1.1.4):

- Stolon, der kriechende schlauchförmige Hauptstamm der Alge
- Rhizoide, wurzelartige Haftorgane, die zur Verankerung der Alge im Substrat dienen
- Assimilatoren, blattartige Auswüchse auf der Oberseite der Stolone



Abbildung 1.1.4:
Funktionelle Einheiten von *C. taxifolia* (Foto: Verena Jung)

1.2 Verbreitung von *Caulerpa taxifolia* im Mittelmeer

Die ursprünglich in den Tropen beheimatete *C. taxifolia* erlangte in den letzten Jahrzehnten zweifelhaften Ruhm, da sie sich als invasive Art innerhalb kurzer Zeit in anderen Regionen ausgebreitet hat und eine Gefahr für die dortigen Ökosysteme darstellt (Abb. 1.2.1).

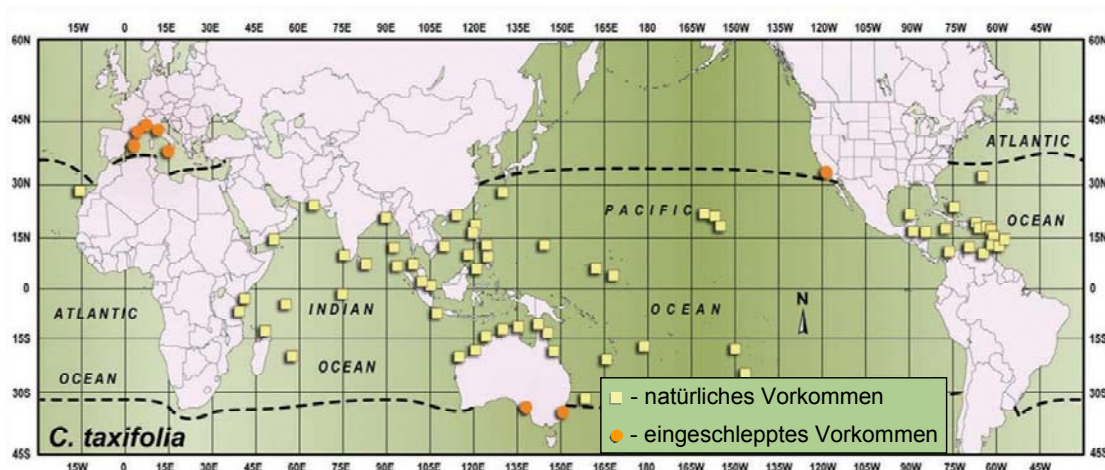


Abbildung 1.2.1: globale Verbreitung von *C. taxifolia*, (Darstellung der University of Southern California gemäß dem Stand von 2002 nach NIMPIS^[7])

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1984 vor der Küste Monacos breitete sich die Alge besonders im Mittelmeergebiet aus. Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung beschränkte sich die von

C. taxifolia eingenommene Fläche auf lediglich 1 m², 1990 waren bereits 3 ha bewachsen und nur drei Jahre später betrug die besiedelte Fläche mehr als 1000 ha.^[8]

Genetische Untersuchungen der Mittelmeerpoblution ergaben, dass es sich bei dieser um einen Klon handelt, der in Australien beheimatet ist und als Zieralge für Aquarien verwendet wird. Anhand dieser Studien ließ sich der Weg von *C. taxifolia* bis in das Ozeanische Institut von Monaco zurückverfolgen, von wo aus es vermutlich durch Reinigungsarbeiten in das Mittelmeer gelangte.^[9-11]

Die im Mittelmeer beheimatete *C. taxifolia* weist jedoch einige Eigenschaften auf, die sie von den tropischen Populationen unterscheidet. Beispielsweise können die Assimilatoren der mediterranen Variante eine Höhe von bis zu einem Meter und die Stolone eine Länge von mehreren Metern erreichen. Im Gegensatz dazu beschränkt sich das Höhenwachstum der tropischen Populationen auf wenige Zentimeter.^[12] Während *C. taxifolia* in den Tropen hauptsächlich sandige Böden bevorzugt und daher nur an definierten Stellen wächst, weist die im Mittelmeer verbreitete Variante eine hohe Substrattoleranz auf. Diese erlaubt es ihr, weitläufige zusammenhängende „Wiesen“ zu bilden und die lokale Flora komplett zu überwuchern (Abb. 1.2.2)



Abbildung 1.2.2: *Caulerpa taxifolia* überwuchert die im Mittelmeer heimische Flora, zum Beispiel das Seegrass *Posidonia oceanica* (Foto: Prof. Alexandre Meinesz)

Dadurch nimmt *C. taxifolia* enormen Einfluss auf die Artenvielfalt im Mittelmeer.^[8] Insbesondere die dort heimischen *Posidonia*-Felder, die einen Laichplatz für eine Vielzahl von Fischarten darstellen, werden durch die Alge bedroht.^[13] Zudem konnte in vergleichenden Studien von Phytalgemeinschaften mit und ohne *C. taxifolia* gezeigt werden, dass die Alge schrittweise eine Verarmung von Arten hervorruft, welches sogar in einer Monokultur von *C. taxifolia* enden kann.^[14]

Interessant ist, dass im Mittelmeer keine sexuelle Fortpflanzung der Alge wie in den Tropen zu beobachten ist, sondern ausschließlich ungeschlechtliche Reproduktion stattfindet.^[15] Die durch Fragmentierung entstandenen Bruchstücke von *C. taxifolia* können sich zu neuen Pflanzen entwickeln und auf diese Weise neue Kolonien bilden.^[16] Da *C. taxifolia* in der Lage ist bei 85 % Luftfeuchtigkeit, 18°C Umgebungstemperatur und ohne Licht zehn Tage außerhalb des Wassers zu überleben, können Algenfragmente in Fischernetzen oder auch in Ballastwassertanks von Schiffen verbreitet werden, was dazu führt, dass sich die Alge in weiteren Ökosystemen ansiedeln kann.^[17] Wie effektiv diese Vermehrungsstrategie ist, wird durch die Tatsache deutlich, dass es sich bei der gesamten Mittelmeerpopulation um einen einzigen, männlichen Klon handelt.^[9]

Bisher konnten nur wenige Herbivoren des Mittelmeeres, wie z. B. die marine Schnecke *Lobiger serradifalci*^[18], dabei beobachtet werden, *C. taxifolia* als Nahrungsquelle zu nutzen. Durch Befressen durch diese Schnecke werden weitere Algenfragmente erzeugt, was die Verbreitung der Alge begünstigt. Eine natürliche Kontrolle der Algen durch die im Mittelmeer heimischen Herbivoren konnte daher bisher nicht beobachtet werden.

1.3 Die Wundverschlussreaktion von *Caulerpa taxifolia*

Die Fähigkeit der schnellen Wundheilung ist bei *C. taxifolia* nicht nur für das Überleben einzelner Thalli notwendig, sondern auch essentieller Bestandteil ihrer Vermehrungsstrategie im Mittelmeer. Die Wundversiegelung erfolgt dabei derart schnell, dass nur ein minimaler Verlust an Zellinhalt eintritt. Durch diesen Prozess können sogar abgetrennte Fragmente von lediglich 1 cm Länge noch ausreichend Zellorganellen und Zellkerne enthalten, um zu neuen Pflanzen heranzuwachsen.^[16]

Der Verlauf der Wundverschlussbildung erfolgt prinzipiell in drei Schritten:^[5, 19, 20]

1. Unmittelbar nach der Verwundung entströmt ein Teil des Zellinhalts, aus welchem sich innerhalb weniger Minuten ein gelatinöser, externer Wundpfropf bildet und die Zelle nach außen hin versiegelt (Abb. 1.3.1 B).
2. Anschließend zieht sich das Cytoplasma zurück und es folgt die Bildung eines internen Wundverschlusses, wodurch der intakte Teil der Alge von der verwundeten Region abgegrenzt wird (Abb. 1.3.1 C).
3. Direkt unterhalb des internen Wundverschlusses bildet sich innerhalb von wenigen Tagen eine neue Zellwand, so dass erneut eine intakte, lebensfähige Zelle vorliegt. Der externe und der interne Wundpfropf werden im letzten Schritt abgestoßen und die Wundheilung ist abgeschlossen (Abb. 1.3.1 D).

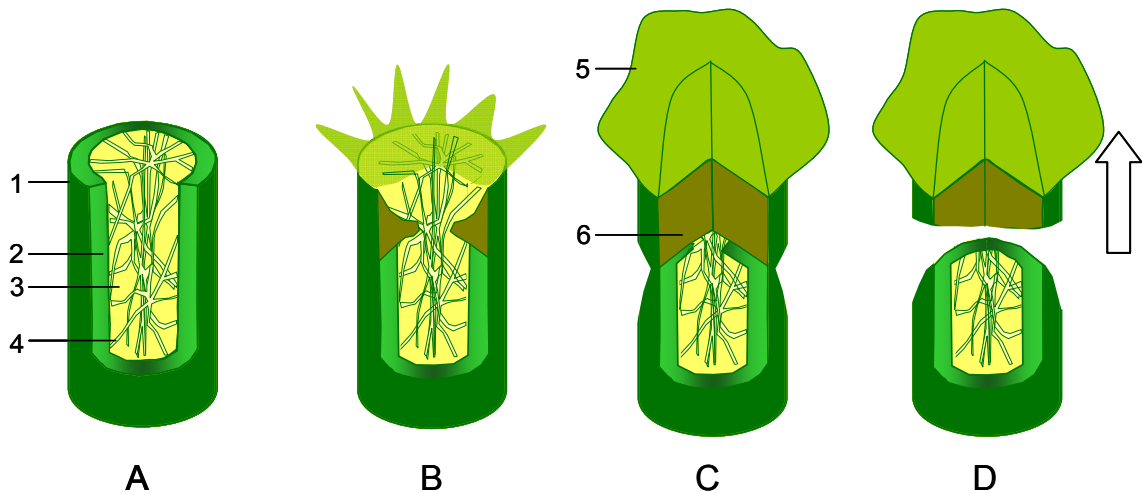


Abbildung 1.3.1: Schematischer Ablauf der Wundverschlussreaktion von *Caulerpa taxifolia* nach Dreher et al und nach Jung; A: Verwundung der Alge; B: Austreten des Zellinhaltes und Bildung des externen Wundverschlusses; C: nach wenigen Stunden hat sich das Cytosol zurückgezogen und die Bildung des internen Wundpfropfs ist abgeschlossen; D: nach Bildung einer neuen Zellwand wird der Wundpfropf abgestoßen (1 = Zellwand; 2 = Cytosol; 3 = Vakuole; 4 = Trabekel; 5 externer Wundverschluss; 6 = interner Wundverschluss)



Abbildung 1.3.2: Gelartiger, externer Wundverschluss von *C. taxifolia*

Die Bildung des Wundverschlussmaterials konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Gelbildung bei anderen marinen Algen, z. B. bei Rotalgen, basiert auf nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Metallkationen und funktionalisierten Sacchariden.^[21, 22] Bei der siphonalen Grünalge *Bryopsis plumosa* wird durch die Assoziation zwischen Kohlenhydraten und speziellen Glycoproteinen, sogenannten Lectinen,

eine temporäre Hülle ausgebildet, die das Cytosol von dem umgebenden Medium trennt und die Entstehung einer neuen Zellwand ermöglicht.^[23] Dreher et al. konnten aus dem Wundverschluss der mit *C. taxifolia* eng verwandten *Caulerpa simpliciuscula* sulfatierte Glucomannosogalactane extrahieren. Diese Verbindungen waren jedoch nicht in der Lage mit den im Seewasser gelösten Metallsalze ein Gel zu bilden.^[24] Auch die Zugabe von Proteinen führte nicht zur Ausbildung eines Gels, so dass derartige, nichtkovalente Wechselwirkungen in *Caulerpa* spp. nicht an der Wundverschlussbildung beteiligt sind. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass es zu einer Anreicherung von Proteinen im Wundpfropf kommt.^[24]

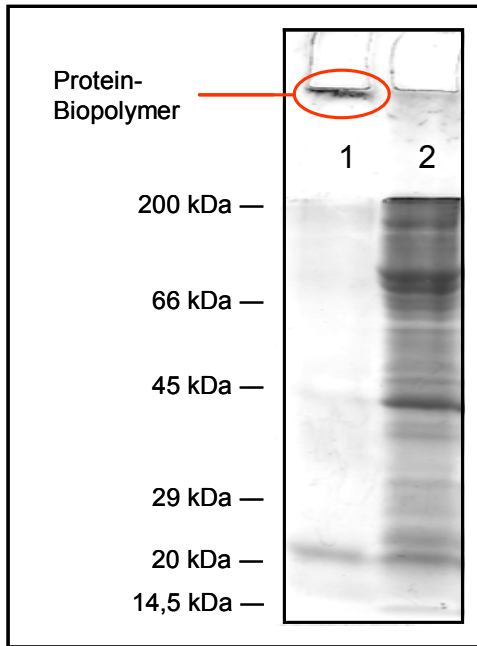


Abbildung 1.3.3: SDS-PAGE des Proteingehaltes von verwundeter (1) und intakter (2) *C. taxifolia* ^[25]

Um die Bedeutung der Proteine bei der Wundverschlussbildung aufzuklären, wurden von Jung und Adolph SDS-gelelektrophoretische Analysen des Proteingehaltes von *C. taxifolia* durchgeführt.^[5, 25] Diese Technik erlaubt eine Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht, so dass kovalente Modifikationen dieser Proteine, wie z. B. Di- und Trimerisierungen, beobachtet werden können. Erfolgte vor der Proteinextraktion durch Mörsern eine Verletzung der Alge, so blieb der gesamte Proteingehalt bei der anschließenden SDS-PAGE in der Ladetasche zurück (Abb. 1.3.3). Jung und Adolph argumentierten, dass die Algenproteine kovalent miteinander vernetzt wurden und dadurch ein Polymer entstand. Dieses besaß eine so große molare Masse,

dass es nicht in das Elektrophoresegel eindringen konnte. Unter Verwendung eines fluoreszent markierten Histons (in Zellkernen vorkommendes Protein) konnte nachgewiesen werden, dass auch extern zugefügtes Protein in dieses Protein-Biopolymer eingebaut wird.^[25] Diese verwundungsinduzierte Quervernetzung konnte durch Denaturierung der Algenenzyme unterdrückt werden, wodurch auch nach Verwundung ein Proteinprofil, wie in der intakten Alge erhalten werden konnte. Durch Verwendung von Epifluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass ein fluoreszent markiertes Modellprotein, von außerhalb der Alge in den externen Wundverschluss rekrutiert werden kann (Abb. 1.3.4 Mitte).^[25] Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM), konnten mehrere Schnittebenen durch den verwundeten Stolon beobachtet werden. Dadurch gelang es das Modellprotein auch im tiefer gelegenen internen Wundverschluss nachzuweisen (Abb. 1.3.4 rechts).^[25] Die Wundreaktion basiert demzufolge auf der Quervernetzung der aus der Alge austretenden Proteine in Folge der Verletzung. Das dabei entstehende Protein-Biopolymer bildet sowohl den externen als auch den internen Wundverschluss.

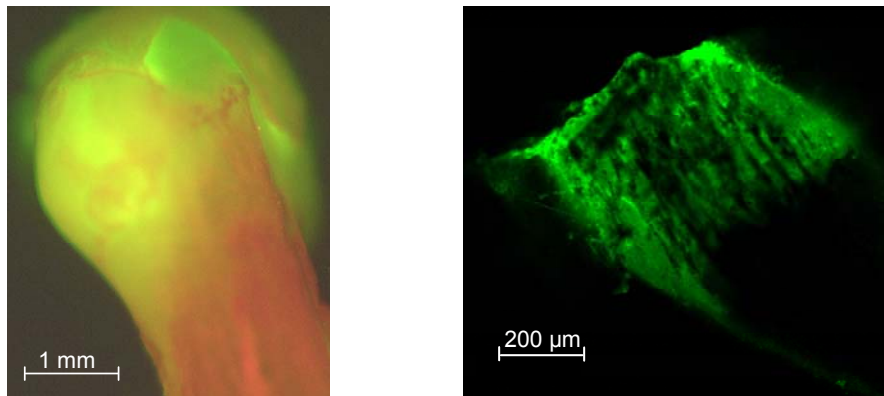


Abbildung 1.3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wundverschlusses von *C. taxifolia* verletzt in Gegenwart von fluoreszent markiertem Modellprotein; links: Epifluoreszenzaufnahme (grüne Fluoreszenz = Modellprotein, rote Fluoreszenz = Chlorophyll); rechts: LSM-Aufnahme des inneren Wundverschlusses^[25]

1.4 Proteinquervernetzung

Bei der Probenpräparation für mikroskopische Untersuchungen oder bei der Fixierung von SDS-Gelen wird oft Glutaraldehyd eingesetzt, um die enthaltenen Proteine quervernetzen und so die Probe zu fixieren.^[26] Die Bifunktionalität des 1,5-Dialdehyds erlaubt eine Kondensationsreaktion mit den nukleophilen Aminofunktionen der Proteine, beispielsweise an den Seitenketten von Lysin, wodurch die Proteine durch Iminbildung verbrückt werden (Abb. 1.4.1). Reagieren mehrere Aminofunktionen der Proteine auf diese Weise entsteht ein hochmolekulares Copolymer.

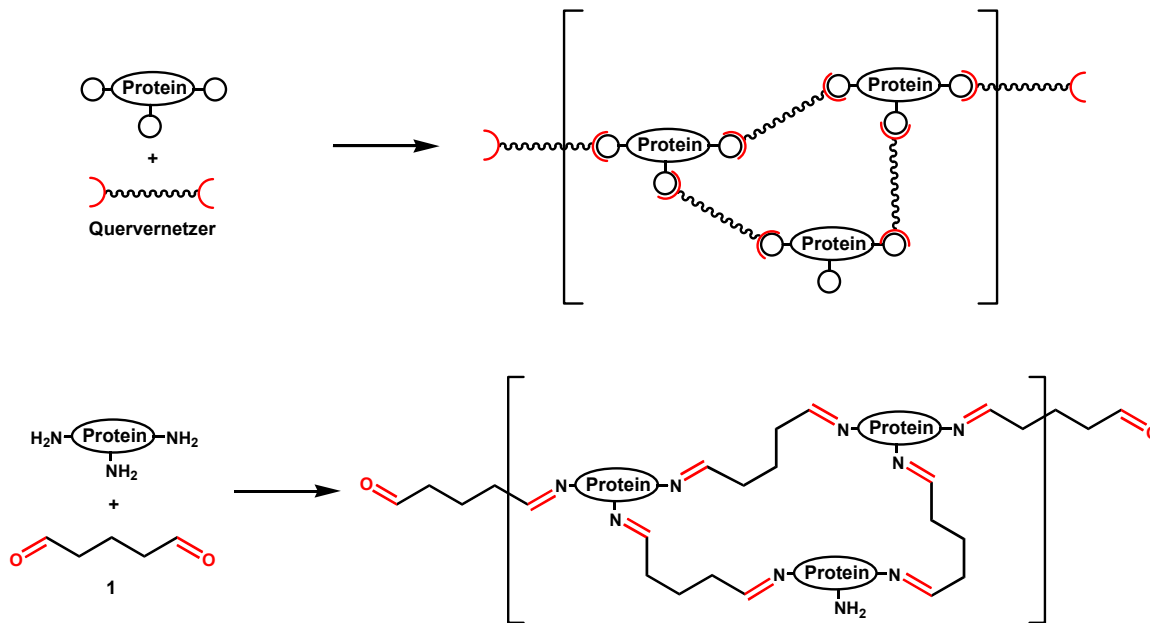


Abbildung 1.4.1: Oben: Schematische Darstellung einer Proteinquervernetzung; Der Quervernetzer verfügt über mindestens zwei funktionelle Gruppen (rot), mit denen er mit nukleophilen Seitenketten der Proteine reagiert und diese so verbrückt. Unten: Proteinquervernetzung mit Glutaraldehyd (1) unter di-Iminbildung.

Die Bildung des Wundverschlusses bei *C. taxifolia* läuft vermutlich ebenfalls nach einem solchen Mechanismus ab, bei dem die Algenproteine durch Reaktion mit einer bifunktionalen Verbindung miteinander vernetzt werden.



Abbildung 1.4.2:
C. taxifolia verletzt in Seewasser mit
100 mg/ml Lysin^[27]

Wird *C. taxifolia* in Gegenwart von freiem Lysin verletzt wurde bleibt die Wundverschlussbildung aus (Abb.1.4.2).^[27] Der Vernetzer kondensiert mit der freien Aminosäure aus dem umgebenden Medium statt mit den Proteinen, so dass sich kein Protein-Biopolymer ausbilden konnte und der Zellinhalt ungehindert ausfließen konnte. Dies spricht dafür, dass die Vernetzungsreaktion ebenfalls auf einer Kondensation zwischen einem elektrophilen Vernetzer und nukleophilen Aminofunktionen beruht.

In *Dasycladus vermicularis* ist eine Vernetzung von Proteinen ebenfalls an der Bildung des

Wundverschlusses beteiligt. Bei dieser Grünalge bildet sich zunächst ein Gel aus Lectinen und sulfatierten Sacchariden, welches die Wunde versiegelt. Anschließend konnte ein sogenannter „oxidative burst“ beobachtet werden, eine sehr schnelle Freisetzung von H_2O_2 und anderen reaktiven Sauerstoffverbindungen.^[28, 29] Welling konnte zeigen, dass durch

diese Reaktion der Sekundärmetabolit Trihydroxycoumarin (THC) (**3**) zu dem Chinon **4** oxidiert wird, was zu einer Braunfärbung des umliegenden Gewebes führt. Diese Verbindung reagiert als Proteinquervernetzer, so dass der Wundverschluss aushärten kann. THC (**3**) wird nach Verwundung aus einer sulfatierten Vorstufe **2** freigesetzt, welche offensichtlich die Speicherform des Quervernetzers darstellt (Abb. 1.4.3).^[30]

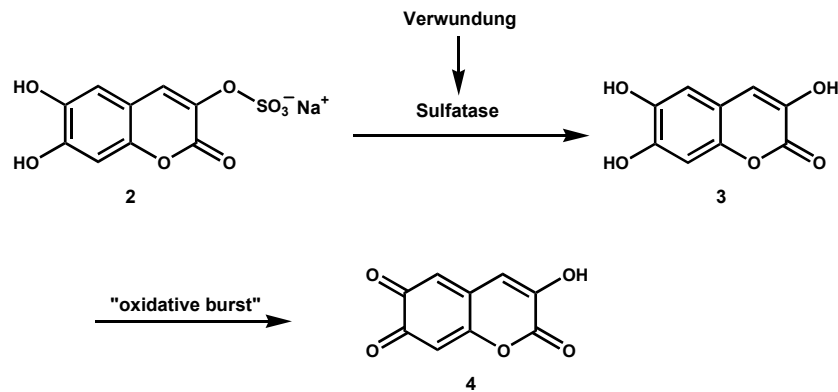


Abbildung 1.4.3: Verwundungsinduzierte Bildung des Proteinquervernetzers **3** in *Dasycladus vermicularis* nach Welling.^[30]

1.5 Der Sekundärmetabolit Caulerpenin

Um den Einfluss der Verwundung auf die Metabolitenzusammensetzung in *C. taxifolia* zu untersuchen, setzten Jung und Pohnert 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) ein, mit dem sich reaktive Zwischenverbindungen abfangen ließen. Die dabei entstehenden Derivate konnten mit LC/MS-Methoden analysiert und strukturell aufgeklärt werden.^[31] Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**5**) nach Verwundung schrittweise enzymatisch deacetyliert wird und nach anschließender Abspaltung von Wasser den Dialdehyd Oxytoxin 2 (**13**) bildet (Abb. 1.5.1).

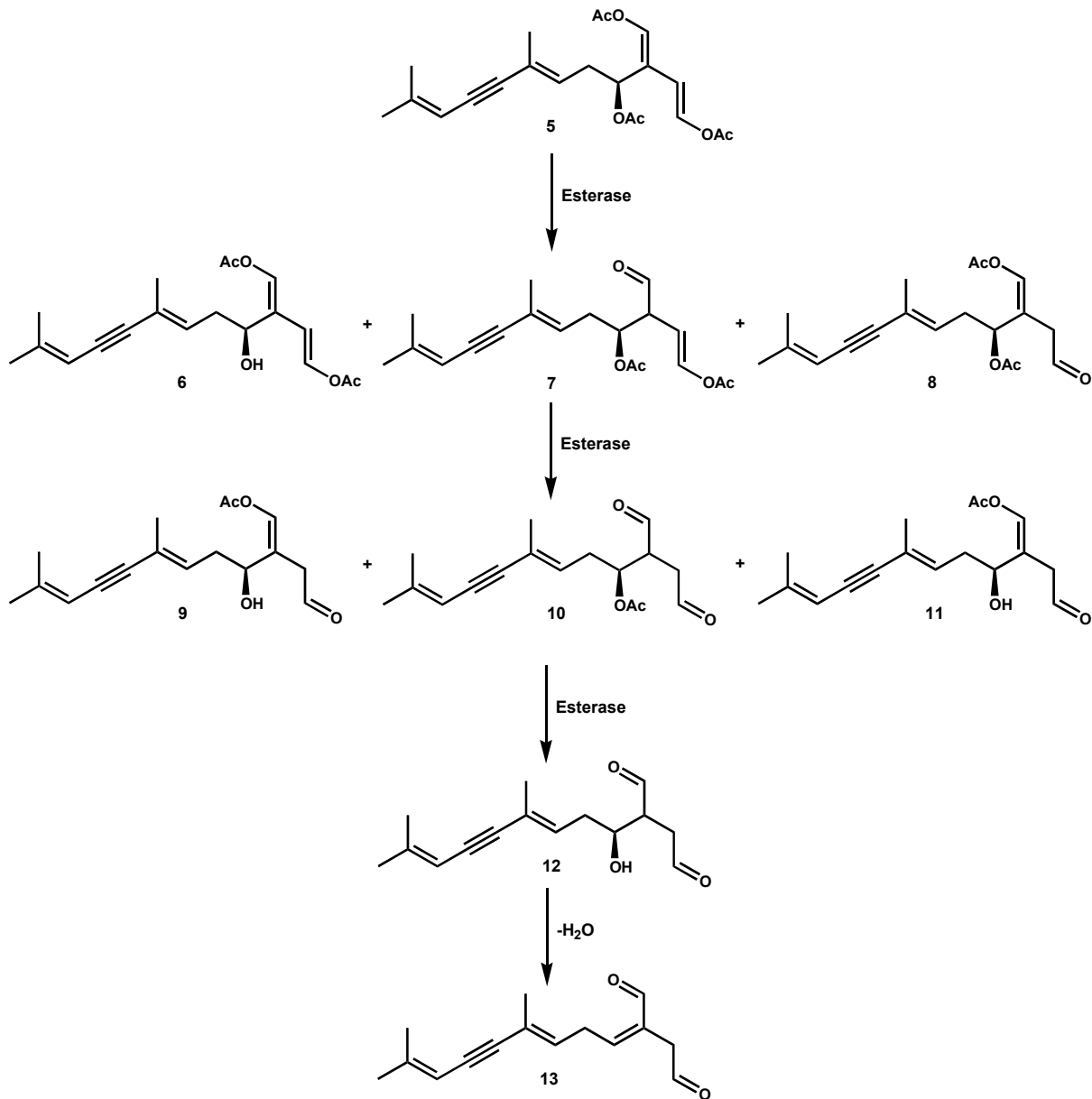


Abbildung 1.5.1: Enzymatische Transformation des Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**5**) zu Oxytoxin 2 (**13**) nach Verwundung von *C. taxifolia*.^[31]

Caulerpenin (**5**) ist mit einem Anteil von bis zu 1 % des Feuchtgewichtes der Hauptsekundärmetabolit von *C. taxifolia* und konnte auch in anderen *Caulerpa*-Arten nachgewiesen werden.^[32-35] Es wird vermutet, dass das Sesquiterpen eine entscheidende Rolle bei der chemischen Verteidigung der Alge spielt. So konnte in einer Reihe von Studien belegt werden, dass **5** abschreckend auf Herbivoren wirkt und das Zellwachstum von Seeigelleiern hemmt.^[36-38] Auch wirkt **5** gegenüber bestimmten Krebszelllinien wachstumshemmend.^[39, 40]

Der zeitliche Verlauf der Caulerpeninkonzentration nach Verwundung zeigt, dass bereits nach einer Minute mehr als die Hälfte des Caulerpenins (**5**) enzymatisch umgewandelt wurde und es nach 4 Minuten kaum noch nachzuweisen ist (Abb. 1.5.2).^[25] Offensichtlich ist Caulerpenin (**5**) neben der diskutierten Abwehrfunktion noch in einen weiteren Prozess der Wundreaktion eingebunden. Auch dessen Umwandlungsprodukt Oxytoxin 2 (**13**) wird innerhalb der gleichen Zeit in einer Folgereaktion verbraucht.

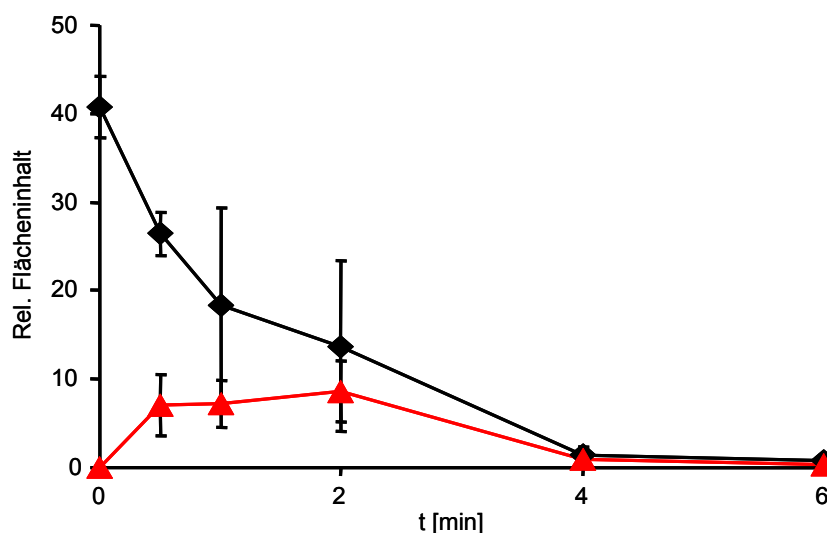


Abbildung 1.5.2: Konzentrationsverlauf von Caulerpenin (**5**) (schwarz) und Oxytoxin 2 (**13**) (rot) nach Verwundung von *C. taxifolia*^[25]

Dieser Prozess korreliert zeitlich sehr gut mit der Bildung des Wundverschlusses, was für die Beteiligung von Oxytoxin 2 (**13**) an der Wundversiegelung spricht. Außerdem konnten keine Folgeprodukte von **13** im löslichen Teil der Algenmatrix nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass diese Verbindung im unlöslichen Protein-Biopolymer kovalent gebunden wird. Es wurde vermutet, dass diese Verbindung der gesuchte Proteinquervernetzer in *C. taxifolia* ist, da es wie Glutaraldehyd (**1**) eine Dialdehydstruktur aufweist.

1.6 Modellreaktionen mit Caulerpenin

Guerriero *et al.* setzten Caulerpenin (**5**) in Methanol mit Butylamin *in-vitro* um.^[41] Die Acetylgruppen wurden unter den basischen Bedingungen hydrolysiert, so dass sich nach Tautomerisierung des entstehenden Bisenols und Wasserabspaltung ebenfalls Oxytoxin 2 (**13**) bildete. Dessen Aldehydgruppen reagierten zwar mit Butylamin, jedoch bildete sich nicht das di-Imin **14**, was der bei Glutaraldehyd (**1**) beobachteten Reaktivität entsprechen würde. Stattdessen addierte ein Aminmolekül an die Michael-Akzeptorposition und ein weiteres bildete mit dem 1,4 Dialdehydsystem einen Pyrrolring aus (Abb. 1.6.1).

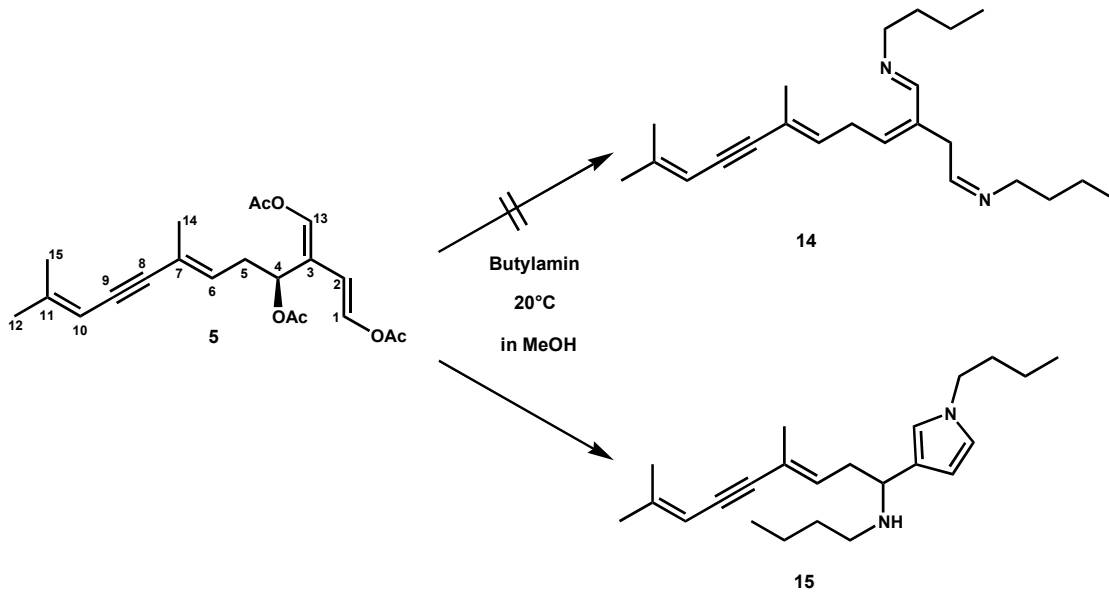


Abbildung 1.6.1: Die Reaktion von Caulerpenin (5) mit Butylamin liefert nicht das di-Imin 14 sondern Pyrrolverbindung 15, nach Guerriero et al..^[41]

In den Experimenten von Jung ließ sich jedoch das von Oxytoxin 2 (13) abgeleitete di-Hydrason 16 nachweisen, bei dem beide Aldehydfunktionen mit jeweils einer Aminogruppe reagierten (Abb. 1.6.2 oben).^[5, 42] Die Reaktion von 13 zu di-Iminen lässt sich daher nicht ausschließen. Bei dem von Jung postulierten Reaktionsmechanismus findet zunächst die Kondensation einer Aminogruppe mit der Aldehydfunktion an C13 statt. Anschließend kann entweder eine weitere Kondensation unter Bildung des di-Imins erfolgen oder ein nukleophiler Angriff des Stickstoffs an den C1-Aldehyd unter Bildung eines dihydro-Pyrrolsystems. Ein weiteres Amin kann nun an der C4-Michael-Akzeptor-Position angreifen, so dass nach Wasserabspaltung die, von Guerriero beobachteten Pyrrolverbindungen entstehen können (Abb. 1.6.2 unten). Beide Reaktionswege erlauben eine Quervernetzungsreaktion, da eine Reaktion mit Aminogruppen von zwei Proteinen möglich ist.

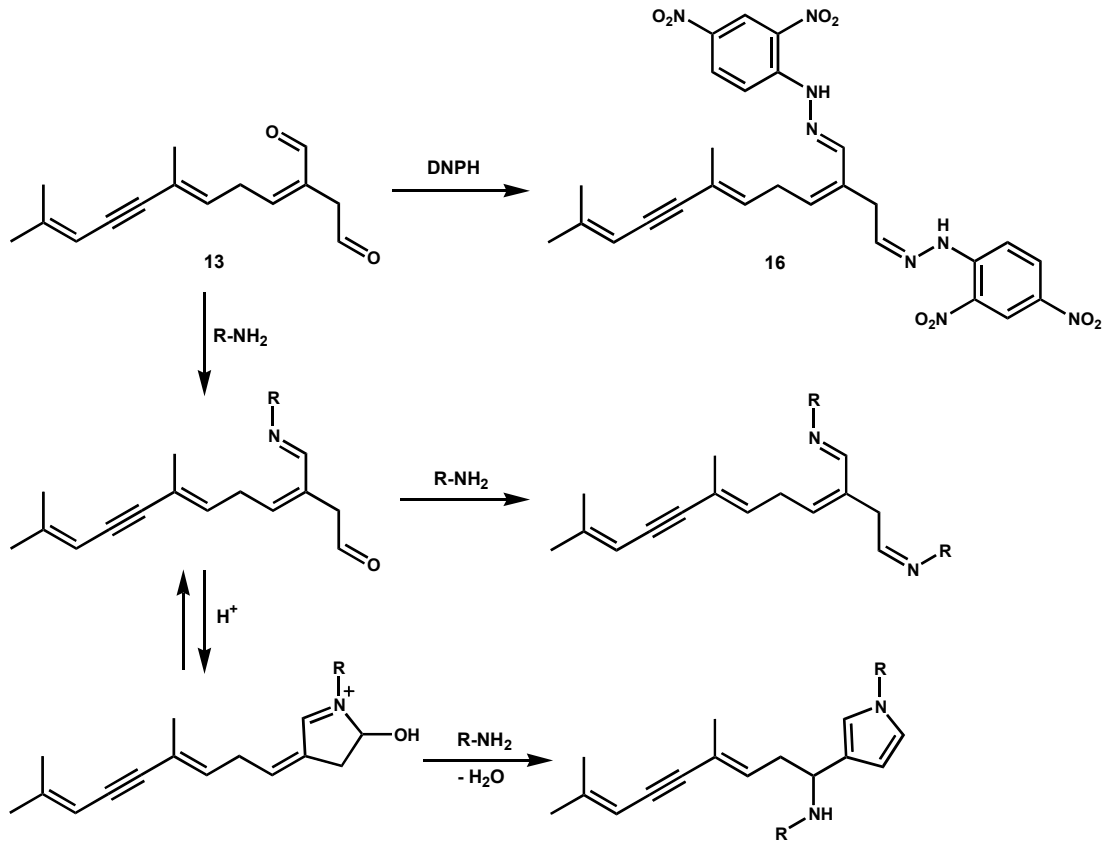


Abbildung 1.6.2: Reaktion von Oxytoxin 2 (**13**) mit 2,4, Dinitrophenylhydrazin und postulierter Mechanismus der Reaktion mit Aminen^[5]

Adolph versuchte die Proteinquervernetzung unter physiologischen Bedingungen außerhalb der Alge zu simulieren. In diesen Versuchen wurde das reaktive Oxytoxin 2 (**13**) *in-situ* aus Caulerpenin (**5**) enzymatisch erzeugt.^[25] Da sich die Esterase, welche in *C. taxifolia* die Deacetylierung von **5** katalysiert, nicht isolieren ließ, wurde stattdessen kommerziell erhältliche Schweineleberesterase (PLE) verwendet, welche eine hohe Substrattoleranz besitzt.^[43] Ein Teil des erzeugten Oxytoxins 2 (**13**) reagierte mit der Esterase selbst, jedoch konnten diese Nebenprodukte durch Verwendung von polymergebundener PLE abgetrennt werden. Die Umsetzung mit Oligopeptiden führte jedoch nicht zu Quervernetzungsprodukten. Es konnte lediglich das pyrrolbasierte Addukt **17** nachgewiesen werden (Abb. 1.6.3), bei dem keine Michael-Addition eines zweiten Amins stattfand.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass Caulerpenin (**5**) bzw. Oxytoxin 2 (**13**) das Potential besitzen als Proteinquervernetzer zu reagieren, insbesondere wenn die beteiligten Proteine über freie Thiolgruppen verfügen. Es ist jedoch nicht geklärt, inwieweit sich die Ergebnisse dieser Modellreaktionen auf *C. taxifolia* übertragen lassen. S gelang es nicht, die Folgeprodukte von **5** bzw. **13** im Wundverschlussmaterial nachzuweisen. Die Versuche mittels NMR-Analyse typische ^1H -Signale der Oxytoxin-Seitenkette, des Pyrrolsystems oder auch eines di-Imins im Protein-Biopolymer zu identifizieren, scheiterten an der hohen Probeninhomogenität. Da eine Vielzahl von Algenproteinen quervernetzt wird, entsteht kein regelmäßiges Polymer. Eine Strukturaufklärung durch Massenspektrometrie war dadurch ebenfalls nicht möglich. Eine Lokalisierung des Caulerpenins (**5**) mittels Raman-Mikroskopie unter Ausnutzung der charakteristischen Schwingungsbande der Dreifachbindung schlug fehl, da dessen Signal zu schwach war.^[25]

1.7 Synthese von Caulerpenin

Der direkte Nachweis von Caulerpenin (**5**) und dessen Folgeprodukten im Algengewebe erweist sich als sehr schwierig, ebenso die Analyse des Proteinquervernetzungsproduktes. Aus diesem Grund müssen andere Strategien eingesetzt werden, um den Wundverschlussmechanismus aufzuklären.

Ein sehr häufig verwendeter Ansatz, den biochemischen Reaktionsweg von Metaboliten in aufzuklären, ist es ein synthetisches Analogon dieser Verbindungen herzustellen und es in den Stoffwechsel der Zielorganismen einzuschleusen. Solche Verbindungen müssen über die gleiche Reaktivität verfügen, wie deren natürliches Äquivalent, gleichzeitig aber bestimmte Eigenschaften besitzen, die eine einfache Identifikation des Moleküls und aller Folgeprodukte erlaubt. So gestattete der Einsatz von isotonenmarkierten Verbindung und Massenspektrometrie die Aufklärung einer Vielzahl von Biosynthesewegen insbesondere des Sekundärstoffwechsels.^[45, 46] Wurden die synthetischen Verbindungen mit einem fluoreszenten Farbstoff oder Fluorophor markiert, so lassen sie sich im sehr leicht im Gewebe lokalisieren.

Die Beobachtung der durch Verwundung ausgelösten Reaktionen des Caulerpenins (**5**) und deren vermutete Beteiligung an der Proteinquervernetzung, erfordert demzufolge die Verwendung eines leicht identifizierbaren Analogons von **5**. Eine fluoreszente Verbindung würde es erlauben auch polymergebundene Folgeprodukte zu identifizieren.

Die Totalsynthese von Caulerpenin (**5**) konnte erstmals von Commeiras durchgeführt werden.^[47, 48] Bei diesem Reaktionsweg wird der α , β -ungesättigte Aldehyd *rac*-Taxifolial A (**30**) mit Acetanhydrid zu dem gewünschten Caulerpenin (**5**) in Form einer Enolacetylierung umgesetzt. Das Kohlenstoffskelett wird durch die Kupplungsreaktion des Vinylstannans **23** mit dem Aldehyd **24** aufgebaut (Abb. 1.7.1)

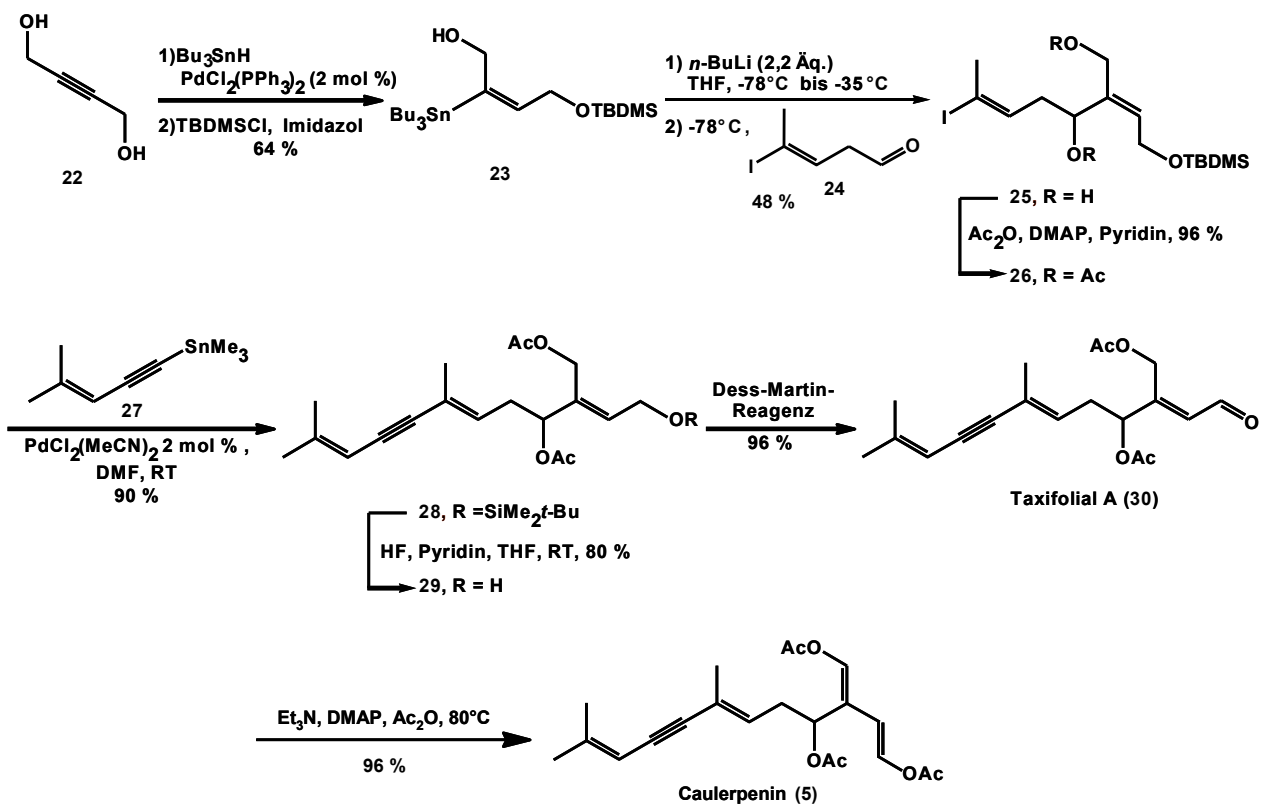


Abbildung 1.7.1: Totalsynthese von Caulerpenin (5) nach Commeiras et al.^[47, 48]

Durch organische Synthese werden dadurch 1,4-Bisenoylacetate zug\u00e4nglich, deren Reaktionsverhalten dem von Caulerpenin (5) \u00e4hneln. Neben Untersuchungen des Wundverschlusses von *Caulerpa* spp. k\u00f6nnten diese Verbindungen eingesetzt werden, Proteine kovalent zu modifizieren. Um das Reaktionsverhalten solcher 1,4-Bisenoylacetate gegen\u00fcber Proteinen *in-vitro* aufzukl\u00e4ren, k\u00f6nnten markierte Analoga verwendet werden. Interessant ist hierbei die Aktivierbarkeit dieser Verbindungen durch Esterasen und Lipasen und die Reaktivit\u00e4t gegen\u00fcber diesen sehr bedeutenden Enzymklassen.

2 Aufgabenstellung

In Modellreaktionen zeigte sich, dass Caulerpenin (**5**) das Potential besitzt, mit freien Aminosäuren Vernetzungsreaktionen einzugehen. Da sämtliche bisherige Untersuchungen aber nur indirekte Hinweise auf die Beteiligung von Caulerpenin (**5**) an der Bildung des Proteinbiopolymers lieferten,^[25] soll in dieser Arbeit durch Verwendung einer fluoreszenten Sonde in Form eines synthetischen Analogons von Caulerpenin (**5**) die Rolle des Sesquiterpens im Wundverschlussmechanismus von *C. taxifolia* aufgeklärt werden.

- Es soll ein Synthesekonzept für ein Analogon erarbeitet werden, welche über die gleiche Bisenoylacetateinheit wie Caulerpenin (**5**) verfügt, um die Reaktivität der natürlichen Verbindung nachzuahmen. Um mit dieser Sonde die biochemischen Reaktionen verfolgen zu können, wird eine Ankergruppe benötigt, an die beispielsweise ein fluoreszenter Marker angeheftet werden kann.
- Mit Hilfe dieser Verbindung sollen die durch Verwundung ausgelösten biochemischen Reaktionen der Alge untersucht werden, beispielsweise durch mikroskopische Aufnahmen des Wundverschlusses, um festzustellen, inwiefern Caulerpenin (**5**) an der Wundverschlussbildung beteiligt ist.

Wie Jung und Adolph zeigen konnten, wird Caulerpenin (**5**) durch eine oder mehrere Esterasen in den reaktiven Dialdehyd Oxytoxin 2 (**13**) überführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch andere kommerziell erhältliche Esterasen wie z. B. Schweineleberesterase in der Lage sind Caulerpenin (**5**) außerhalb der Alge abzubauen. Die Anwendbarkeit der fluoreszenten Sonde sollte auf diese Enzyme ebenfalls untersucht werden.

- Es sollen die reaktiven Eigenschaften der fluoreszenten Sonde geprüft werden. Hierbei soll getestet werden, ob die Sonde durch esterspaltende Enzyme deacetyliert und somit in einen reaktiven Dialdehyd umgewandelt werden kann.
- Ausgehend von diesen Ergebnissen soll die Anwendbarkeit von 1,4-Bisenoylacetaten zur kovalenten Modifikation von Proteinen unter Verwendung der fluoreszenten Sonde untersucht werden.
- Das selektive Reaktionsverhalten gegenüber Esterasen soll überprüft werden.

In der Literatur wird Caulerpenin (**5**) hauptsächlich als Toxin und somit als Verteidigungsmetabolit diskutiert.^[36, 49, 50] Dies widerspricht sich mit Arbeiten, in denen nachgewiesen wurde, dass Caulerpenin (**5**) bei Verwundung von *C. taxifolia* enzymatisch umgewandelt wird und das Folgeprodukt Oxytoxin 2 (**13**) ebenfalls abgebaut wird.^[25, 31] Somit führen durch Fraßbefall verursachte Verwundungen zu einer Verringerung der Caulerpeninkonzentration. Dies würde eine Verminderung des Abwehrpotentials der Alge bedeuten. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Verteidigungsstrategie von *C. taxifolia* und möglicherweise auch anderer *Caulerpa*-Arten sich einzig und allein auf die Produktion von Caulerpenin (**5**) bzw. ähnlicher 1,4-Bisenoylacetate beschränkt.

- Die Wirkung von Caulerpenin (**5**) soll unter dem Aspekt der Fraßresistenz von *C. taxifolia* in dafür geeigneten Bioassays untersucht werden.
- Durch weitere Versuche soll überprüft werden, ob und welche verwundungsinduzierten Prozesse an der Fraßhemmung beteiligt sind.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese eines fluoreszenten Analogons von Caulerpenin

3.1.1 Design der fluoreszenten Sonde

Um die Bedeutung von Caulerpenin (**5**) bei der Wundverschlussbildung von *C. taxifolia* aufklären zu können, sollte ein Analogon synthetisiert werden, welches fähig ist, die gleichen biochemischen Transformation wie der Sekundärmetabolit einzugehen. Zudem sollte diese eine fluorophore Gruppe enthalten, um sie sowohl in Enzympräparationen als auch im Algengewebe als eine leicht detektierbare Sonde einzusetzen und eine einfache Lokalisation zu ermöglichen.

Fast alle beobachteten Reaktionen von Caulerpenin (**5**) und dessen Folgeprodukten beschränken sich auf das Bisenoylacetatsystem und die sekundäre Acetatfunktion. Im Gegensatz dazu bleibt der ungesättigte aliphatische Terminus vollkommen unverändert (vgl. Abb. 3.1.1). Folglich wird dieser Terminus vermutlich keinen Einfluss auf das Reaktionsverhalten besitzen, sollte sich **5** an der Proteinvernetzung beteiligen. Demzufolge muss dieser in dem Analogon nicht berücksichtigt werden.

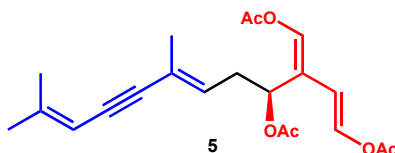


Abbildung 3.1.1: Caulerpenin (**5**) mit ungesättigter aliphatischer Terminus (*blau*) und Bisenoylacetatsystem sowie sekundärer Acetatfunktion (*rot*)

Damit das Fluorophor nicht durch sterisch anspruchsvolle Substituenten die verwundungsaktivierte Deacetylierung beeinträchtigt, wird zwischen diesem und dem Bisenoylacetatsystem ein Spacer in Form einer Alkylkette, benötigt. Da die Sonde für die Anwendung in *in-vivo*-Versuchen eine ausreichende Wasserlöslichkeit besitzen muss, wurde ein Spacer mit nicht mehr als drei bis vier CH₂-Gruppen angestrebt. Der schematische Aufbau der fluoreszenten Sonde ist in Abbildung 3.1.2 dargestellt.

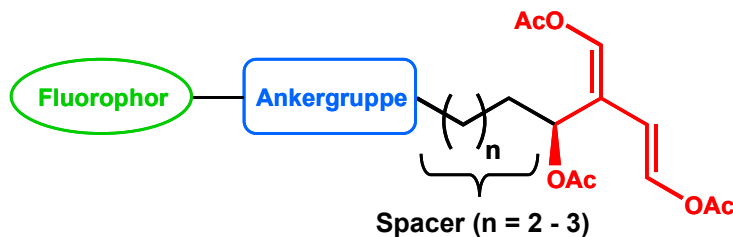


Abbildung 3.1.2: Schematischer Aufbau der fluoreszenten Sonde

Es wäre sehr mühsam, ein Fluorophor mit den gewünschten Eigenschaften in der Synthese aufzubauen. Aus diesem Grund sollte ein kommerziell erhältlicher fluoreszenter Farbstoff über eine Ankergruppe an das Molekül gebunden werden.

3.1.2 Syntheseplanung

Fluoreszente Farbstoffe sind einerseits sehr teuer und andererseits oft empfindlich gegenüber einer Vielzahl von Verbindungen. Daher erscheint es als sinnvoll, diesen im letzten Schritt der Synthese in das Molekül einzuführen. Außerdem bietet diese Vorgehensweise eine hohe Flexibilität, falls ein bestimmter Farbstoff nicht die gewünschten Eigenschaften bezüglich Biokompatibilität, Löslichkeit und Fluoreszenz im Endprodukt aufweist.

Die dabei verwendete Kupplungsreaktion sollte unter äußerst milden Reaktionsbedingungen stattfinden, da das sehr empfindliche Bisenoylacetatsystem in diesem Schritt bereits vorhanden ist. Eine nahezu quantitative Reaktion ist an diesem späten Synthesepunkt ebenfalls wichtig. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurde eine Aminofunktion als Ankergruppe ausgewählt. Diese funktionelle Gruppe ist in der Lage bei Raumtemperatur unter neutralen Bedingungen mit fluoreszenten Farbstoffen zu reagieren, welche häufig als Ester von *N*-Hydrosuccinimid (NHS) erhältlich sind. Dabei wird das entsprechende Amid **32** gebildet (siehe Abb. 3.1.3).

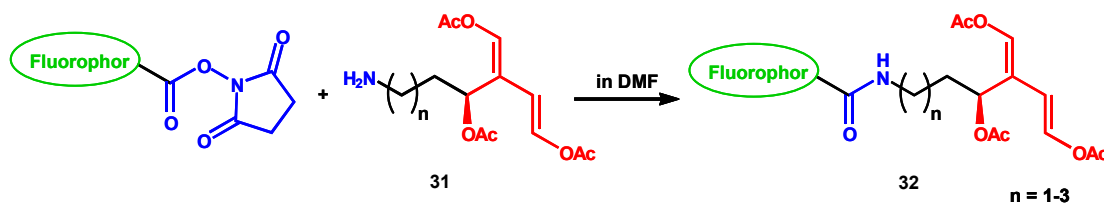


Abbildung 3.1.3: Reaktion von fluoreszenten NHS-Farbstoffen mit einem Bisenoylacetat mit primärer Aminogruppe **31**

Eine Reaktion unter wasserfreien Bedingungen, zum Beispiel in DMF, würde die als Nebenreaktion auftretende Hydrolyse des NHS-Esters unterbinden, so dass ein quantitativer Umsatz des Farbstoffes erreicht werden könnte. Das Ziel war somit ein Bisenoylacetat mit primärer Aminogruppe (**31**) zu synthetisieren.

Bei der ursprünglichen Synthesepaltung erschien es vielversprechend, sich für den Aufbau des Bisenoylacetats an der bereits von Commeiras beschriebenen Totalsynthese des Caulerpenins (**5**) zu orientieren (siehe Einleitung Abb. 1.7.1).^[47, 48] Bei diesem Reaktionsweg wird das Kohlenstoffskelett durch die Kupplungsreaktion des Vinylstannans **23** mit dem Aldehyd **24** aufgebaut. Diese Reaktion erfordert jedoch nicht nur einen Überschuss des Vinylstannans **23**, sondern auch einen mehr als zweifachen Überschuss an *n*-Butyllithium bezogen auf die Menge des eingesetzten **23**. Um diesen Syntheseweg für die Herstellung der fluoreszenten Sonde zu abzuwandeln, müsste eine dem Aldehyd **24** analoge Verbindung **33** verwendet werden, welche eine geschützte Aminogruppe trägt (Abb. 3.1.4). Allerdings lässt sich dies nicht mit der Verwendung von *n*-Butyllithium vereinbaren, da dieses starke Nucleophil unerwünschte Nebenreaktionen mit den möglichen Schutzgruppen eingeht.

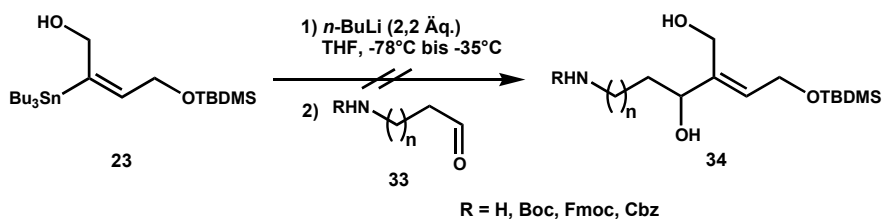


Abbildung 3.1.4: Transmetallierung des Vinylstannans **23** nach Commeiras et al.^[47] und anschließende Umsetzung mit einem Aldehyd **33** führt nicht zu dem gewünschten Kupplungsprodukt **34**

Aus diesem Grund wurde in einer Reihe von Testreaktionen nach alternativen Möglichkeiten gesucht, um das Bisenoylacetatsystem aufzubauen. Dabei wurden auch alternative Varianten für den Aufbau des Bisenoylacetats in Betracht gezogen.

3.1.3 Testreaktionen für den Aufbau der Bisenoylacetatfunktion

Es wurde zunächst überprüft, ob ein 1,4-Dialdehyd unter den Reaktionsbedingungen einer Enolacetylierung zu dem gewünschten 1,4-Bisenoylacetat reagiert. Aufgrund der hohen Reaktivität von 1,4-Dialdehyden und der damit verbundenen Instabilität, musste diese Verbindung *in-situ* erzeugt und das korrespondierende Bisenol sofort mit einem Überschuss an Acetanhydrid abgefangen werden.

Hierfür wurde zunächst 2-Vinyl-4-pentennitril (**36**) als Modelldien durch eine Alkylierung aus 3-Butennitril (**35**) hergestellt^[51] und einer Ozonolyse in Dichlormethan bei $T = -78^\circ\text{C}$ nach dem Protokoll von Ferrié *et al.* unterworfen.^[52] Das entstandene Sekundärozonid **37** wurde bei der gleichen Temperatur mit Triethylamin versetzt, um es zu dem entsprechenden 1,4-Dialdehyd **38** zu reduzieren. Zu diesem Gemisch wurde erneut Triethylamin, sowie katalytische Mengen DMAP und drei Äquivalente Acetanhydrid gegeben, um das Bisenol **39** als Acetat **40** abzufangen (Abb. 3.1.5.). Zwar zeigten Reaktionskontrollen vor der Zugabe von Acetanhydrid einen kompletten Umsatz von **36**, jedoch ließen sich im Produktgemisch weder per GC/MS- noch per NMR-Analyse eines der erwarteten Isomere von **40** nachweisen. Aus diesem Sachverhalt lässt sich schließen, dass die Ozonolyse zu **38** erfolgreich verlief, dieses Zwischenprodukt jedoch nicht über Tautomerisierung acetyliert werden kann. Obwohl diese durch die Konjugation mit der Cyanogruppe energetisch begünstigt zu sein scheint, ist dieser Syntheseweg daher nicht geeignet, um das Bisenoylacetatssystem aufzubauen.

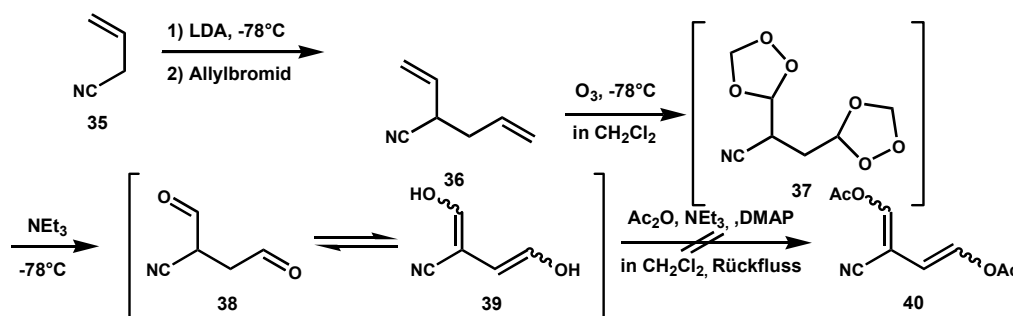


Abbildung 3.1.5: Die Eintopfsynthese von 2-Vinyl-4-pentennitril **36** zum Cyanobisenoylacetat **40** über ozonolytische Spaltung und anschließende Enolacetylierung führt nicht zu dem gewünschten Produkt **40**.

In einem anderen Ansatz wurde die Möglichkeit untersucht, ob man das Bisenoylacetat **41** durch die Ringöffnung eines Diacetoxycyclobutens **42** erhalten kann (siehe Abb. 3.1.6). Der Zugang zu diesem Cyclobuten sollte über eine [2+2] Cycloaddition eines terminalen Alkins **44** mit Vinylencarbonat **45** erfolgen.

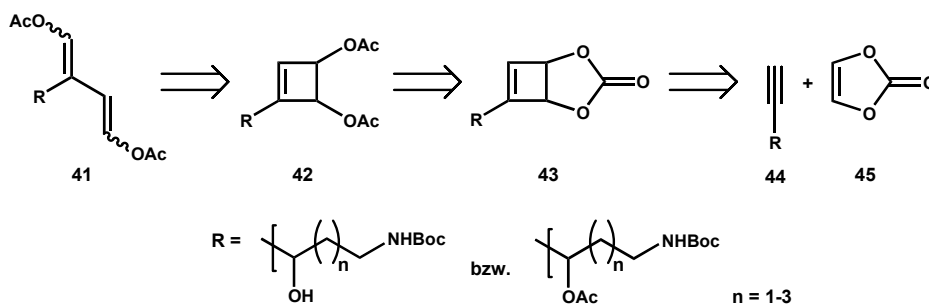


Abbildung 3.1.6: Retrosynthese des Bisenoylacetats **41** über die Ringöffnung eines Cyclobutens **42**, hergestellt aus Alkin **44** und Vinylencarbonat **45**.

Bedingt durch die suprafaciale Reaktion des Alkins mit **45** sollten die Acetoxygruppen im Cyclobuten *cis*-ständig vorliegen. Daher müsste sich, gemäß den Regeln von Woodward und Hoffmann die Stereochemie des Bisenoylacetats kontrollieren lassen. Abhängig davon, ob die Ringöffnung unter thermischen oder photolytischen Bedingungen durchgeführt wird, findet eine konrotatorische bzw. eine disrotatorische Reaktion statt.^[53] Dies könnte im Falle von **42** zu Produkten mit definierter Stereochemie führen (siehe Abb. 3.1.7).

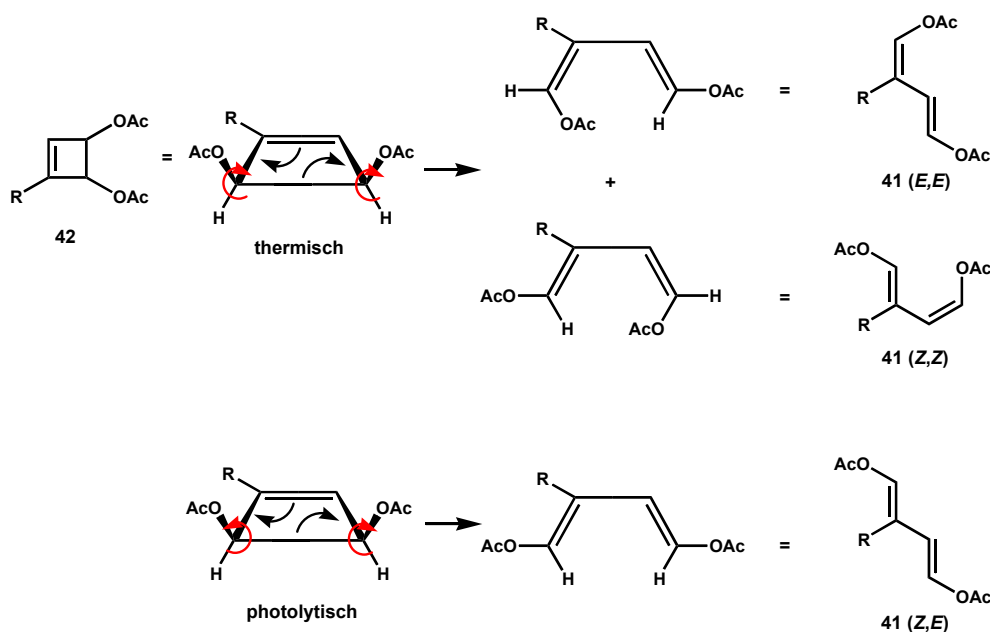


Abbildung 3.1.7: Erwartetes Reaktionsverhalten von **42** bei thermischer bzw. photolytischer Ringöffnung

Zur Verifizierung dieser Überlegungen wurde zunächst mit einem einfachen Modellcyclobuten getestet, ob und unter welchen Bedingungen eine Ringöffnungsreaktion stattfindet, bevor diese auf das Cyclobuten **42** mit Spacer und Aminogruppe übertragen werden konnte. Eine geeignete Modellverbindung ist das 1,2-Diacetoxy-3-acetoxymethyl-3-cyclobuten (**46**) (Abb. 3.1.8), welches in wenigen, einfachen Schritten zugänglich sein sollte.

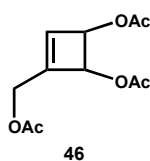


Abbildung 3.1.8: Modellcyclobuten zur Überprüfung der Ringöffnung zu einem Bisenoylacetat

Für die Synthese der Modellverbindung wurde Propargylalkohol **47** mit einem Überschuss an Vinylencarbonat **45** in einem Photoreaktor umgesetzt.^[54] Das Produkt **50** konnte nur in 15 %iger Ausbeute bezogen auf **47** erhalten werden. Selbst ein Austausch des Acetons gegen Dicyclopropylketon als Lösungsmittel steigerte nicht die Ausbeute, obwohl dieses als geeigneter Photosensibilisator für eine [2+2]-Cycloaddition mit Vinylencarbonat diskutiert wurde.^[55] Hauptprodukte der Reaktion waren die Dimerisierungsprodukte von **45**. Hierbei fiel **49** bereits im Reaktionsgemisch als weißer Niederschlag aus, **48** konnte nach Einengen der Mischung abfiltriert werden (Abb. 3.1.9). Eine säulenchromatographische Auftrennung erlaubte neben der Isolierung des Produkts **50** eine fast vollständige Rückgewinnung des Propargylalkohols (**47**).

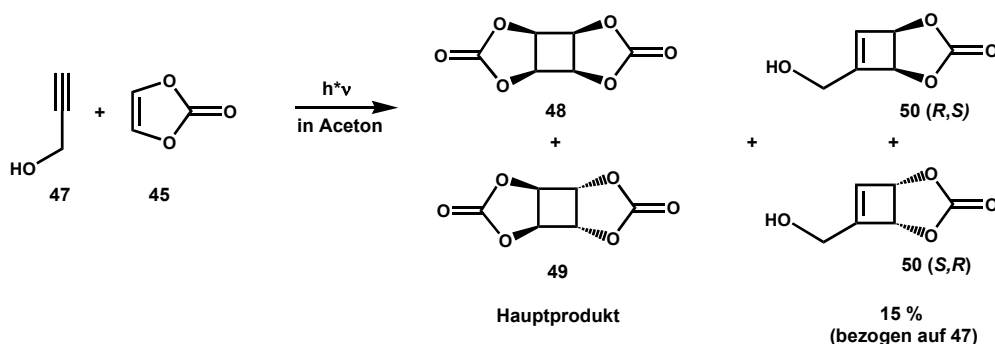


Abbildung 3.1.9: Photolytische 2+2 Cycloaddition von Propargylalkohol (**47**) an Vinylencarbonat (**45**)

Obwohl nur eine geringe Ausbeute erzielt werden konnte, wäre diese Reaktion dennoch im Syntheseweg einsetzbar, da nicht umgesetztes Alkin **44** bzw. **47** nach der Rückgewinnung erneut einer Photolyse unterworfen werden kann. Zudem ist das zu einer Dimerisierung neigende Edukt **45** kommerziell erhältlich.

Im nächsten Schritt wurde die Carbonatfunktion unter basischen Bedingungen gespalten, um das Triol **51** zu erhalten (Abb. 3.1.10). Diese Verbindung erwies sich allerdings als unlöslich in organischen Lösungsmitteln, abgesehen von Methanol und Ethanol. Alkohole sind jedoch keine geeigneten Lösungsmittel für die folgende Acetylierung, da sich das eingesetzte Acetanhydrid bei einer Reaktion mit dem Lösungsmittel verbraucht.

Aus diesem Grund wurde **51** für diese Reaktion in Dichlormethan dispergiert und mit Acetanhydrid in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt. Das als Modellverbindung geeignete Triacetat **46** konnte jedoch nicht erhalten werden, da in diesem zweiphasigen System keine effektive Acetylierung stattfinden konnte.

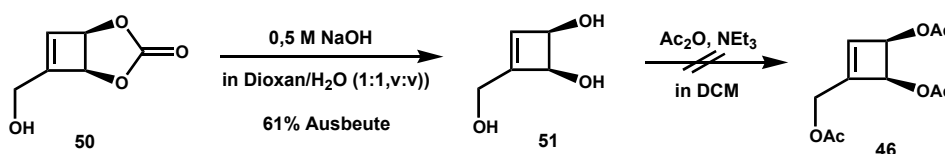


Abbildung 3.1.10: Spaltung des cyclischen Carbonats **50** unter basischen Bedingungen zu Triol **51**. Die Acetylierung zu **46** findet nicht statt. Zur Klarheit wird hier und in folgenden Abbildungen nur ein Enantiomer gezeigt.

Somit musste eine alternative Modellverbindung synthetisiert werden, mit dem Ansatz eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu gewährleisten. Dazu wurde die primäre Hydroxyfunktion von **50** als Tetrahydropyranylether **52** geschützt, bevor das Carbonat zu dem Diol **53** gespalten wurde. Dieser Dialkohol konnte vollständig in Dichlormethan gelöst und in 85 %iger Ausbeute zu der als Modellcyclobuten geeigneten Verbindung **54** umgesetzt werden (Abb. 3.1.11).

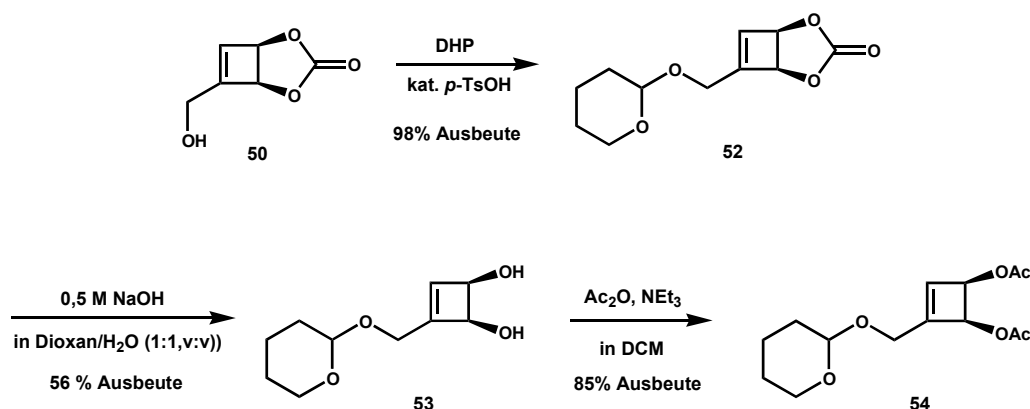


Abbildung 3.1.11: Synthese des THP-ethers **52** und anschließende Umsetzung zu dem Modellcyclobuten **54** über das Diol **53**.

Die so erhaltene Verbindung wurde anschließend in Hexan, welches zuvor mit Argon entgast wurde, gelöst und mit einem Quecksilber-Mitteldruckstrahler unter Verwendung eines Quarzkühlrohres belichtet. Vergleichbare Reaktionsbedingungen wurden bereits in der Literatur für die Ringöffnung von Cyclobutenen dokumentiert.^[56, 57] Allerdings ließ sich auch nach einer Belichtungszeit von 5 h nahezu kein Umsatz feststellen. Nach einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnten neben **54** lediglich Spuren des Spaltproduktes **55**

nachgewiesen werden. Auch die thermische Umsetzung von **54** führte nicht zu den entsprechenden Bisenoylacetaten, selbst beim Erhitzen unter Rückfluss in *p*-Xylen für 24 h (Abb. 3.1.12). Die hohe Stabilität des Cyclobutens könnte in dessen Substitutionsmusters begründet sein. Für eine Ringöffnungsreaktion von Cyclobutenen, welche elektronenreiche Substituenten an der Doppelbindung besitzen, werden sehr hohe Temperaturen benötigt. Beispielsweise erfordert die Umwandlung des 1,2-Bis(trimethylsilyloxy)-cyclobutens in das entsprechende Dien eine Temperatur von 180°C.^[58] Die Tetrahydropyranyloxymethylgruppe der Verbindung **54** erhöht die Elektronendichte der Doppelbindung, was eine höhere Stabilität bedeutet. Gemäß den Beobachtungen von Aben und Scheeren sind Elektronendonoren an C3 und C4 für die Ringöffnungsreaktion vorteilhaft.^[59] Die Stabilität von **54** wird jedoch durch Elektronenakzeptorwirkung der Acetylgruppen an diesen Positionen zusätzlich gesteigert. 3,4-Diacetoxycyclobutene verfügen somit über ein Substitutionsmuster, welches für Ringöffnung ungeeignet ist.

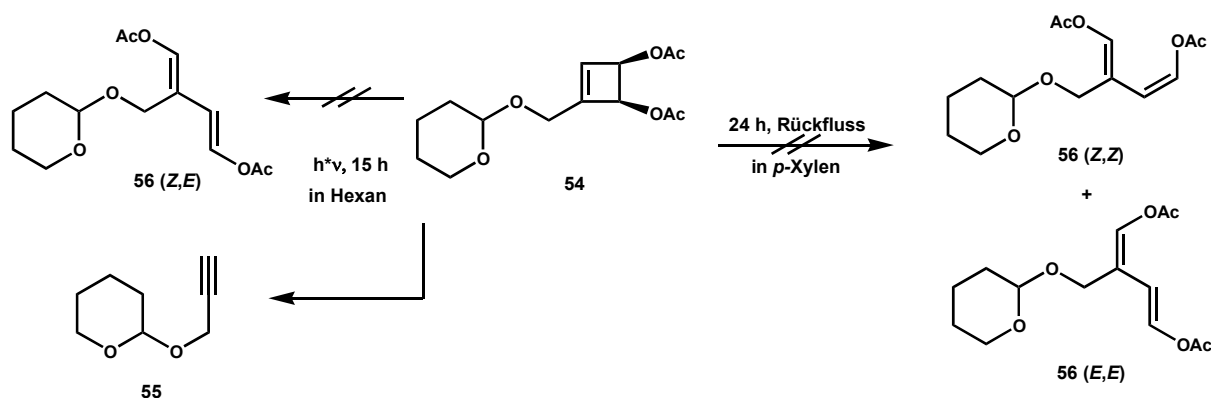


Abbildung 3.1.12: Das Modellcyclobuten **54** reagiert weder unter photolytischen noch unter thermischen Bedingungen zum Bisenoylacetat **56**.

Aus diesem Grund sollte auf das bereits von Commeiras verwendete Konzept der Enolacetylierung eines α,β -ungesättigten Aldehyds zurückgegriffen werden. In früheren Studien wurde bereits festgestellt, dass ein in α -Position substituierter Aldehyd wie zum Beispiel **57** zwar zu einem Bisenoylacetat reagieren kann, dabei aber gleichzeitig einer Eliminierungsreaktion unterliegt, welche zum Verlust der sekundären Acetoxifunktion führt (Abb. 3.1.13).^[60] Um diese Eliminierung zu unterbinden, muss daher ein α,β -ungesättigter Aldehyd verwendet werden, der an der β -Position substituiert ist. Dieses Substitutionsmuster entspricht dem des Taxifolials A (**32**), welches für die Caulerpenin-Totalsynthese erfolgreich verwendet wurde.^[47]

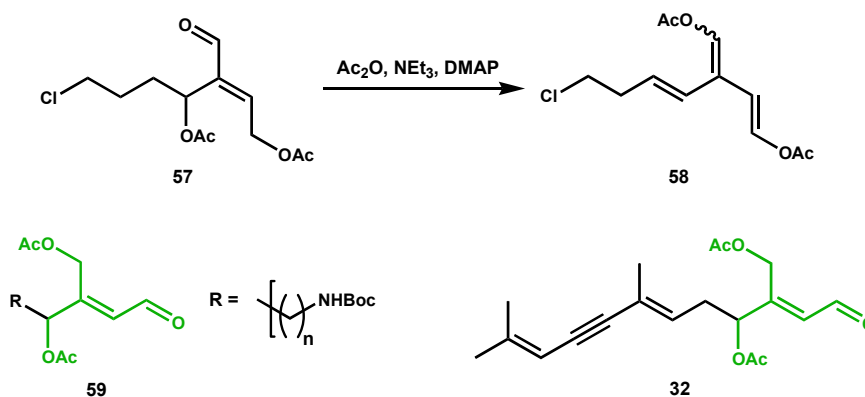


Abbildung 3.1.13: Oben: Der Aldehyd **57** reagiert zu dem Bisenoylacetat **58** unter Eliminierung von Essigsäure.

Unten: Für die Bisenoylacetatsynthese geeigneter Aldehyd **59** und in der Caulerpenin-Totalsynthese verwendetes Taxifolial A (**32**) mit dem erforderlichen Substitutionsmuster des α,β -ungesättigten Aldehyds (grün).

Ein schneller und effizienter Zugang zu Aldehyden vom Typ **59** wurde in der Ringöffnung eines α,β -ungesättigten Lactons **62** gesehen. Dabei sollte durch eine Reduktion das entsprechende Lactol **61** hergestellt und der im tautomeren Gleichgewicht stehende Aldehyd **60** zu **59** acetyliert werden (Abb. 3.1.14).

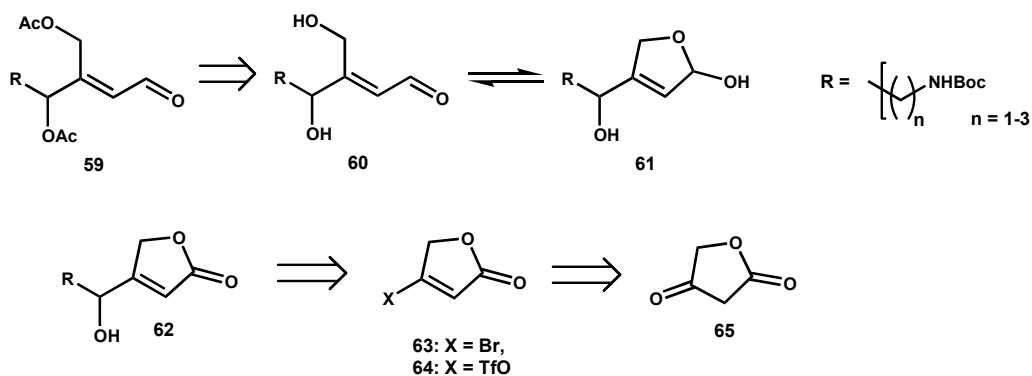


Abbildung 3.1.14: Retrosynthese des α,β -ungesättigten Aldehyds **59** unter Verwendung einer Ringöffnung des Lactols **61** ausgehend von Tetronsäure (**65**).

Dieses Reaktionsprinzip wurde an den Lactonen **63**, **64** und **66** getestet, da diese Verbindungen leicht aus der kommerziell erhältlichen Tetronsäure (**65**) zugänglich sind.^[61-63] Allerdings gestaltete sich bereits die Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) bei $T = -78^\circ\text{C}$ gemäß der Vorschrift von Lee *et al.* bei den erwähnten Verbindungen als problematisch, obwohl DIBAH ein sehr gut geeignetes Reagenz für derartige Lactolsynthesen ist.^[64, 65] Wurde das Reaktionsgemisch mit verdünnter Salpetersäure

gequencht, wurden neben den nicht umgesetzten Lactonen stets die überreduzierten Diolverbindungen **67**, **68** und **69** erhalten. Dieser Aspekt lässt darauf schließen, dass die entstehenden Lactole im Reaktionsgemisch zu den entsprechenden Aldehydverbindungen tautomerisieren können und sofort weiter reduziert werden. Nach der Vorschrift von Margaros *et al.* konnte bei der Verwendung von Methanol für den Abbruch der Reaktion zumindest das Bromid **63** zu dem gewünschten Produkt **70** reduziert werden (Abb. 3.1.15).^[66]

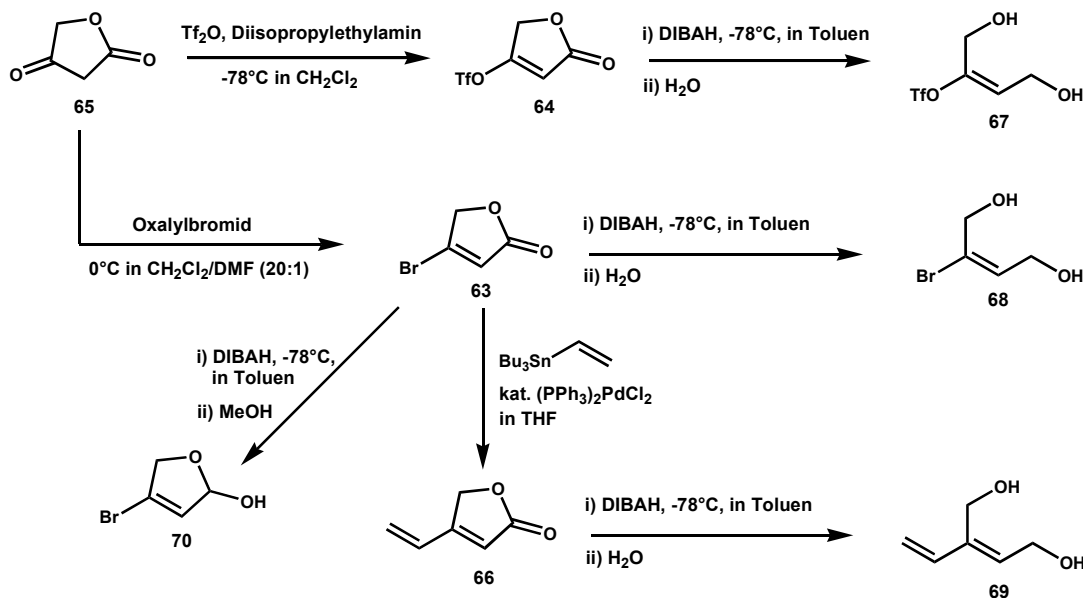


Abbildung 3.1.15: Synthese der α,β -ungesättigten Lactone **63**, **64** und **66** und deren Umsetzung mit DIBAH. Lediglich die bromierte Verbindung **63** konnte zu dem gewünschten Lactol **70** umgesetzt werden.

Die Aufreinigung dieser Verbindung mit Hilfe der Säulenchromatographie erwies sich als schwierig, da sich das Produkt während der Trennung zersetzte. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes finden sich neben den Signalen des Lactols auch die des offenkettigen Aldehyds **71** (Abb. 3.1.16). Folglich wurde für weitere Synthesen das Rohprodukt verwendet.

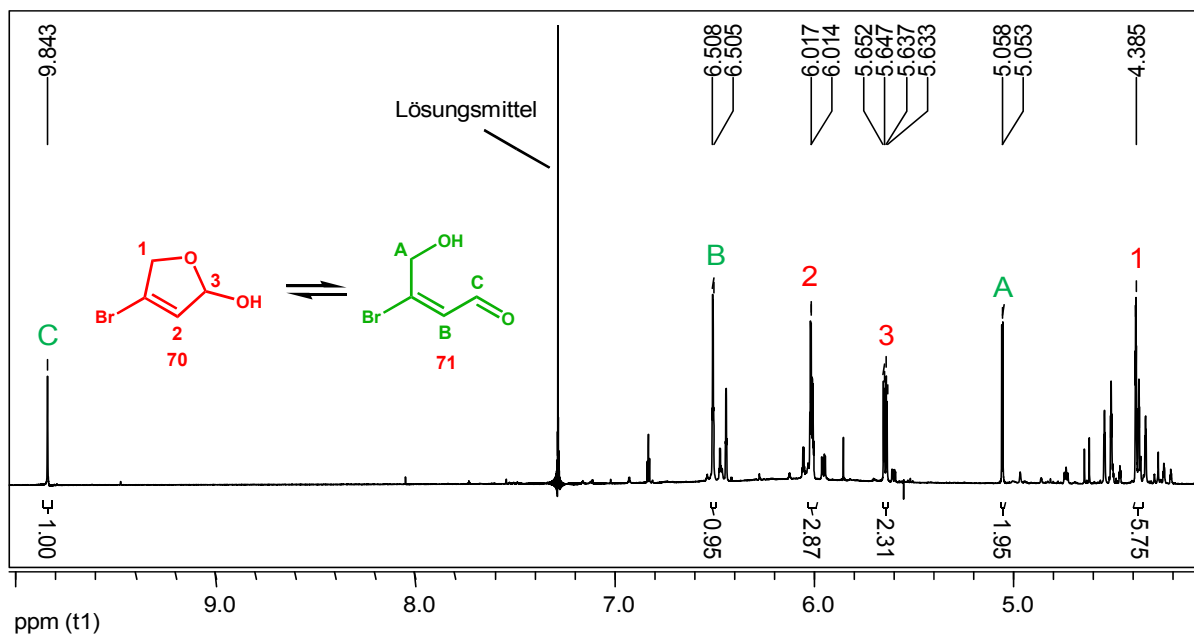


Abbildung 3.1.16: ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts der Reduktion von **63** mit Zuordnung der Signale zu dem Lactol **70** (rot) und dem Aldehyd **71** (grün).

Die Umsetzung des Rohprodukts mit Acetanhydrid und Triethylamin in Chloroform lieferte jedoch kein Acetylierungsprodukt **72** des offenkettigen Aldehyds **71**, lediglich Spuren eines acetylierten Lactols **73** konnten nachgewiesen werden (Abb. 3.1.17). Offensichtlich überwiegt unter diesen Bedingungen die Lactolform als bevorzugtes Tautomer, so dass sich die Verbindung **75** nicht bilden konnte. Als Alternative wurde versucht durch die Verwendung einer Lipase eine selektive Acetylierung von **71** zu erreichen. Villo *et al.* konnten mithilfe der Lipase B aus *Candida antarctica* eine Ringöffnung von 3-Bromo-tetrahydrofuran-2-ol (**74**) erreichen, so dass dieses in seiner offenkettigen Form als entsprechender Essigsäureester **75** abgefangen werden konnte (Abb. 3.1.17).^[67]

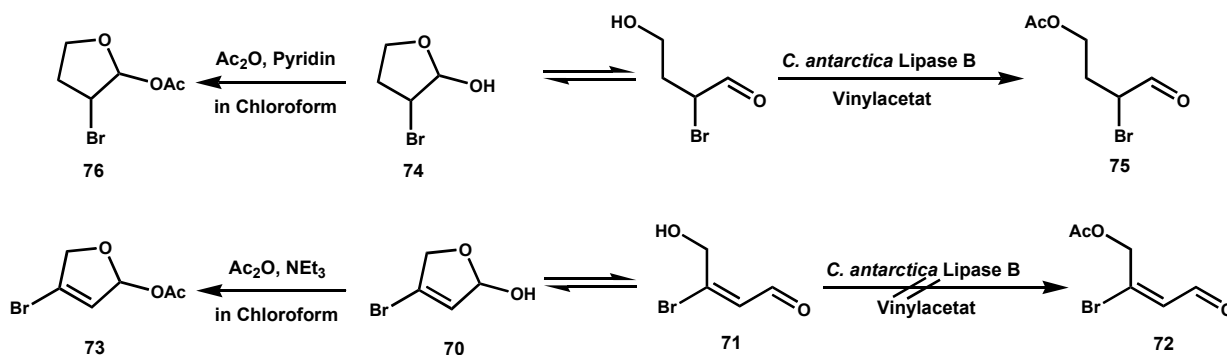


Abbildung 3.1.17: Oben: Acetylierung von Lactol **74** mit Acetanhydrid bzw. Lipase,^[67]

Unten: Bei dem analog durchgeführten Syntheseversuch mit Lactol **70** führt die enzymatische Acetylierung nicht zum erwarteten α,β -ungesättigten Aldehyd **72**.

Bei der Reaktion von **70** mit Vinylacetat in Gegenwart von immobilisierter *C. antarctica* Lipase B gemäß dieser Anleitung, konnte jedoch kein Umsatz festgestellt werden. Offenbar akzeptierte die Lipase die Verbindung **71** nicht als geeignetes Substrat für die Acetylierung. Die Ursache dafür kann in der zusätzlichen Doppelbindung im Vergleich zu **74** oder dem Bromsubstituenten in 4-Position statt in 3-Position begründet sein. Dieses Ergebnis ist überraschend, da laut Literatur dieses Enzym über eine hohe Substrattoleranz verfügt und daher sehr häufig in enzymkatalysierten Reaktionen eingesetzt wird.^[68-70]

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es daher nicht, α,β -ungesättigte Aldehyde und damit die entsprechenden Bisenoylacetate über die reduktive Ringöffnung von Lactonen zugänglich zu machen. Der Aufbau des Kohlenstoffgerüsts dieser Aldehyde sollte daher in enger Anlehnung an die Synthesevorschrift von Commeiras *et al.* erfolgen.^[47, 71]

3.1.4 Testreaktionen für den Aufbau des Kohlenstoffgerüsts

Aus den Ergebnissen der bisherigen Reaktionen wurde ersichtlich, dass einerseits ein effektiver Zugang zu den gewünschten Bisenoylacetaten über α,β -ungesättigte 4-Hydroxyaldehyde mit β -Substitution möglich ist. Andererseits müssen die Alkoholfunktionen geschützt oder bereits acetyliert vorliegen, um eine Lactolbildung zu unterbinden. Commeiras *et al.* verwendeten dazu von Butindiol ausgehend ein Synthon, bei dem durch die Einführung einer Schutzgruppe eine Differenzierung der beiden Hydroxyfunktionen erreicht wurde und sich die verbleibende Hydroxygruppe nach dem Aufbau des Kohlenstoffgerüsts selektiv acetylieren ließ. Dieses Prinzip bildete die Grundlage für die folgenden Testreaktionen (Abb.3.1.18).

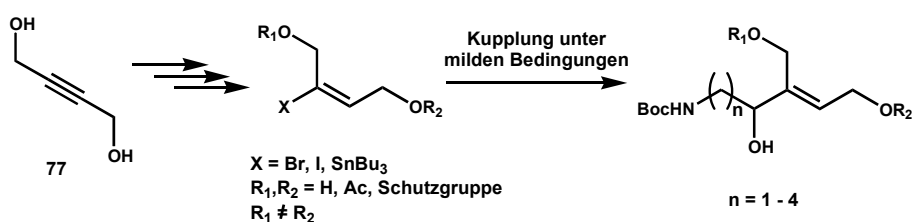
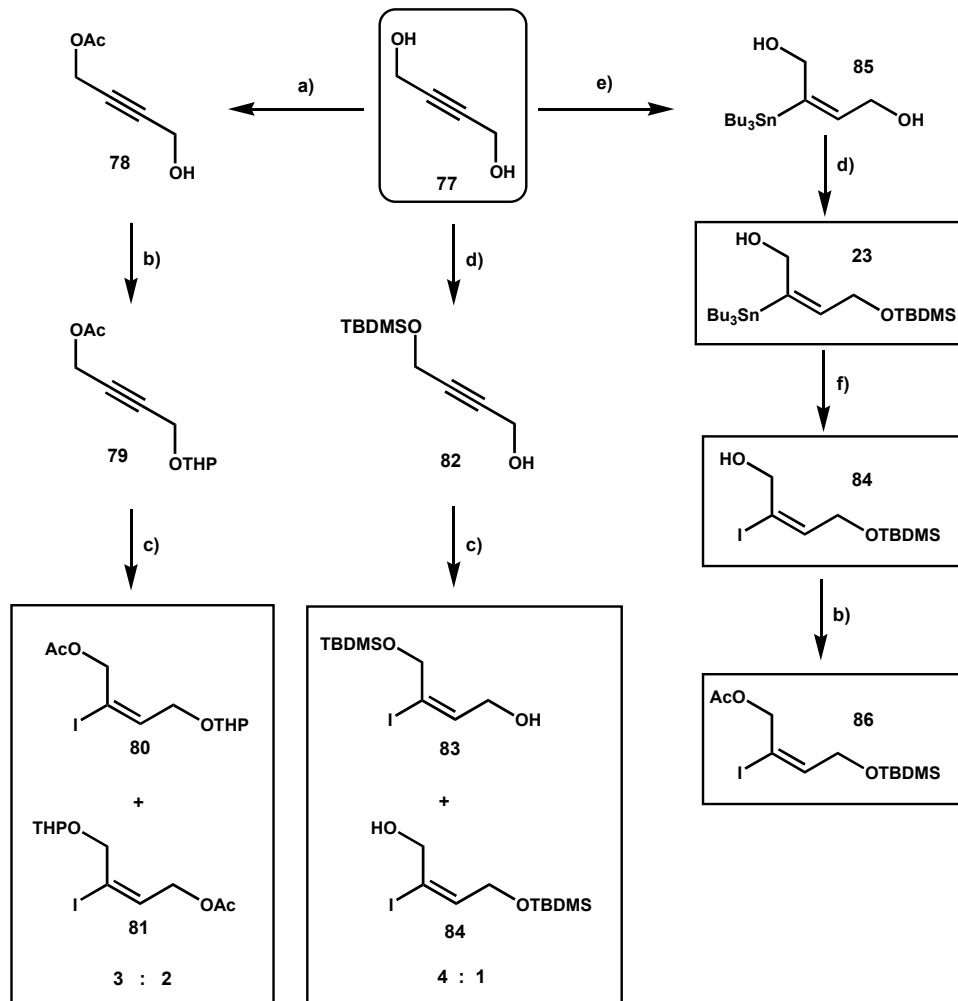


Abbildung 3.1.18: Prinzipieller Syntheseweg zum Aufbau des Kohlenstoffgerüsts der fluoreszenten Sonde über ein C4-Synthon ausgehend von Butin-1,4-diol (**77**)

Es wurde nach geeigneten Kupplungsreaktionen gesucht, mit welchen der Spacer und die sekundäre Hydroxy- bzw. Acetoxyfunktion an ein solches C4-Synthon eingeführt werden konnte. Diese Reaktionen mussten unter ausreichend milden Bedingungen ablaufen, da

andernfalls die Spaltung der geschützten Aminofunktion riskiert wird. Um verschiedene mögliche Kupplungsreaktionen zu untersuchen, wurden mehrere unterschiedliche C4-Synthons aus Butindiol hergestellt. Bei jeder dieser Verbindungen wurde entweder durch Monoacetylierung oder durch die Verwendung der Tetrahydropyranyl- oder *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe die Differenzierung der Hydroxygruppen erreicht (Abb. 3.1.19). Bei jeder Synthese der Synthons wurde eine Palladium-katalysierte *syn*-Addition des Tributylzinnhydrids an die Dreifachbindung genutzt, um eine Stannylgruppe einzuführen. Durch eine anschließende Iodierung konnte die für die Kupplungsreaktionen notwendige Iodidfunktion erhalten werden.^[72] Dank dieser Vorgehensweise lag jede dieser Verbindungen in *E*-Konfiguration vor. Allerdings konnten die Iodide **80** und **83** nur als Isomergemische mit **81** bzw. **84** erhalten werden, die sich mit den verfügbaren Methoden nicht trennen ließen. Im Rahmen dieser Experimente wurde dies allerdings in Kauf genommen und die Produktgemische für die weiteren Untersuchungen verwendet. Lediglich die Verbindung **84** wurde wegen des geringen Anteils im Produktgemisch in 3 Stufen über einen alternativen Syntheseweg als Reinverbindung hergestellt und zu **86** acetyliert.

Zu Beginn wurde versucht eines dieser C4-Synthons mit dem Carbonylkohlenstoff eines Aldehyden zu kuppeln. Ein solches Vorgehen hat den Vorteil, dass auf diesem Weg neben dem Kohlenstoffgerüst auch der sekundäre Alkohol aufgebaut wird.



	80	81	83	84	23	86
R₁	Ac	THP	TBDMS	H	H	Ac
R₂	THP	Ac	H	TBDMS	TBDMS	TBDMS
X	I	I	I	I	Bu ₃ Sn	I

Abbildung 3.1.19: Synthese von C₄-Synthons aus Butindiol (77).

a) NEt₃, Ac₂O in CH₂Cl₂/THF (3/1)^[73]

b) DHP, p-TsOH in CH₂Cl₂

c) 1) Bu₃SnH, kat. Pd(PPh₃)₄ in THF 2) I₂^[72]

d) TBDMSCl, NEt₃ in DMF^[74, 75]

e) Bu₃SnH, kat. PdCl₂(PPh₃)₂ in THF^[76]

f) I₂ in CH₂Cl₂^[77]

Für diesen Zweck wurde das Boc-geschützte 2-Aminoethanal (**88**) unter den Bedingungen einer Nozaki-Hiyama-Kishi Reaktion mit dem 2:3 Gemisch aus **80** und **81** sowie mit **86** umgesetzt. Dabei wurden die Vorschriften von Yoshido *et al.*^[78] und Nicolaou *et al.*^[79] verwendet (Abb. 3.1.20). Bei den Verbindungen **80** und **81** konnte lediglich eine vollständige Abspaltung der Tetrahydropyranylgruppe innerhalb von einer Reaktionszeit von 10 Stunden beobachtet werden, ein Kopplungsprodukt ließ sich nicht nachweisen. Bei **86**, allerdings wurde die Silylschutzgruppe wesentlich langsamer abgespalten als die THP-Gruppe, eine Kopplung wurde ebenfalls nicht beobachtet. Offensichtlich ließen sich **80**, **81** und **86** nicht in den katalytischen Kreislauf einbinden, da möglicherweise das Chrom(II) nicht effektiv in die Kohlenstoff-Iod-Bindung insertieren konnte.

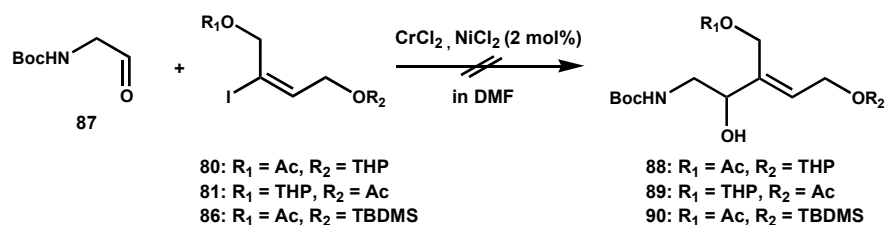


Abbildung 3.1.20: Die Nozaki-Hiyama-Kishi-Reaktion von N-Boc-Aminoethanal mit den C4-Synthons **80**, **81**, und **86** findet nicht statt.

Folglich erschien es hilfreich, die Iodide in die entsprechenden reaktiven organometallischen Verbindungen umzuwandeln, welche anschließend mit **87** umgesetzt werden könnten. Dieses Vorgehensweise entspricht prinzipiell der von Commeiras *et al.* entwickelten Methode, bei der aus dem Vinylstannan **86** durch Transmetallierung das entsprechende lithiumorganische Intermediat gebildet wird, welches in der Lage ist, bereits bei sehr niedrigen Temperaturen an Aldehyde zu addieren. Statt der sehr reaktiven Lithiumverbindungen, wurde jedoch versucht, die wesentlich weniger reaktiven Organozinkanaloga herzustellen. Der Vorteil von Organozinkverbindungen beruht darin, dass diese Carbamate und Ester tolerieren, jedoch in der Lage sind an Aldehyde zu addieren, wodurch sekundäre Alkohole zugänglich werden.^[80, 81] Zunächst wurde versucht, die Organozinkverbindungen **91**, **92** und **93** direkt aus den Iodiden **80**, **81** und **86** herzustellen. Allerdings konnte bei der Reaktion der Iodide mit Zinkstaub nach Šilhár *et al.*, bei GC/MS-Analyse der hydrolysierten Proben kein Umsatz festgestellt werden.^[82] Aus diesem Grund wurden zuerst die Lithiumverbindungen erzeugt, welche *in-situ* durch Transmetallierung mit Zinkbromid in die Organozinkverbindungen überführt werden sollten.^[83] Bei dieser Synthese wurde *n*-Butyllithium eingesetzt, weshalb keine Acetylgruppen-tragenden C4-Synthons verwendet werden konnten, da dies zu einer

Spaltung der Ester geführt hätte. Stattdessen wurde das Alkoholgemisch von **83** und **84** verwendet, sowie das Vinylstannan **23**, da dessen Transmetallierung mit *n*-Butyllithium bereits beschrieben wurde.^[47] Es wurde ein Überschuss an *n*-Butyllithium eingesetzt, um die Dianionen **94**, **95** und **96** zu bilden, bevor gemäß der Vorschrift von Ma und Zhang eine Zinkbromid-Lösung in THF zugegeben wurde.^[83] Die Reaktionskontrollen mittels Dünnschichtchromatographie der hydrolysierten Proben zeigten dabei nahezu vollständigen Umsatz der Ausgangsverbindungen. Eine Reaktion dieser Zinkorganyle mit dem Aldehyd **87** zu den gewünschten Kupplungsprodukten **100**, **101** und **102** (Abb. 3.1.21) blieb jedoch aus.

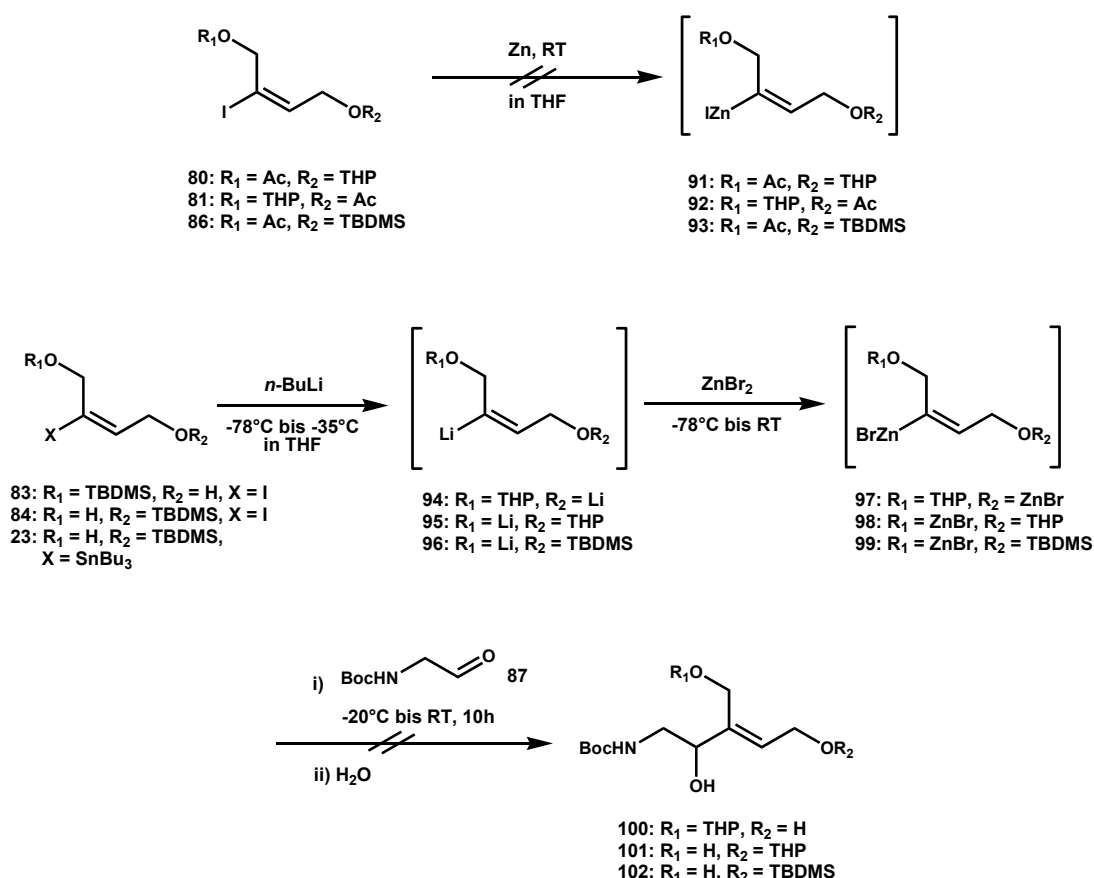


Abbildung 3.1.21: Synthese von Organozinkverbindungen aus C4-Synthons und Versuche zur anschließenden Umsetzung mit N-Boc-Aminoethanal **87**.

Da eine Kopplung an den Aldehyd **87** nicht möglich war, waren die folgenden Versuche darauf ausgerichtet, zunächst nur das Kohlenstoffgerüst mit dem Spacer und der Ankergruppe aufzubauen und anschließend die sekundäre Hydroxygruppe in einem separaten Reaktionsschritt, beispielsweise durch Oxidation mit Selendioxyd, einzuführen (Abb. 3.1.22).^[84]

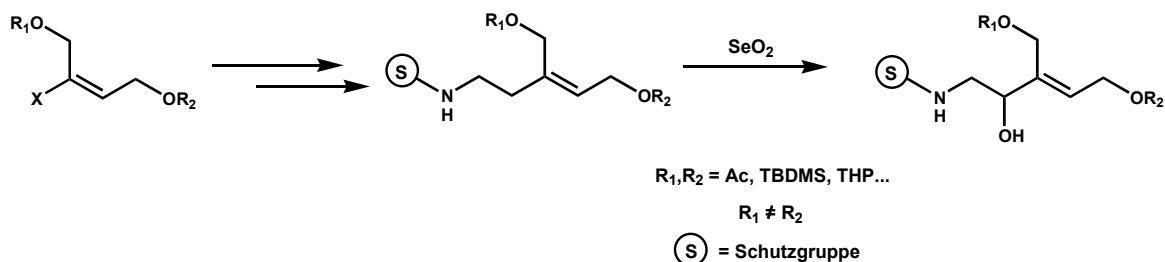


Abbildung 3.1.22: Prinzipieller Aufbau des Kohlenstoffgerüsts mit anschließender Einführung der sekundären Hydroxygruppe.

Hierzu wurde das aus *N*-Boc-2-aminoethanol zugängliche Iodid **103** in die entsprechende Organozinkverbindung **104** überführt, um diese über eine Negishi-Reaktion gemäß der Vorschriften von Dimopoulos *et al.* sowie Drouet und Theodorakis an die Iodide **80**, **81** und **86** zu koppeln.^[85, 86] Zwar konnte **103** nahezu vollständig zu **104** umgesetzt werden, die Kupplungsreaktion fand jedoch nicht statt (Abb. 3.1.23).

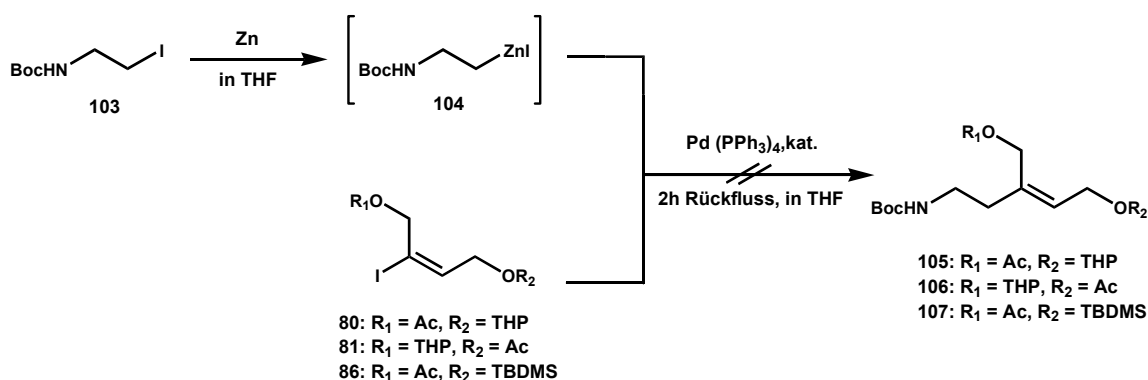


Abbildung 3.1.23: Die Negishi-Reaktion von *N*-Boc-2-iodoethylamin (**87**) mit **80**, **81** und **86** findet nicht statt.

Da es nicht möglich war, den Spacer mit der Ankerfunktion in einem Schritt einzufügen, sollte zunächst nur der Spacer mit dem C4-Synthon gekuppelt und anschließend erst die Ankergruppe und die sekundäre Hydroxyfunktion eingefügt werden. Mit Hilfe der Stille-Kupplung sollte eine Vinylgruppe an ein C4-Synthon gebunden werden, welche als C1-Spacer fungieren sollte.^[87, 88] Nach Epoxidierung könnte dann durch eine Ringöffnung mittels Nukleophil^[89] sowohl die sekundäre Hydroxygruppe als auch die Ankerfunktion gebildet werden (Abb. 3.1.24).

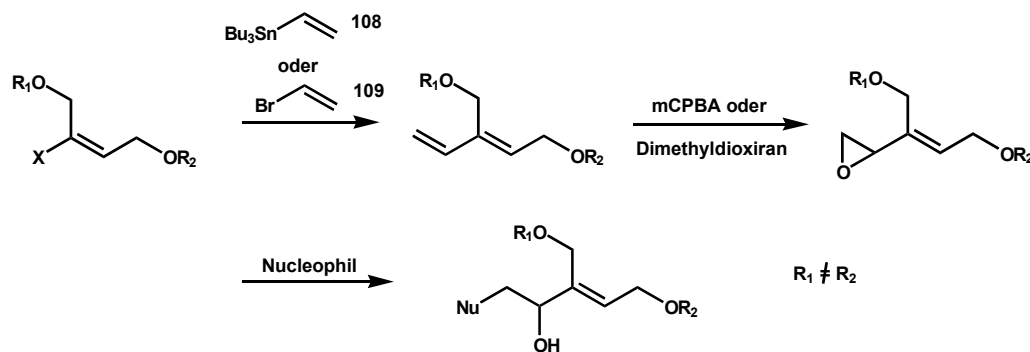


Abbildung 3.1.24: Prinzipieller Syntheseweg über Stille-Kupplung, Epoxidierung und Öffnung des Oxirans durch ein als Ankergruppe geeignetes Nucleophil.

Bei diesen Reaktionen wurden **80**, **81** und **86** mit Tributylvinylzinn (**108**) nach der Vorschrift von Greshock und Funk umgesetzt,^[90] hierbei konnte jedoch durch Dünnschichtchromatographie (DC) und GC/MS-Analysen kein Umsatz festgestellt werden. Auch nach dem Wechsel von Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium auf Bisacetonitril-palladiumdichlorid als Katalysator, beschrieben in der Vorschrift von Drouet und Theodorakis,^[85] blieb die erwünschte Reaktion aus. Ebenso erfolgte unter diesen Bedingungen keine Reaktion von **23** mit Vinylbromid (**109**) (Abb. 3.1.25).

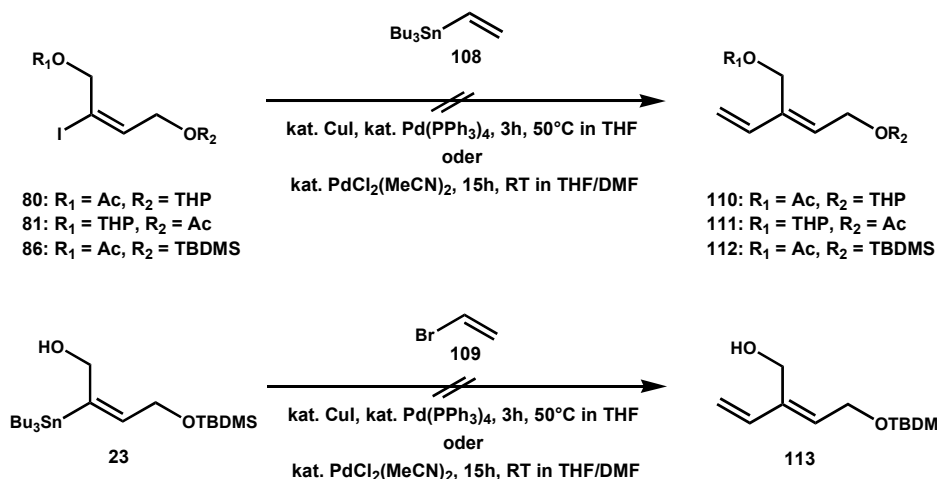


Abbildung 3.1.25: Stille-Reaktion der C4-Synthons zu den Vinylverbindungen findet nicht statt.

Es konnte keine erfolgreiche Methode für den Aufbau des Kohlenstoffgerüsts unter milden Bedingungen entwickelt werden. Folglich musste von dem ursprünglichen Synthesepfad abgewichen werden. Die Verwendung einer alternativen Ankergruppe für das Anheften des Fluorophors anstelle der Aminogruppe schien an dieser Stelle die beste Lösung zu sein.

3.1.5 Testreaktionen unter Verwendung der „Click“-Reaktion

Die wichtigsten Kriterien bei der Wahl einer geeigneten Ankergruppe waren neben der Kompatibilität mit *n*-Butyllithium, dass diese funktionelle Gruppe eine möglichst vollständige Addition des Fluorophors erlaubt und die Reaktion unter äußerst milden und möglichst pH-neutralen Bedingungen abläuft. Die erstmalig von Tornøe *et al.*^[91] beschriebene Kupfer(I)-katalysierte Addition von terminalen Alkinen und Aziden (Abb. 3.1.26) läuft nahezu quantitativ ab und lässt sich in einer Vielzahl von Lösungsmitteln unter sehr milden Bedingungen durchführen. Aufgrund der sehr hohen Selektivität und Stabilität der entstehenden 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazole wird diese Reaktion auch als Paradebeispiel für die „Click“-Chemie angesehen, deren Konzept von Sharpless aufgestellt wurde.^[92] „Click“-Chemie umfasst Reaktionen und Synthesewege die modular aufgebaut sind, hohe Ausbeuten erzielen und stereospezifisch sind. Außerdem sollten sie unter einfachen Bedingungen ablaufen, leicht verfügbare Reagenzien und Lösungsmittel erfordern und eine simple Produktisolierung ermöglichen. Typischerweise verfügen diese Reaktionen über eine hohe thermodynamische Antriebskraft, die zur Bildung von einem Reaktionsprodukt führt und keine oder wenige Nebenprodukte zulässt. Da Kupfer(I)-katalysierte Addition von Alkinen und Aziden erfolgt einen Großteil dieser Bedingungen und wird deshalb in der Literatur als die „Click“-Reaktion bezeichnet.

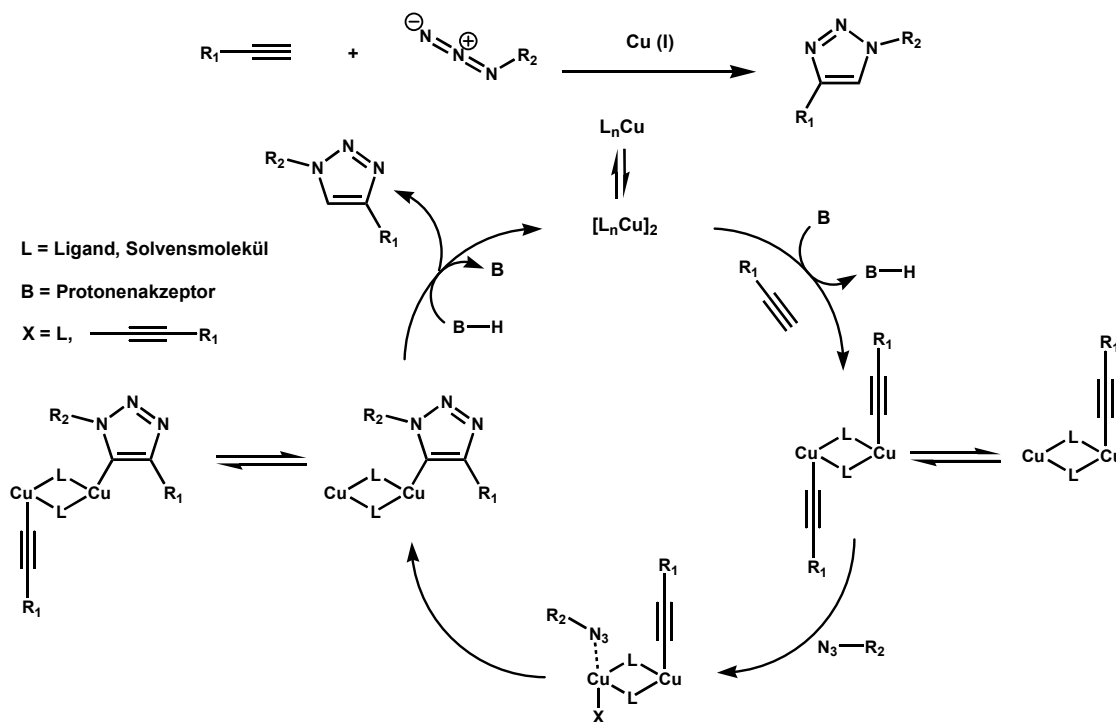


Abbildung 3.1.26: Reaktionsverlauf der Kupfer(I)-katalysierten [2+3]-Cycloaddition von terminalen Alkinen und Aziden zu 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen nach Rodionov *et al.*^[93]

Diese Synthese könnte für die Kopplung des Fluorophors an ein Bisenoylacetat geeignet sein, wenn eine terminale Alkin- oder Azidgruppe vorhanden ist.

Zhang *et al.* konnten bei Verwendung von Ruthenium-basierten Katalysatoren anstelle der Kupfer-(I)-Katalysatoren, statt der 1,4-substituierten Triazole die isomeren 1,5-substituierten Triazole gewinnen.^[94] Während die kupferkatalysierte Reaktion aufgrund der intermediären Kupferacetylidkomplexe, auf terminale Alkine beschränkt ist, lassen sich durch die Verwendung von $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ auch interne Alkene wie zum Beispiel Diphenylacetylen an Azide addieren.

Da auch Caulerpenin (**5**) eine interne Dreifachbindung enthält, wurde untersucht, ob sich Azide mit Hilfe dieses Katalysators an **5** addieren lassen. Auf diese Weise wäre es möglich, **5** mit einem Azidofluorophor zu koppeln und als fluoreszente Sonde zu verwenden ohne das 1,4-Bisenoylacetat von Grund auf zu synthetisieren. Desweiteren gestaltet sich die Extraktion und Aufreinigung von **5** aus *C. taxifolia* sehr einfach. Folglich wurde Benzylazid (**114**) als Testverbindung nach der Vorschrift von Zhang *et al.* mit aufgereinigtem Caulerpenin (**5**) umgesetzt (Abb. 3.1.27).^[94]

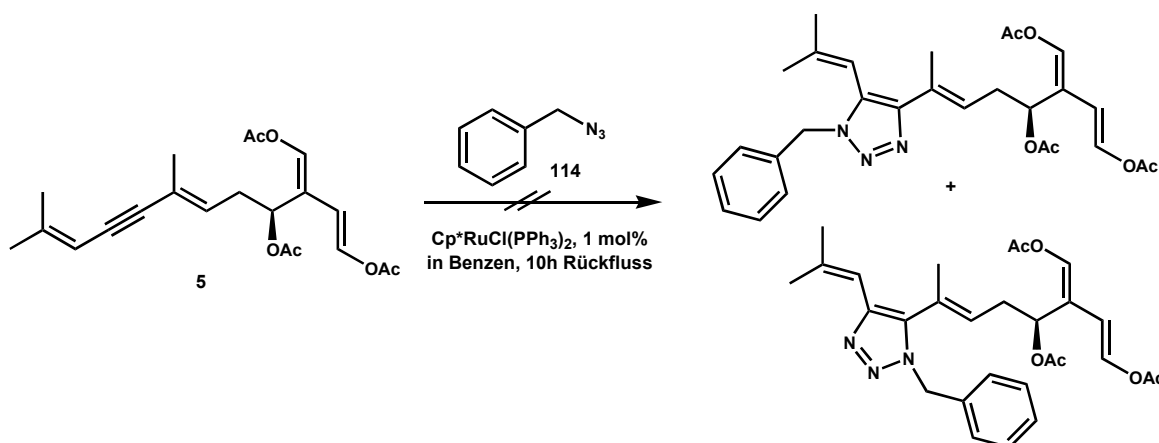


Abbildung 3.1.27: Die Ruthenium-katalysierte Addition von Benzylazid (**114**) an Caulerpenin (**5**) gelingt nicht.

Jedoch ließ sich auch nach langen Reaktionszeiten von 10 Stunden kein Umsatz feststellen. Möglicherweise verhinderte die Konjugation der benachbarten Doppelbindungen in **5** die Addition der Dreifachbindung an das Azid.

Die Verwendung von fluoreszent markiertem Caulerpenin (**5**) als Sonde stellte eine sehr attraktive Alternative zur mehrstufigen Bisenoylacetatsynthese dar, somit wurde zunächst an diesem Prinzip festgehalten. Da die Caulerpenin-eigene Dreifachbindung für die Addition nicht geeignet war, wurde überprüft, ob sich eine Azidfunktion unter milden Reaktionsbedingungen in **5** einführen ließ.

Waser *et al.* entwickelten 2005 eine Methode, bei der formal Stickstoffwasserstoffsäure an ein Alken addiert.^[95] Diese Kobalt-katalysierte Reaktion läuft unter relativ milden

Bedingungen ab und toleriert eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, darunter auch Esterfunktionen. Werden dabei α,α -disubstituierte bzw. trisubstituierte Alkene verwendet, so entstehen tertiäre Azide. Als Azidquelle dienen hierbei Alkyl- und Arylsulfonylazide, welche allerdings nur begrenzt kommerziell erhältlich sind. Eine verbesserte Methode, bei der ausschließlich käufliche Arylsulfonazide verwendet werden, wurde zwei Jahre später veröffentlicht.^[96] Nach dieser Vorschrift wurden Versuche mit Caulerpenin (**5**) durchgeführt, in denen das Natriumsalz der 4-Azidosulfonylbenzoesäure als Azidquelle diente, da dieses leichter zu handhaben ist als die Säure (Abb. 3.1.28). Das Salz wurde zuvor mit Natriumhydrid aus der käuflichen, freien Säure hergestellt.

NMR-spektroskopische Untersuchungen des isolierten Produktes sprachen für eine erfolgreiche, selektive Hydroazidierung der Doppelbindung an C6. Dieses Ergebnis stimmt mit denen von Guerriero und D'Ambrosio überein, die durch Epoxidierung von **5** diese Doppelbindung als die Reaktivere nachweisen konnten.^[97] Das ESI-Massenspektrum zeigte, dass das erhaltene Produkt mehr als die doppelte molare Masse von Caulerpenin (**5**) besitzt. Das lässt auf eine Dimerisierung schließen, möglicherweise eine Folgereaktion des Azids. Wurde diese Verbindung in Anlehnung an die Vorschrift von Himo *et al.* in Gegenwart von in-situ generiertem Cu(I) mit Boc-geschütztes Propargylamid umgesetzt, konnte keine Addition im Sinne der „Click“-Chemie beobachtet werden.^[98]

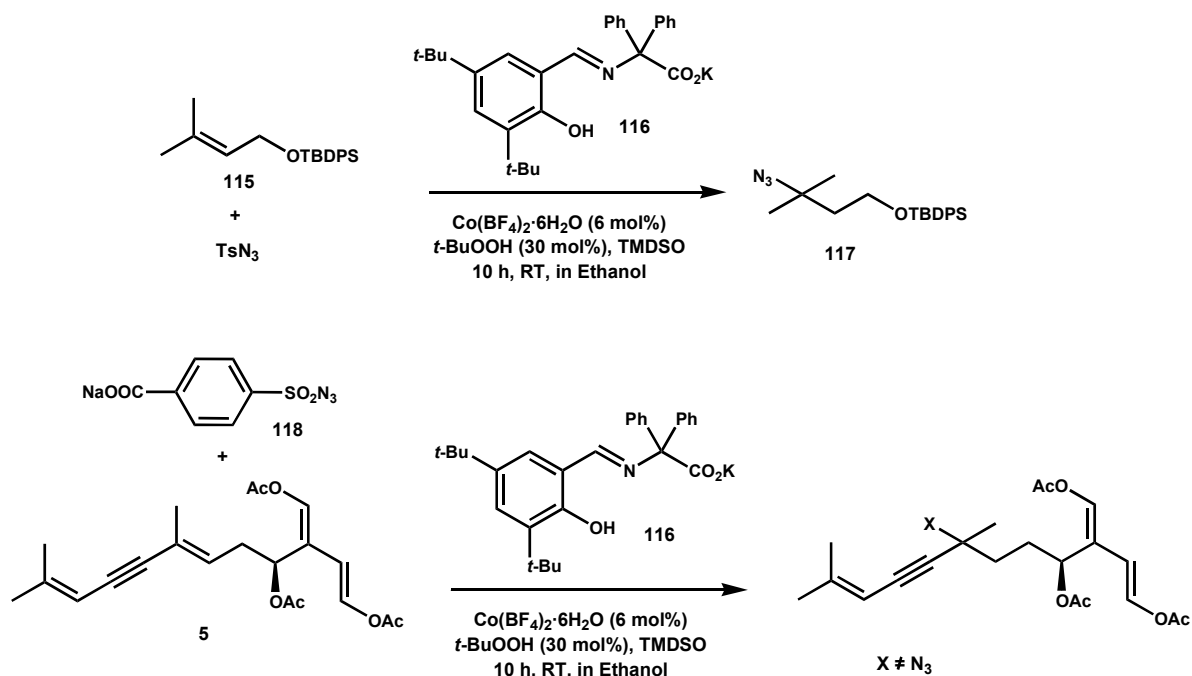


Abbildung 3.1.28: oben: Hydroazidierung eines trisubstituierten Alkens nach Waser *et al.*^[95]

unten: Bei der Hydroazidierung von Caulerpenin (**5**) wird nicht das erwünschte Azid erhalten.

Dies belegt, dass es sich hierbei nicht um das gewünschte Azid handeln konnte. Somit gelang es nicht, Caulerpenin (**5**) selbst fluoreszent zu markieren.

Folglich musste ein Bisenoylacetat mit einer terminalen Alkinfunktion oder mit einer Azidgruppe synthetisiert werden, um anschließend das Fluorophor mittels der „Click“-Reaktion einzuführen. Um dies zu erreichen, musste ein Aldehyd, der eine dieser Funktionen enthält mit **23** unter Verwendung von *n*-Butyllithium gekoppelt werden. Da terminale Alkine leicht unter diesen Bedingungen deprotoniert werden und somit Nebenreaktionen auftreten könnten, wurde ein Azidoaldehyd verwendet. Eine solche Verbindung wurde durch eine Umsetzung von Acrolein **119** mit Natriumazid nach der Vorschrift von Davies *et al.* gewonnen.^[99] Das dabei entstehende 3-Azidopropanal (**120**) neigte bei Raumtemperatur zur Zersetzung unter Stickstoffbildung und musste somit für jede Reaktion neu hergestellt werden. Bei der Umsetzung von **120** mit **23** nach der Vorschrift von Commeiras^[48] konnte das gewünschte Kopplungsprodukt zunächst nur mit 10 %iger Ausbeute erhalten werden. Die Reaktion wurde verbessert, indem das Gemisch aus *n*-BuLi und dem Vinylstannan **23** solange bei $T = -35^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde, bis die Transmetallierung vollständig abgelaufen war. Dies wurde durch DC von den hydrolysierten Proben überprüft. Zudem verbesserte auch der Einsatz von äquimolaren Mengen des Azidoaldehyds den Umsatz, so dass (*E*)-5-Azido-2-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-ethyliden]-pentan-1,3-diol (**121**) in 65 %iger Ausbeute erhalten werden konnte (Abb. 3.1.29).

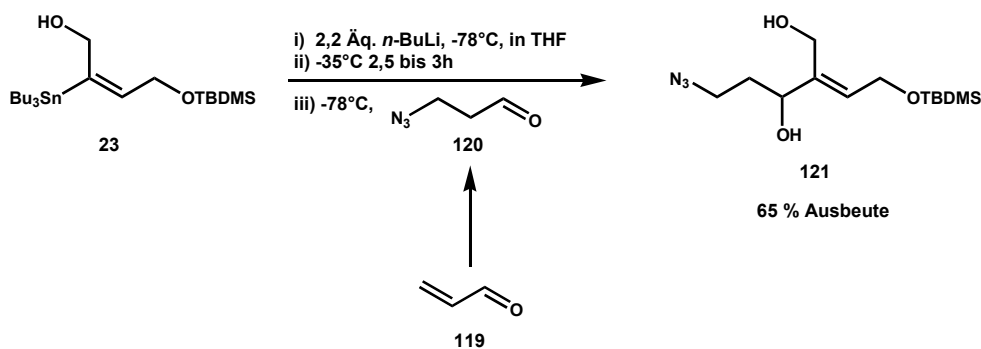


Abbildung 3.1.29: Kupplungsreaktion des Vinylstannans **86** mit dem aus Acrolein (**119**) hergestellten 3-Azidopropanal (**120**) zum Diol **121**, mit einer modifizierten Vorschrift nach Commeiras *et al.*^[48]

Somit war es in einem Schritt möglich das Kohlenstoffgerüst aufzubauen, eine Azidgruppe als Ankerfunktion für das Fluorophor sowie die sekundäre Hydroxygruppe einzuführen.

3.1.6 Synthese der fluoreszenten Sonde mittels „Click“-Reaktion

Die Synthese des Azidobisenoylacetats aus **121** wurde analog zu der Totalsynthese von Caulerpenin (**5**) durchgeführt. So wurden zunächst die Hydroxygruppen des Diols **121** acetyliert, um das Diacetat **122** zu erhalten. Anschließend wurde die Silylschutzgruppe entfernt. Bei Einsatz des dafür typischerweise verwendeten Reagenzes TBAF wird die Bildung von isomeren Produkten riskiert, da das entstehende Alkoholat-Ion die vorhandenen Acetylgruppen intramolekular angreift, was zu deren Verschiebung führt. Durch Verwendung von HF•Pyridin konnte dies jedoch stark unterdrückt werden, da hier das Alkoholat sofort protoniert wird. Auf diese Weise ließ sich der Alkohol **123** in zufriedenstellender Ausbeute erhalten. Der isomere Alkohol **124** konnte nur in geringen Mengen entstehen (Abb. 3.1.30).

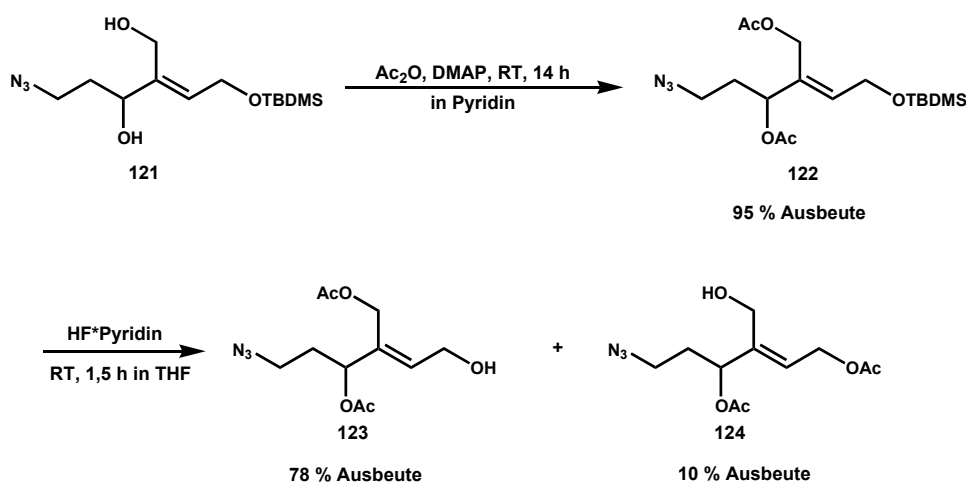


Abbildung 3.1.30: Acetylierung von **121** und anschließende Entfernung der Silylschutzgruppe liefert den Alkohol **123** als Hauptprodukt.

Die Oxidation von **123** mit Dess-Martin-Reagenz lieferte den α,β -ungesättigten Aldehyd **125**. Da sich dieser bei Raumtemperatur rasch zersetzt, wurde auf eine Aufreinigung dieser Verbindung verzichtet und sofort die Enolacetylierung durchgeführt. Dabei konnte ein 7:3 Gemisch der beiden Isomere **126** und **127** erhalten werden. Hierbei entspricht die Stereochemie des in geringeren Mengen vorkommenden $1E$ -Isomers **127** der von Caulerpenin (**5**) (Abb. 3.1.31). Dies ist mit den Ergebnissen von Commeiras vereinbar, in denen ein 6:4 Gemisch von *iso*-Caulerpenin und Caulerpenin (**5**) gewonnen wurde.^[48] **126** und **127** wurden als Gemisch für die Synthese der fluoreszenten Sonde weiter verwendet. Der nächste Schritt erforderte die Kupplung eines Fluorophors an die Azidgruppe unter Kupferkatalyse.

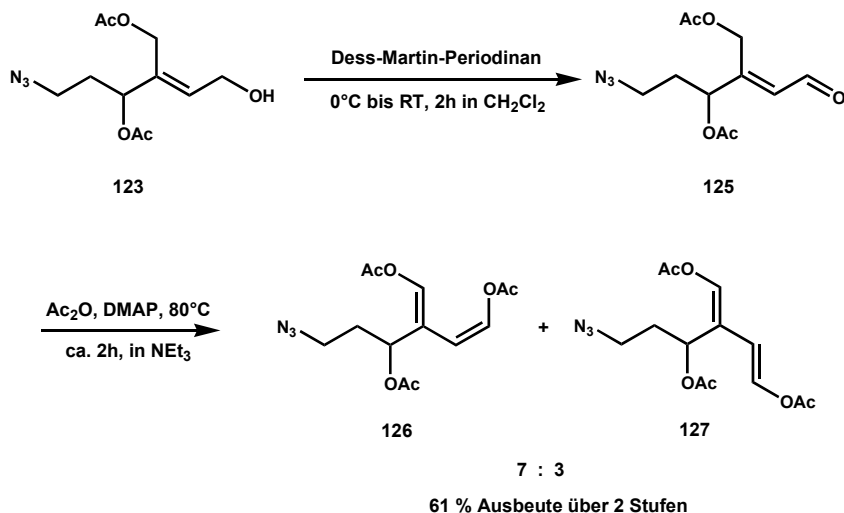


Abbildung 3.1.31: Die Dess-Martin-Oxidation von **123** und anschließende Enolacetylierung liefert ein 7:3 Gemisch der Bisenoylacetatisomeren **126** und **127**.

Als Fluorophor wurde DYTM-490 gewählt,^[100] da dessen Absorptions- und Emissionswellenlängen in einem Bereich liegen, in welchem kaum Fluoreszenz von Chlorophyll auftritt. Somit ist es für die Verwendung in Versuchen mit einer Grünalge gut geeignet. Da dieser Farbstoff nicht mit einer terminalen Alkinfunktion kommerziell erhältlich ist, wurde die käufliche NHS-Esterverbindung von DYTM-490 (**128**) mit einem Überschuss Propargylamin in DMF umgesetzt. Reaktionskontrollen mittels UPLC/ESI-MS zeigten, dass durch den Ausschluss von Wasser die konkurrierende Hydrolyse des NHS-Esters unterdrückt werden konnte und dieser vollständig zu DYTM-490-Propargylamid (**130**) reagierte (Abb. 3.1.32). Allerdings musste das Reaktionsgemisch nach beendeter Reaktion durch präparative Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt werden, um nicht umgesetztes Propargylamin (**129**) abzutrennen.

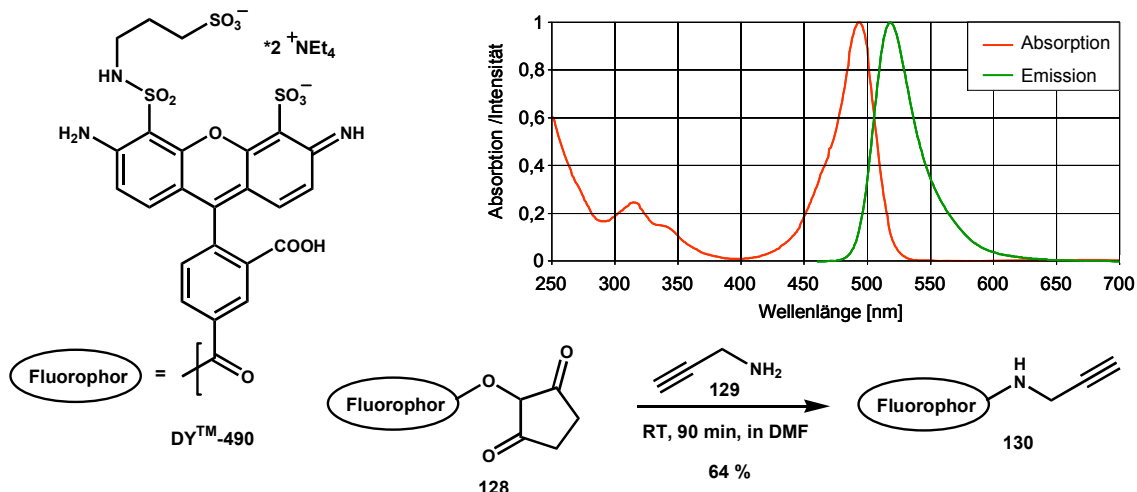


Abbildung 3.1.32: Links: verwendetes Fluorophor DY™-490

Oben rechts: Absorptions- und Emissionsspektrum von DY™490 (mit freundlicher Genehmigung der Dyomics GmbH)

Unten rechts: Synthese des DY™490-Propargylamid (**130**)

Die „Click“-Reaktion von **130** mit dem Gemisch aus **126** und **127** wurde nach der Vorschrift von Himo *et al.*^[98] durchgeführt, in welcher der Kupfer-(I)-Katalysator *in-situ* aus Kupfer-(II)-sulfat und Natriumascorbat erzeugt wird. Durch Verwendung eines Azidüberschusses konnte das Fluorophor vollständig an die Azide **126** und **127** gekoppelt werden, wie UPLC/ESI-MS-Messungen bestätigten. Dabei blieb deren Bisenoylacetateinheit intakt (Abb. 3.1.33). Das Produkt wurde mit präparativer Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt und durch NMR-Spektroskopie sowie UPLC/ESI-MS charakterisiert.

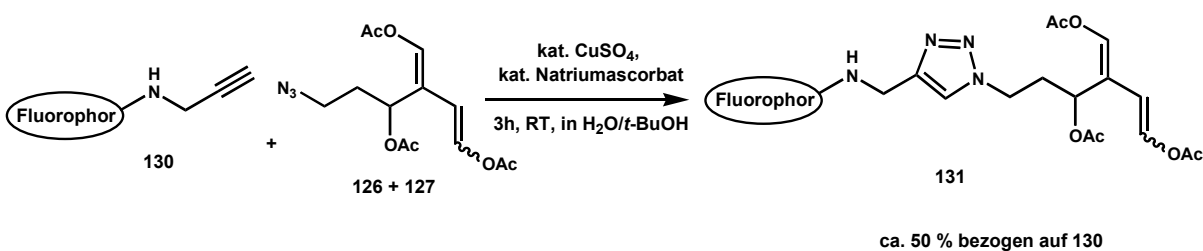


Abbildung 3.1.33: Kupplung des Fluorophors **130** mit den Azidobisenoylacetaten **126** + **127** via „Click“-Reaktion liefert die fluoreszente Sonde **131**.

Im ¹H-NMR-Spektrum konnten jedoch die Signale des 1*E*-Isomers von **131** aufgrund der sehr geringen Signalintensität nicht gefunden werden. Zwar zeigt der Produktpeak im Chromatogramm des Dioden-Arrays eine Schulter, was für das Vorliegen beider Isomere sprechen würde, jedoch ließ sich dies im Verlauf der Massensignale nicht bestätigen (Abb.3.1.34). Dennoch kann man davon ausgehen, dass sowohl **126** als auch **127** an das Fluorophor gekoppelt wurden und **131** als Isomerenmischung vorliegt.

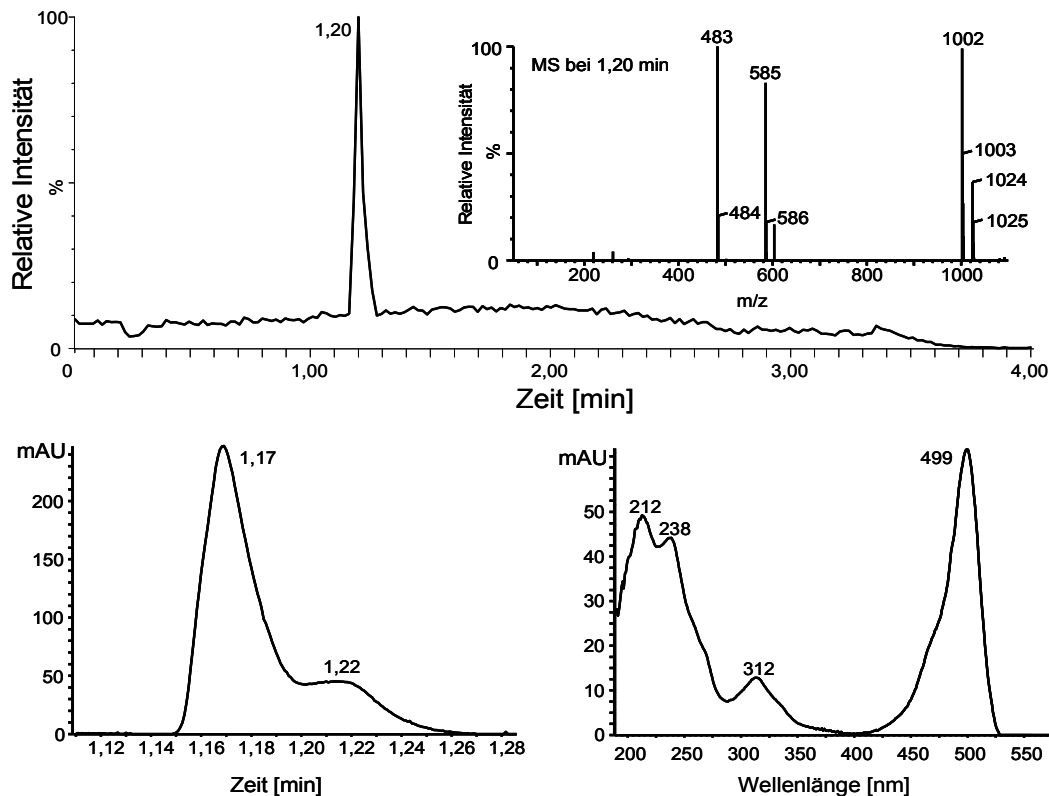


Abbildung 3.2.29: Oben: UPLC/ESI-MS-Chromatogramm (Ionenspur bei $m/z = 1002$) und Massenspektrum von **131** aufgenommen im negativen Modus
 Unten links: Ausschnitt des Diodenarray-Chromatogramm von **131**.
 Unten rechts: UV-Vis-Spektrum von **131**.

131 zeigte eine sehr gute Löslichkeit in Wasser, dank der ionischen Gruppen des DYTM-490, so dass diese Verbindung ausgezeichnet für *in-vivo*-Experimente mit der marinen *C. taxifolia* geeignet ist.

Mit DYTM-490-Bisenoylacetat **131** konnte somit erfolgreich eine fluoreszente Sonde hergestellt werden, die wie Caulerpenin (**5**) ein 1,4-Bisenoylacetatsystem besitzt und mit welcher die Wundverschlussreaktion der Alge genauer untersucht werden kann. Das dabei verwendete Syntheseprinzip resultierte in dem Azidobisenoylacetat **126** bzw. **127**, welches ein Baustein, für die Synthese von unterschiedlich substituierten 1,4-Bisenoylacetaten ist. An diese Verbindung lassen sich mittels der einfach durchzuführenden „Click“-Reaktion in einem Schritt an eine Vielzahl beliebig funktionalisierter Moleküle koppeln. Damit wurde der Zugang zu molekularen Werkzeugen eröffnet, mit denen sich das Reaktionsverhalten dieser Verbindungsklasse gegenüber Proteinen und Enzymen, wie Lipasen und Esterasen einfach untersuchen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde sich jedoch auf *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen mit **131** beschränkt.

3.2 *In-vivo*-Experimente mit *Caulerpa taxifolia*

3.2.1 Der verwundungsaktivierte Abbau von DYTM-490-Bisenoylacetat

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Esterasen von *Caulerpa taxifolia*, welche die Deacetylierung von Caulerpenin (**5**) katalysieren, auch die fluoreszente Sonde **131** als Substrat akzeptieren und in der Lage sind diese vollständig zu deacetylieren. Die Isolierung dieser Esterasen gestaltet sich jedoch sehr schwierig, da sie vermutlich als membrangebundene Enzyme vorliegen.^[25] Diese Reaktion ließ sich daher nicht außerhalb der Alge beobachten. Zudem ist noch nicht bekannt, wie eine Verwundung der Alge die beobachtete Esterase aktiviert. Zum Beispiel könnten aus einer Signalkaskade resultierende allosterisch wirkende Effektoren diese Enzyme aktivieren. Jedoch ließen sich bei *C. taxifolia* keine Hinweise auf derartige Verwundungsreaktionen, wie zum Beispiel ein sogenannter „oxidative burst“ finden, so dass diese Form der Aktivierung eher unwahrscheinlich ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Esterase in der intakten Alge durch Zellkompartimentierung von Caulerpenin (**5**) getrennt vorliegt. Bei Verwundung könnte diese Trennung mechanisch aufgehoben werden, so dass das Enzym in Kontakt mit **5** tritt. Daher schien der einfachste Weg für eine Reaktion der fluoreszenten Sonde mit aktiver Esterase eine Verwundung der Alge in Gegenwart von **131**. Ein sehr schnelles Mörsern der Alge bewirkte, dass ein homogenes Gemisch von Zellinhalt mit Zellwandfragmenten und der Lösung von **131** entstand. Bei diesem Vorgang wurde auch die Deacetylierung des in der Alge enthaltenen Caulerpenins (**5**) eingeleitet, wodurch beide Verbindungen um die aktive Esterase konkurrierten. In definierten Zeitabständen wurden Aliquote des Reaktionsgemisches per UPLC/ESI-MS analysiert. Durch diese Vorgehensweise konnte nachgewiesen werden, dass auch die fluoreszente Sonde **131** von der Alge im gleichen Maße wie Caulerpenin (**5**) abgebaut wird (Abb.3.2.1).

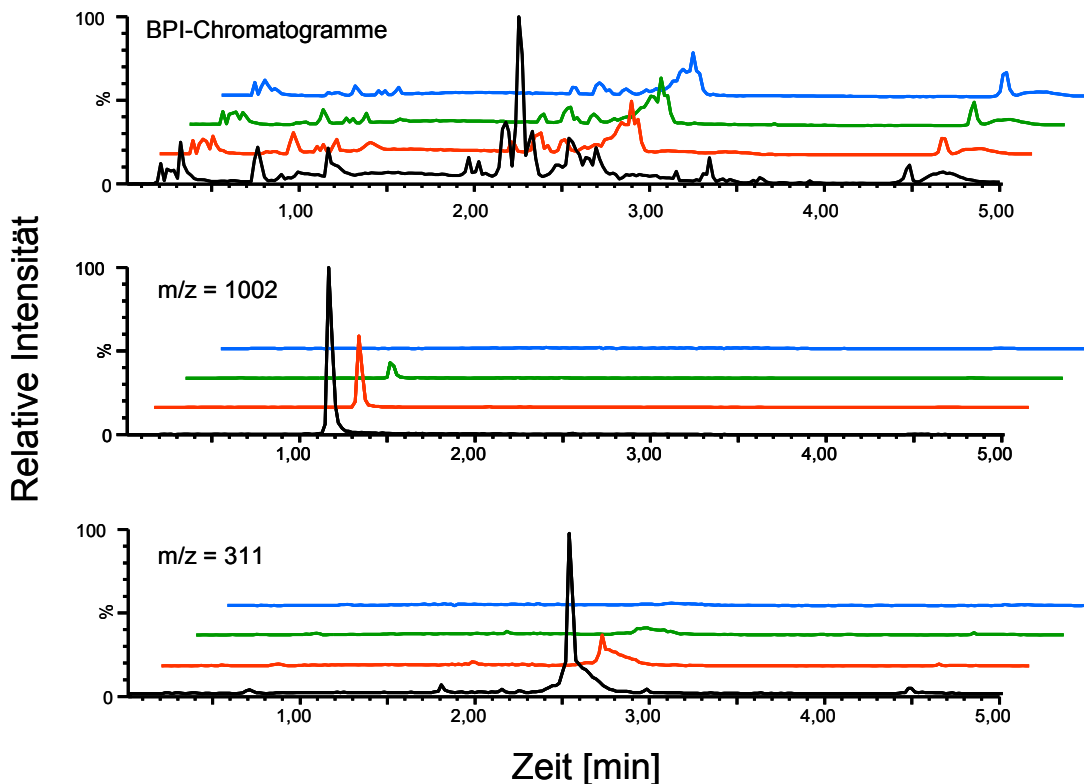


Abbildung 3.2.1: UPLC/ESI-MS Analyse der methanolischen Extrakte von *C. taxifolia*, die in Gegenwart von DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) verletzt wurde (schwarz: unmittelbar nach Verletzung, rot: 1 min nach Verletzung, grün: 2 min nach Verletzung, blau: 4 min nach Verletzung);
oben: negativer Modus BPI-Chromatogramme
Mitte: Ionenspur bei $m/z = 1002$ ($[M-H]^-$ -Peak von **131**)
unten: Ionenspur bei $m/z = 311$ (Basispeak von Caulerpenin (**5**) im negativen Modus)

Aufgrund seiner anionischen Gruppen ist die fluoreszente Sonde **131** nur in geringem Maße imstande, positive Ionen zu bilden. Folglich wurde der negative Modus des ESI-ToF-Massenspektrometers für die Analysen verwendet, obwohl sich Caulerpenin (**5**) im positiven Modus besser detektieren ließ. Der Molpeak ($[M-H]^-$) von **5** ($m/z = 373$) konnte jedoch nicht für die Detektion von **5** verwendet werden, da dieser als Fragmentpeak auch bei anderen Verbindungen im Extrakt gefunden wurde. Der für **5** charakteristische Fragmentpeak bei $m/z = 229$ ist gleichzeitig der Molpeak der durch Deacetylierung entstandenen Abbauprodukte wie Oxytoxin 2 (**13**) und der davon abgeleiteten Halbacetale (Abb. 3.2.2),^[25] so dass dieses Massensignal keine eindeutige Zuordnung erlaubte. Daher wurde die Massenspur $m/z = 311$ verwendet, wodurch **5** im negativen Modus semiquantitativ erfassbar war. Eine erneute Messung der Proben im positiven Modus war daher nicht nötig.

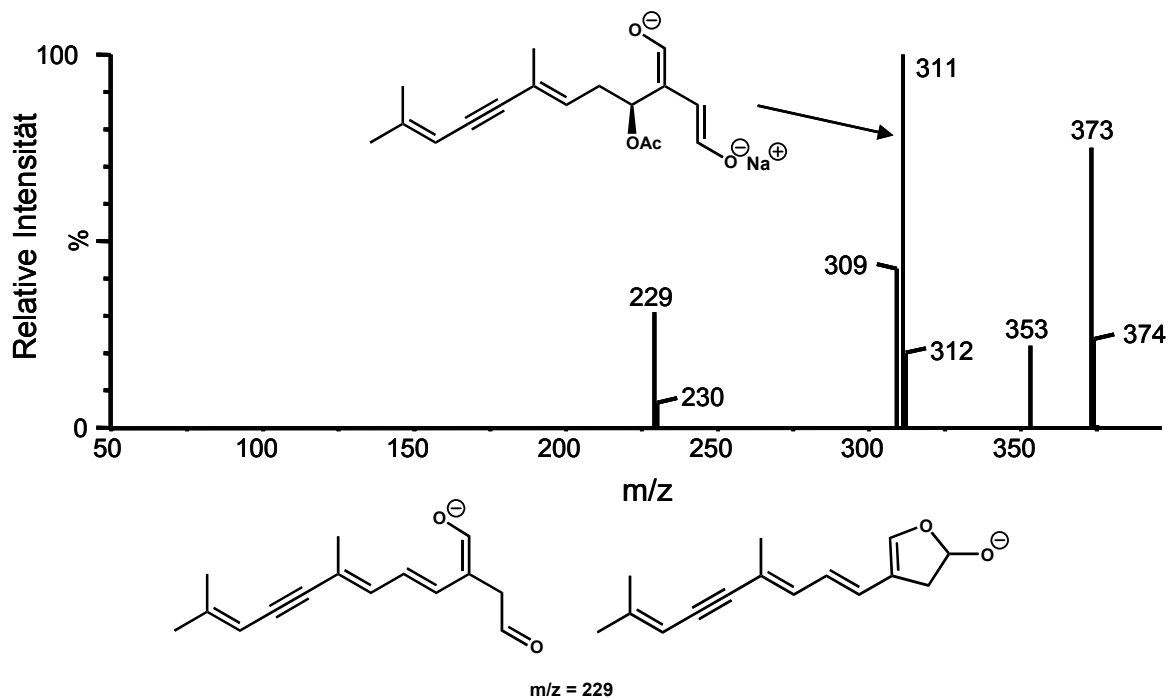


Abbildung 3.2.2: Oben: ESI-Massenspektrum von Caulerpenin (**5**) und postulierte Struktur des Fragmentions mit $m/z = 311$ (negativer Modus)
 Unten links: postulierte Struktur des Fragmentions mit $m/z = 229$
 Unten rechts: postulierte Struktur des Molekülions eines von Oxytoxin 2 (**13**) abgeleiteten Halbacetals

Nach 4 Minuten waren weder **5** noch **131** im Gemisch nachweisbar. Auch ließen sich keine durch Deacetylierung von **131** entstandene Abbauprodukte detektieren, sowie andere von **131** abgeleitete Verbindungen. Dieser Nachweis verfolgte mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit, durch das Verfolgen der Absorptionswellenlänge von 490 nm.

Das Fluorophor wird also während der Reaktion durch Enzyme der Alge entweder so verändert, dass sich seine optischen Eigenschaften ändern oder die Folgeprodukte von **131** liegen im unlöslichen Teil des Algenmaterials gebunden vor.

Um sicherzustellen, dass das Fluorophor nicht verändert wird und der beobachtete Abbau von **131** auf einer Deacetylierung des Bisenoylacetatsystems beruht, wurde der Versuch unter der Verwendung des DYTM-490-Propargylamids (**130**) wiederholt. Es konnte kein Abbau dieser fluoreszenten Verbindung beobachtet werden (Abb. 3.2.3), somit wurde die Stabilität des Fluorophors unter diesen Bedingungen bestätigt.

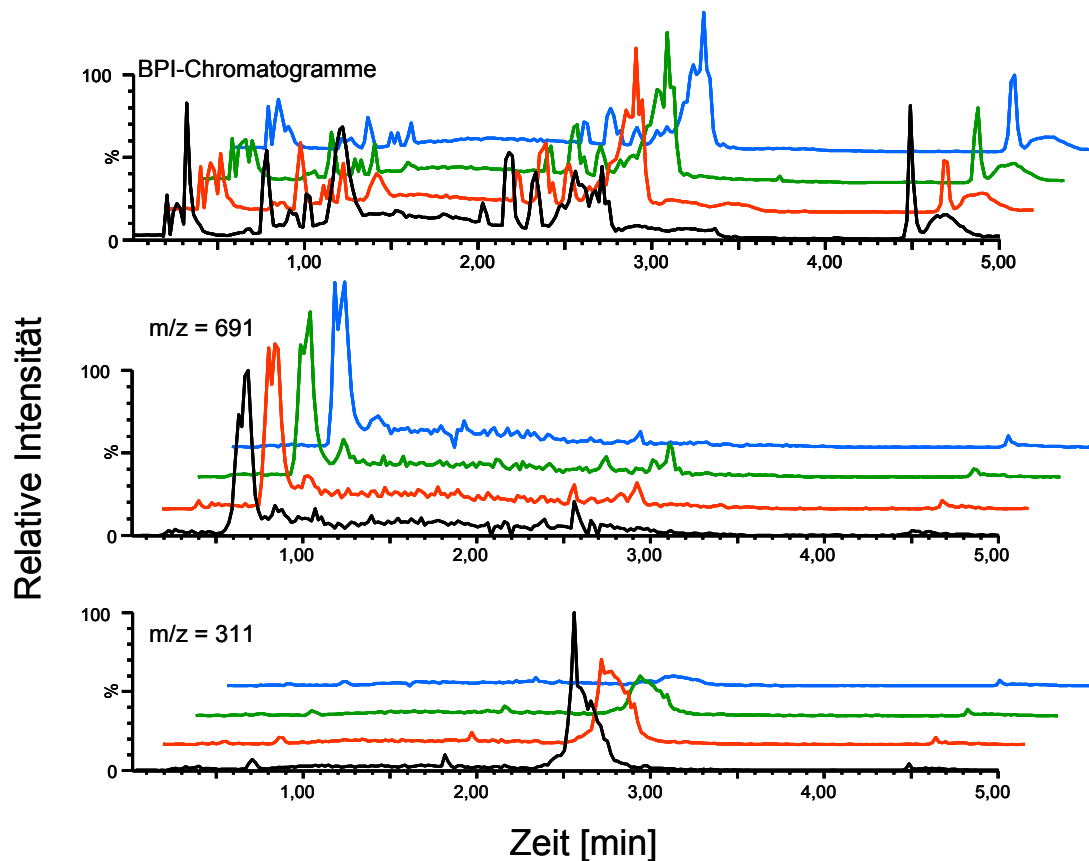


Abbildung 3.2.3: UPLC/ESI-MS Analyse methanolischer Extrakte von *C. taxifolia*, die in Gegenwart von DYTM-490-Propargylamid (**130**) verletzt wurde (schwarz: unmittelbar nach Verletzung, rot: 1 min nach Verletzung, grün: 2 min nach Verletzung, blau: 4 min nach Verletzung); Oben: neg. Modus BPI-Chromatogramme; Mitte: Ionenspur bei $m/z = 691$ ($[M-H]^-$ - Peak von **130**); Unten: Ionenspur bei $m/z = 311$ (Basispeak von Caulerpenin (**5**) im negativen Modus)

Die beobachtete Reaktion der fluoreszenten Sonde **131** muss daher auf der Deacetylierung des Bisenoylacetats beruhen, die der des Caulerpenin (**5**) entspricht. Dies bedeutet, dass **131** in der Verwundungsreaktion ähnliche Reaktivität wie **5** aufweist und somit in der Lage ist dessen Reaktionsverhalten widerzuspiegeln. Da **131** zu einem Großteil aus dem 1Z-Isomer besteht, aber dennoch vollständig abgebaut wird, muss die Esterase über eine gewisse Substrattoleranz bezüglich der Stereoisomerie des Bisenoylacetats verfügen. Daher lassen sich die mit der fluoreszenten Sonde **131** beobachteten Erscheinungen auch auf **5** übertragen. Die Anwendbarkeit von **131** für die in-vivo-Untersuchungen konnte damit demonstriert werden.

3.2.2 Beteiligung von DY™-490-Bisenoylacetat an der Protein-quervernetzung

Die Tatsache, dass sich Folgeprodukte des verwundungsinduzierten Abbaus von **131** in *C. taxifolia* nicht in der niedermolekularen Fraktion des Algenhomogenisats finden ließen, spricht dafür, dass diese in der unlöslichen, mit LC-MS-Methoden nicht erfassbaren Fraktion gebunden vorliegen. Um dies zu überprüfen mussten, andere Analysemethoden herangezogen werden. Ein Nachweis für die Beteiligung von **131** und damit auch von Caulerpenin (**5**) an der Quervernetzung der Algenproteine lässt sich nur durch die Analyse des Proteingehaltes erhalten. Eine geeignete Methode dafür stellt die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dar. Mit dieser Technik lässt sich das nach Verwundung aus quervernetzten Algenproteinen gebildete Biopolymer als hochmolekularer Rückstand in der Ladetasche erkennen.^[5, 25]

Aus diesem Grund wurde die Alge in Gegenwart der fluoreszenten Sonde **131** durch 5 minütiges Mörsern verletzt, das Proteinmaterial extrahiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Belichten des Gels mit einer Wellenlänge von 480 nm vor der Anfärbung der Proteine konnte die abreagierte Sonde leicht auf dem Gel lokalisiert werden. So konnte geprüft werden, ob diese mit Proteinen kovalent verknüpft vorliegt.

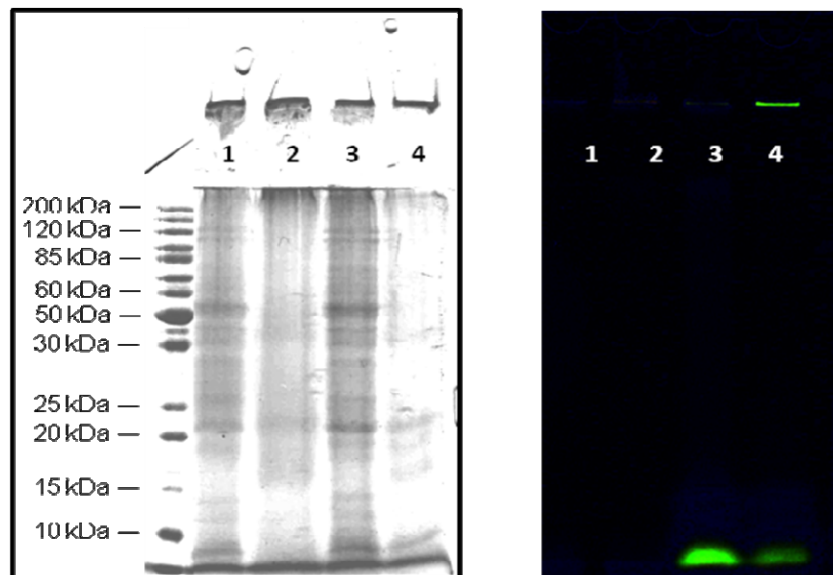


Abbildung 3.2.4: SDS-PAGE der aus *C. taxifolia* extrahierten Proteine; Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm
1 = denaturiert durch Kochen, für 5 min verletzt
2 = für 5 min verletzt
3 = denaturiert durch Kochen, für 5 min verletzt in Gegenwart von **131**
4 = für 5 min verletzt in Gegenwart von **131**

Nach Verletzung wurde der gesamte Proteingehalt der Alge als hochmolekulares Protein-Biopolymer in der Ladetasche des Gels zurückgehalten, was die bisherigen Ergebnisse aus SDS-Untersuchungen mit *C. taxifolia* bestätigte.^[25, 27] Aus der starken Fluoreszenz dieses Materials ist ersichtlich, dass die fluoreszente Sonde **131**, bzw. dessen deacetylierte Reaktionsprodukte nahezu vollständig in das Protein-Biopolymer rekrutiert werden und kovalent verknüpft mit diesem vorliegen müssen (Abb. 3.2.4 Ladetasche 4).

In einem Kontrollexperiment wurde durch 3-minütiges Kochen der Alge vor der Reaktion die Algenenzyme und somit auch die Esterasen vollständig denaturiert. Dadurch blieb die Proteinquervernetzung aus, da der Quervernetzer nicht gebildet werden konnte. Die fluoreszente Sonde **131** wurde dadurch ebenfalls nicht umgesetzt und konnte an der Lauffront des Gels nachgewiesen werden, da es als niedermolekulare Verbindung als erstes durch das Gel permeierte (Abb. 3.2.4 Ladetasche 3). Damit konnte bestätigt werden, dass eine kovalente Reaktion mit Proteinen nur nach enzymatischer Deacetylierung stattfindet. Gleichzeitig konnte direkt gezeigt werden, dass sich **131** und damit aller Wahrscheinlichkeit auch **5** an der wundungsinduzierten Proteinquervernetzung beteiligen.

3.2.3 Colokalisation von DYTM-490-Bisenoylacetat und Protein im Wundverschluss

Die Rekrutierung von Proteinen in den Wundpfropf konnte durch Verwendung eines fluoreszent markierten Proteins in Kombination mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) bereits demonstriert werden.^[25] Diese Methode sollte auch geeignet sein, um nachzuweisen, wie die in Abschnitt 3.2.2 beobachtete Caulerpenin-medierte Proteinquervernetzung an der Ausbildung des Wundpfropfens beteiligt ist. Dafür sollten sowohl **131** als auch ein fluoreszent markiertes Protein im Wundverschluss lokalisiert werden. Da mit dieser Technik Aufnahmen einzelner Schnittebenen gemacht werden können, ohne das Untersuchungsobjekt zu beschädigen, ist es möglich, die Wundregion nicht nur von außen abzubilden, sondern auch Informationen über tieferliegendes Material zu erhalten.

Eine gleichzeitige Detektion von Sonde und Protein sollte durch Verwendung eines Proteins mit einem auf die Fluoreszenz von **131** abgestimmten Farbstoff erreicht werden. So besitzt der Mega-Stokes-Farbstoff DYTM-481-XL (**132**) nahezu die gleiche Anregungswellenlänge wie **131**, emittiert jedoch bei einer deutlich höheren Wellenlänge (Abb. 3.2.5), so dass eine differenzierende simultane Erfassung der beiden Verbindungen im Gewebe möglich ist.

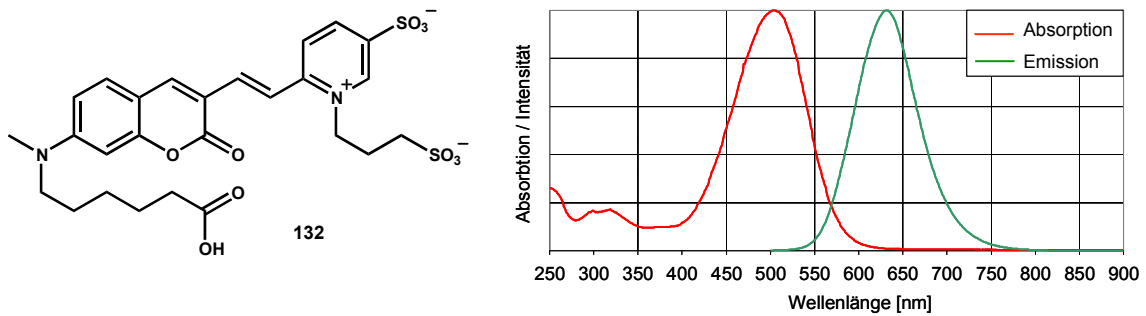


Abbildung 3.2.5: Struktur und Fluoreszenzspektrum von DY™-481XL als freie Säure (**132**)

Daher wurde das bereits erfolgreich verwendete Histon vom Typ H1 aus Kalbsthymusdrüsen mit dem NHS-Ester von DY™-481XL markiert, um es in den weiteren Experimenten als Modellprotein einzusetzen. Bei dieser Reaktion wird das Fluorophor an freie Aminogruppen des Proteins, beispielsweise der Lysinseitenketten geknüpft. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Wundreaktion die Proteine der Alge auch über diese funktionellen Gruppen miteinander vernetzt werden. Somit musste überprüft werden, ob das markierte Protein noch über ausreichend freie Lysinreste verfügt, um effektiv an der Quervernetzung teilnehmen zu können. Durch Fluoreszenzmessungen konnte der Grad der Markierung auf etwa 1 Farbstoffrest pro Proteinmolekül abgeschätzt werden. Bei mehr als 50 Lysinresten pro Histonmolekül^[101] sollte dies keine signifikante Verringerung der Quervernetzbarkeit nachsichziehen, so dass gut von außerhalb der Alge in das Wundmaterial rekrutiert werden sollte.

Zur Absicherung wurde jedoch zunächst mittels SDS-PAGE der Einbau des markierten Proteins und der fluoreszenten Sonde **131** in das Protein-Biopolymer überprüft (Abb. 3.2.6). Das Biopolymer in der Ladetasche fluoresziert nun gelb, was sich durch Überlagerung der grünen Fluoreszenz von **131** mit der orangefarbenen Fluoreszenz des markierten Proteins erklären lässt. Sowohl das Modellprotein als auch die fluoreszente Sonde konnten daher vollständig in das Quervernetzungsprodukt rekrutiert werden. Nach Denaturierung der Algenproteine und der daraus resultierenden Unterdrückung der Quervernetzung lagen beide Verbindungen unverändert im Algenhomogenisat vor. Damit ist sichergestellt, dass ein assoziiertes Vorliegen der beiden Komponenten im Gel und damit auch im Wundverschluss die Folge der verwundungsaktivierten Quervernetzung sein muss, da diese nicht selbständig miteinander reagieren.

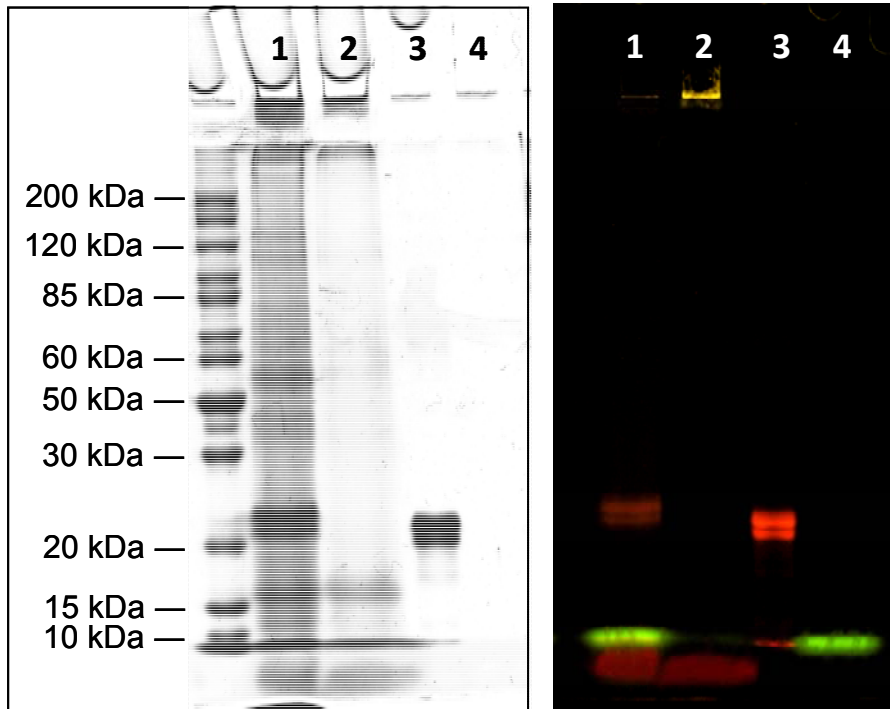


Abbildung 3.2.6: SDS-PAGE der aus *C. taxifolia* extrahierten Proteine; Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm
 1 = denaturiert, für 5 min verletzt in Gegenwart von **131** und DY™-481XL-Histon
 2 = 5 min verletzt in Gegenwart von **131** und DY™-481XL-Histon
 3 = DY™-481XL-Histon (Kontrolle)
 4 = **131** (Kontrolle)

Für die mikroskopischen Untersuchungen des Wundverschlusses, wurde *C. taxifolia* in Seewasser, welches die fluoreszenten Verbindungen in einer Konzentration von 8 $\mu\text{mol/l}$ (Histon) bzw. 20 $\mu\text{mol/l}$ (**131**) enthielt, am Stolon durchtrennt und für 14 Stunden in dieser Lösung belassen. Die Algenfragmente überlebten diese Behandlung und eine vollständige Ausbildung des Wundverschlusses konnte mikroskopisch beobachtet werden. Um Fluoreszenzerscheinungen zu minimieren, die von unvernetztem Modellprotein bzw. von unaktiviertem **131** ausgehen, welche durch fluiddynamische Prozesse in den Wundverschluss gelangen könnten, wurde die Alge in Seewasser ohne Zusätze für weitere 36 h inkubiert. In dieser Zeit bildete sich aus dem ursprünglich gelatinösen primären Wundverschluss ein stabiler sekundärer interner Wundverschluss.

Die Laser-Scanning-Mikroskopie unter der Verwendung eines Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm erlaubte eine gleichzeitige Anregung beider Verbindungen. Die optischen Detektionsfilter wurden so gewählt, dass die Fluoreszenzbande des jeweiligen Fluorophors selektiv detektiert und außerhalb der von Chlorophyll ausgehenden Fluoreszenzbande gemessen werden konnte (Abb. 3.2.7).

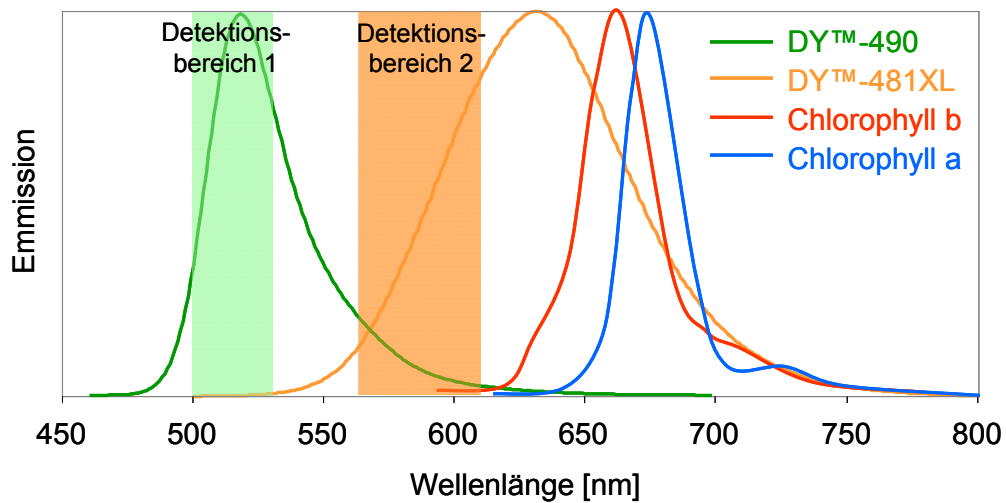


Abbildung 3.2.7: Emissionsspektren der Fluorophore mit gewählten Detektionsbereichen:

für DY™-490: 500-530 nm

für DY™-481XL: 565-615 nm

Um die gewählten Parameter zu testen, wurde zunächst eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt. Eine Verletzung der Alge ohne das Modellprotein oder **131** führte zu keinen Fluoreszenzerscheinungen in der Wundregion. Es konnte somit sichergestellt werden, dass unter diesen Messbedingungen keine Störung durch Eigenfluoreszenz des Algenmaterials, z. B. ausgehend von Chlorophyll, auftritt (Abb. 3.2.8).

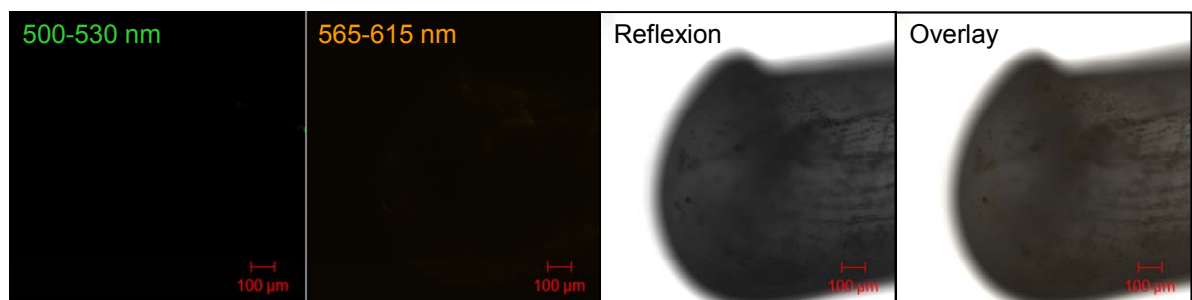


Abbildung 3.2.8: Konfokale LSM-Aufnahme der Wundregion von *C. taxifolia* ohne Zugabe fluoreszenter Verbindungen (Anregungswellenlänge: 488 nm)

Durch mehrere Experimente, in denen die Alge in Gegenwart von nur einer der beiden fluoreszenten Verbindungen verletzt wurde, konnte die getrennte Detektierbarkeit der beiden Fluorophore bestätigt werden (Abb. 3.2.9).

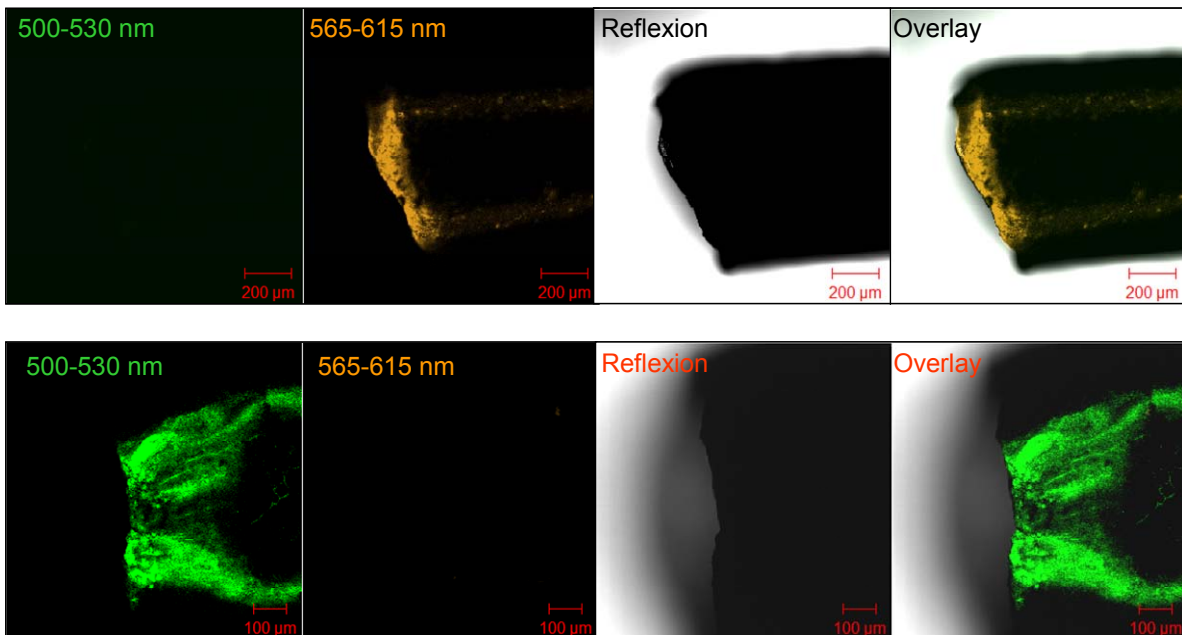


Abbildung 3.2.9: Konfokale LSM-Aufnahmen der Wundregion von *C. taxifolia* (Anregungswellenlänge: 488 nm)

Oben: Verletzung in Gegenwart des DY™-481XL-Histons

Unten: Verletzung in Gegenwart von **131**

Dadurch konnte auch der Einbau des Histons in den Wundverschluss bestätigt werden.^[25] Die fluoreszente Sonde **131** konnte ebenfalls als Bestandteil des Wundverschlussmaterials identifiziert werden. Dadurch ist ersichtlich, dass die synthetische Verbindung **131** von der Alge wie die natürliche Verbindung Caulerpenin (**5**) angenommen und für die Wundverschlussreaktion verwendet wurde. Da diese Verbindung extern dem Algenmaterial zugegeben wurde, erwies sich offensichtlich nicht als störend. Auch die Annahme, dass der aliphatische Terminus in Caulerpenin (**5**) keinen Einfluss auf die Wundreaktion hat (siehe Abschnitt 3.1.1), konnte bestätigt werden, da er in **131** durch einen Spacer und das Fluorophor ersetzt wurde. Auch zeigte sich, dass die verwendeten Fluorophore über mehr als 36 h unter *in-vivo*-Bedingungen stabil blieben. Das verwendete Synthesekonzept erwies sich daher als erfolgreich.

Bildete sich der Wundverschluss sowohl in Gegenwart des Modellproteins als auch der fluoreszenten Sonde **131**, so konnten anschließend beide Verbindungen im internen Wundverschluss detektiert werden. Hierbei zeigte sich eine sehr deutliche lokale Übereinstimmung der Fluoreszenz (Abb.3.2.10). Das Histon und **131** müssen demzufolge assoziiert im Wundverschluss vorliegen.

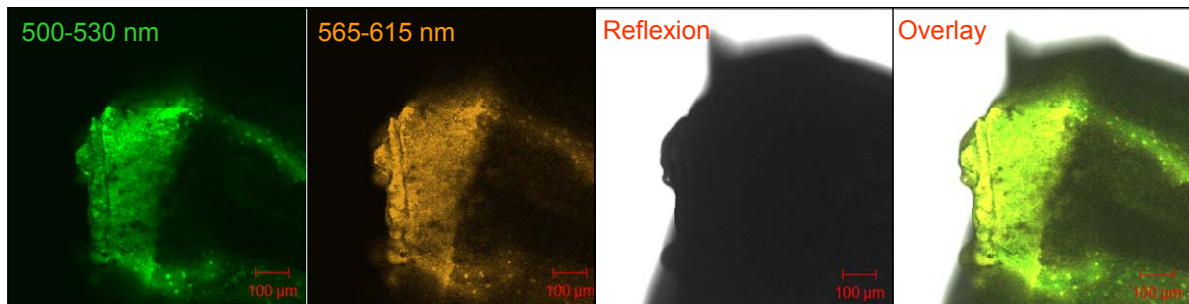


Abbildung 3.2.10: Konfokale LSM-Aufnahmen der Wundregion von *C. taxifolia* bei Verletzung in Gegenwart des DYTM-481XL-Histons und **131** (Anregungswellenlänge: 488 nm)

Ein solches Ergebnis räumt jedoch die Möglichkeit ein, dass beide Verbindungen zu Beginn der Wundreaktion am klebrigen, gelatinösen, primären Wundmaterial anhafteten und dadurch in den Wundverschluss gelangten. Auch Diffusionsprozesse lassen sich nicht ausschließen. Ein Kontrollexperiment mit einer inerten fluoreszenten Verbindung sollte den Einfluss von Diffusion und anderen fluiddynamischen Prozessen auf die Fluoreszenzerscheinung im Wundmaterial aufklären. Hierfür wurde *C. taxifolia* am Stolon durchtrennt, das erste Teilstück in einer Seewasser-basierten Lösung aus Modellprotein und DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) inkubiert, das zweite Fragment jedoch in Seewasser mit Modellprotein und DYTM-490-Propargylamid (**130**). Dieses Molekül besitzt das gleiche Fluorophor wie **131** und konnte daher im gleichen Detektionsbereich vermessen werden. Der Vergleich der einzelnen Schnittebenen zeigte, dass **130** zwar an der Zelloberfläche anhaftete, in tieferen Gewebsschichten jedoch praktisch nicht nachweisbar war (Abb. 3.2.11 rechts), ganz im Gegensatz zu dem Modellprotein und **131** (Abb. 3.2.11 links). Wie in Abschnitt 3.2.1 gezeigt werden konnte, wird **130** nicht durch die Enzyme einer Algenpräparation verändert und das Fluorophor liegt auch nach vollständig abgelaufener Wundungsreaktion intakt vor. Es sind demnach nur Verbindungen von außen in den Wundverschluss gelangt, die auch aktiv an der Bildung des Protein-Biopolymers beteiligt waren.

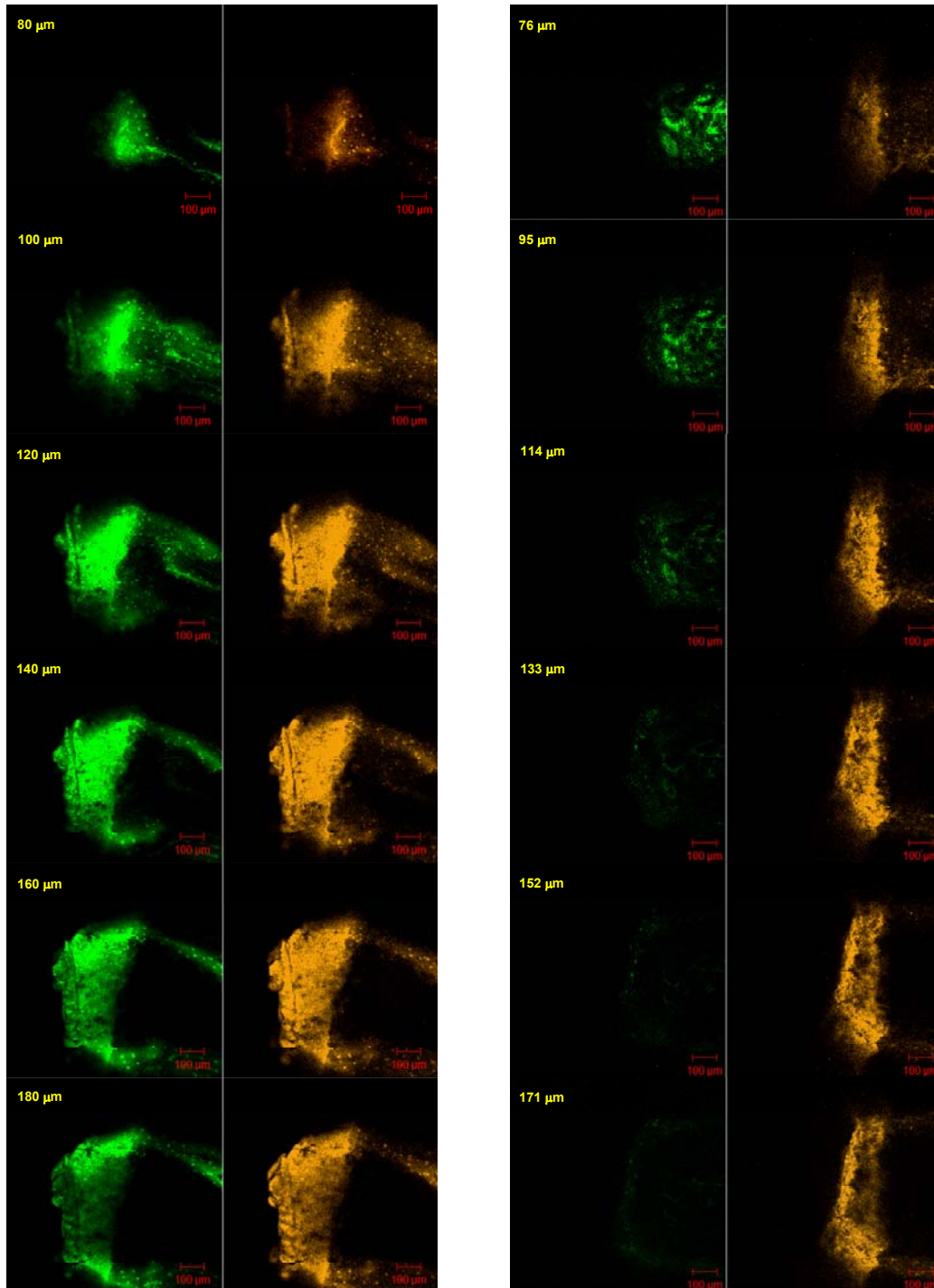


Abbildung 3.2.10: Konfokale LSM-Aufnahmen der Wundregion von *C. taxifolia* bei Verletzung in Gegenwart von:
 Linke Seite: DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) (grün) und Modellprotein (orange)
 Rechte Seite: DY™-490-Propargylamid (**130**) (grün) und Modellprotein (orange)
 Gezeigt sind die verschiedenen Ebenen des Längsschnittes durch das Stolon (Anregungswellenlänge: 488 nm).

Damit ist bewiesen, dass sich die im Wundverschluss beobachtete Fluoreszenz des Modellproteins und des DY™-490-Bisenoylacetats (**131**) nicht durch eine Diffusion der freien Verbindungen in das Gewebe erklären lässt. Stattdessen nimmt die fluoreszente Sonde **131** nach der Deacetylierung an der Proteinquervernetzung teil ist an der Bildung des Wundverschlusses beteiligt. Dieses Ergebnis lässt sich auf Caulerpenin (**5**) übertragen, wodurch der Schluss erlaubt ist, dass die Algenproteine durch deacetyliertes Caulerpenin (**5**) *in-vivo* quervernetzt werden und dass das dabei entstehende stabile Protein-Biopolymer die Wundregion versiegelt.

In den Aufnahmen der einzelnen Schnittebenen lässt sich erkennen, dass die Verteilung von Modellprotein bzw. Analogon im Wundverschluss nicht homogen ist. Es lassen sich Bereiche erkennen in denen nur ein geringer Anteil an quervernetztem Protein vorliegt. Das Wundverschlussmaterial besteht demzufolge nur zu einem Teil aus dem Protein-Biopolymer. In anderen *Caulerpa*-Arten konnten auch sulfatierte Saccharide nachgewiesen werden.^[26] Diese ließen sich jedoch mit heißem Wasser extrahieren und können daher nicht über kovalente oder andere starke Wechselwirkungen in den Wundverschluss eingebunden sein. Daher haben diese Verbindungen anscheinend nur eine untergeordnete Bedeutung für die Wundversiegelung.

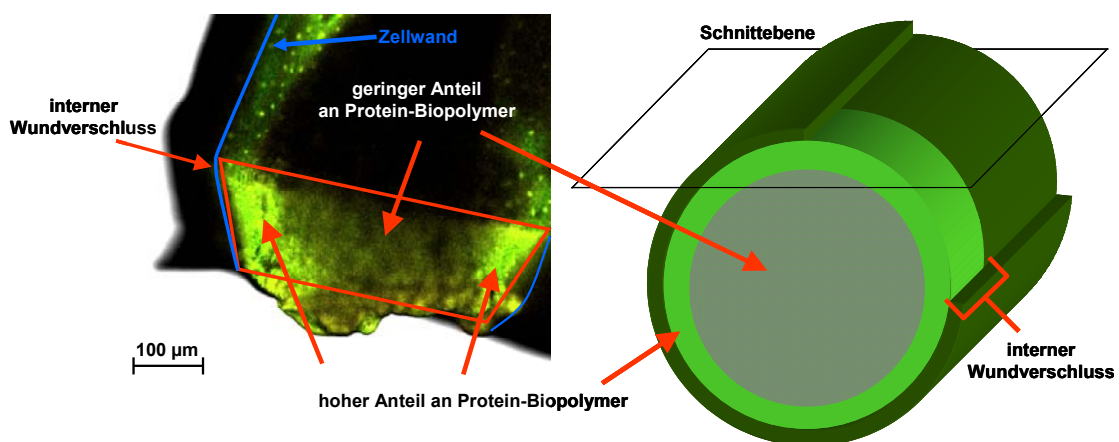


Abbildung 3.2.11: links: Konfokale LSM-Aufnahmen der Wundregion von *C. taxifolia* 50 h nach Verletzung in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) (grün) und Modellprotein (orange); rechts: Schematische Darstellung der Wundregion mit eingezeichneter Schnittebene der mikroskopischen Aufnahme (Anregungswellenlänge: 488 nm).

Es ebenfalls zu erkennen das in einer ring- bzw. kuppelförmigen Zone des Wundverschlusses, zu einem sehr intensiven Einbau von Modellprotein und **131** kommt (Abb.3.2.11). Daraus lässt sich schließen, dass in dieser Region der Anteil an quervernetzten Proteinen sehr hoch und der Anteil an anderen Algenbestandteilen geringer

ist, was für eine sehr hohe Quervernetzungsaktivität in diesem Bereich spricht. Genau in dieser Region findet unmittelbar nach der Verwundung eine Durchmischung des austretenden Cytosols mit dem Inhalt der zentralen Vakuole statt. Dies spricht dafür, dass in der intakten Alge Caulerpenin (**5**) und die aktivierende Esterase durch Kompartimentierung getrennt voneinander vorliegen. So könnte beispielsweise **5** in der Vakuole gespeichert werden, die Esterase hingegen im Cytosol. Nach Verletzung werden aufgrund des Tugordrucks sowohl Cytosol als auch Vakuoleninhalt nach außen gedrückt und vermischen sich. Dadurch würde Caulerpenin (**5**) mit der Esterase in Kontakt treten können und die Quervernetzung einleiten. Dies würde erklären, weshalb es nur in der verwundeten Region zur Bildung des Biopolymers kommt. Experimente, die einen Vergleich des Caulerpeningehaltes in und außerhalb der Vakuole zulassen, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Ein ähnliches Prinzip der verwundungsaktivierten Protein-Biopolymerisation wurde bisher nur im Liguster beobachtet. Dort werden die aktivierenden Enzyme getrennt vom Quervernetzer in Zellorganellen gespeichert und erst bei Zerstörung des Gewebes freigesetzt.^[102]

3.3 *In-vitro*-Untersuchungen mit DY™-490-Bisenoylacetat

Im vorangegangenen Abschnitt konnte mit Hilfe der fluoreszenten Sonde **131** gezeigt werden, dass in *C. taxifolia* das 1,4-Bisenoylacetat Caulerpenin (**5**) nach verwundungsaktivierter Deacetylierung kovalent mit Proteinen reagiert und diese quervernetzt. Im Folgenden soll dieses Prinzip der Reaktion von 1,4-Bisenoylacetaten mit Proteinen außerhalb der Alge untersucht werden, um deren Potential zur Quervernetzung sowie zur kovalenten Proteinmodifikation zu testen. Da sich mit dem in Abschnitt 3.1.6 vorgestellten Syntheseweg ein breites Spektrum unterschiedlich funktionalisierter 1,4-Bisenoylacetate einfach herstellen lässt, besteht die Möglichkeit Proteine mit einer Vielzahl verschiedener funktioneller Gruppen zu markieren. Möglicherweise lassen sich dabei der Reaktionsverlauf und die Selektivität kontrollieren, da 1,4-Bisenoylacetate nicht selbst mit Proteinen reagieren können. Erst eine Aktivierung durch eine Deacetylierung, z. B. durch Esterasen leitet die Reaktion ein. Der Vorteil eines enzymaktivierten Reagenzes liegt darin, dass die Reaktion unter physiologischen Bedingungen aktiviert werden kann. Daher wurde zunächst nach geeigneten Enzymen gesucht, die in der Lage sind Acetylgruppen abzuspalten und eine möglichst quantitative Umwandlung von 1,4-Bisenoylacetaten zu den reaktiven Dialdehydverbindungen zu ermöglichen. Als Testverbindung diente die fluoreszente Sonde, da dies eine Reihe von Vorteilen bietet. So lassen sich beispielsweise die Reaktionsprodukte von **131** mittels UPLC/UV-Vis aufgrund der charakteristischen Absorption des Fluorophors eindeutig als solche in einem Reaktionsgemisch identifizieren. Durch Massenspektrometrie können diese Verbindungen weiter analysiert werden. Die Tatsache, dass sich **131** und dessen Folgeprodukte sehr gut im negativen Modus detektieren lassen, ist ebenfalls vorteilhaft, da sich in diesem Modus der Matrixuntergrund reduzieren lässt und sich das Signal-Rauschverhältnis verbessert.

3.3.1 Enzymatische Deacetylierung von DY™-490-Bisenoylacetat

In bisherigen Versuchen mit Caulerpenin (**5**) außerhalb der Alge wurden Esterasen mit geringer Substratspezifität zur Deacetylierung verwendet. Allerdings konnten die dabei gebildeten reaktiven Zwischenverbindungen nicht eindeutig identifiziert werden, da diese sofort durch eine Reaktionen mit Proteinen oder Aminosäuren abgefangen wurden. Esterasen sind in der Lage die Hydrolyse von Carbonsäureester zu katalysieren und werden daher gemäß dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) zu den Carboxylester-hydrolasen (EC 3.1.1) gezählt. Zu dieser Enzymklasse gehören auch die Lipasen, die ebenfalls derartige Ester spalten können.

Im Gegensatz zu Esterasen, die wasserlösliche Ester als Substrate bevorzugen, akzeptieren Lipasen bevorzugt Triglyceride und andere wasserunlösliche Fettsäureester als Substrat.^[43] Bei beiden jedoch läuft die Esterspaltung über einen sehr ähnlichen Katalysemechanismus ab (Abb.3.3.1).

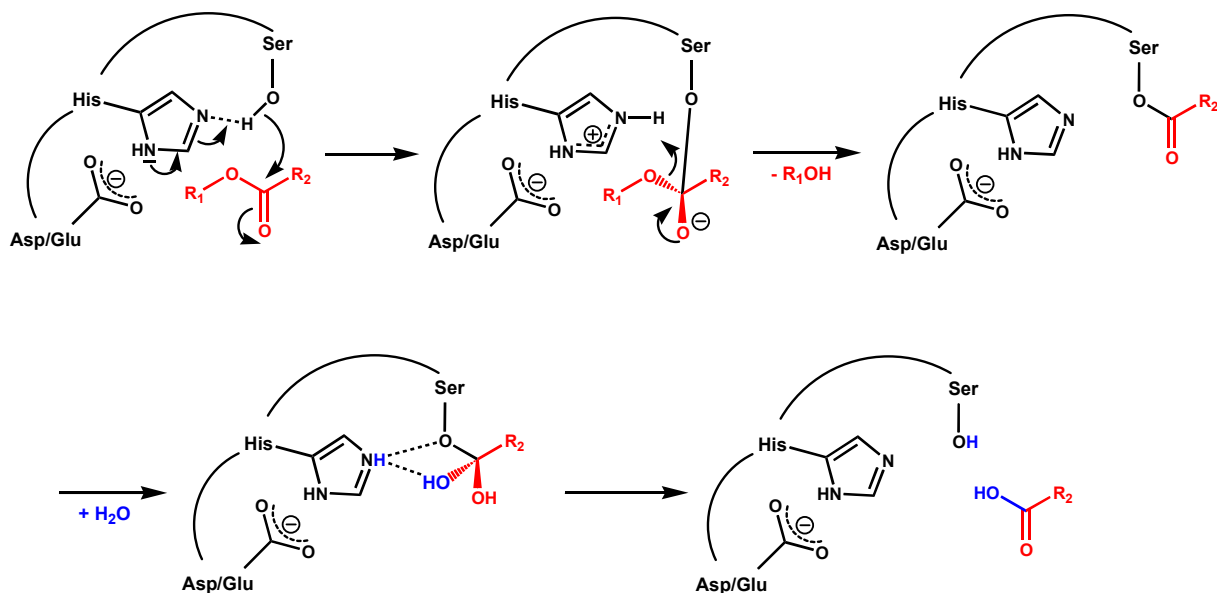


Abbildung 3.3.1: Mechanismus der Esterhydrolyse durch Lipasen und Esterasen^[91]

In einem ersten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe eines Serins auf den Carbonylkohlenstoff des Substrates, wobei dieses ein tetraedrisches Zwischenprodukt bildet. Der nucleophile Charakter des Serins wird durch eine Protonenabstraktion durch einen Histidinrest verstärkt. Dieser wird wiederum durch eine Säurefunktion von Glutamin- oder Asparaginsäure korrekt ausgerichtet. Über einen Protonentransfer von Histidin auf das Sauerstoffatom des Substrates wird der Alkohol freigesetzt und die Säuregruppe kovalent mit dem Serin verestert. In einem zweiten Schritt wird dieser „Acyl-Enzym“ hydrolysiert indem Histidin ein Proton eines Wassermoleküls abstrahiert und dieses wiederum nucleophil den Carbonylkohlenstoff angreift.^[103]

Für die Untersuchungen der Deacetylierung mit der fluoreszenten Sonde **131** wurden verschiedene kommerziell erhältliche Lipasen und Esterasen verwendet. In einer Reihe von Reaktionen wurden 30 μ l einer wässrigen Lösung von **131** (0,1 mg/ml) mit jeweils 1 μ l der verschiedenen Enzymlösungen (jeweils 6 mg/ml) umgesetzt. Jedes dieser Reaktionsgemische wurde bereits nach 10 min mit Methanol verdünnt und die präzipitierten Enzyme abgetrennt, um eine vollständige Hydrolyse zu verhindern und auch intermediär auftretende Zwischenprodukte zu identifizieren. So ließen sich neben dem Dialdehyd **139** auch einfach oder zweifach deacetylierte Produkte nachweisen (siehe Tabelle 3.3.2). Allerdings ließ sich

aus den Massensignalen nicht erkennen, welche der Acetylgruppen abgespalten wurde. Obwohl die Verbindungen **133** bis **138** mit sehr ähnlichen Retentionszeiten eluieren, konnte durch Vergleich der Massenspuren sichergestellt werden, dass es sich bei den Massenpeaks $m/z = 942$ und $m/z = 900$ nicht um Fragmentpeaks von $m/z = 960$ handelt, sondern um separate Verbindungen.

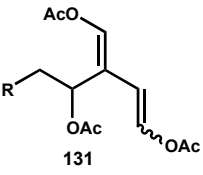
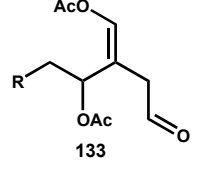
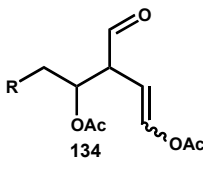
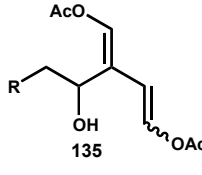
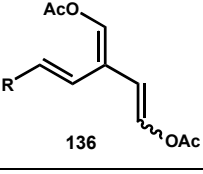
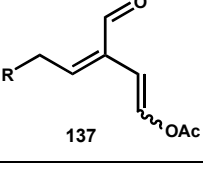
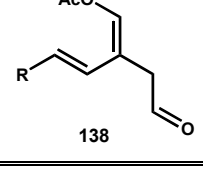
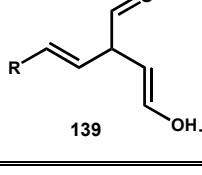
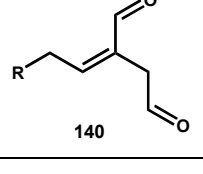
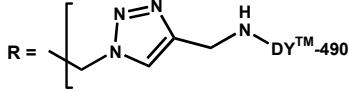
m/z [M-H] ⁻ (Retentionszeit)	Strukturvorschlag 1	Strukturvorschlag 2	Strukturvorschlag 3
1002 (1,2 – 1,3 min)	 131	-	-
960 (0,9 - 1 min)	 133	 134	 135
942 (1,05 min)	 136	-	-
900 (1 – 1,1 min)	 137	 138	 139
858 (0,75 - 0,85 min)	 140	 R =	

Tabelle 3.3.1: detektierte Massensignale nach der enzymatischen Deacetylierung von **131** und mögliche Strukturen der zugehörigen Verbindungen

Eine Quantifizierung der Verbindungen gestaltete sich mangels stabiler Standardverbindungen unmöglich, so dass lediglich die Intensität der Massensignale am Peakmaximum der Ionenspuren verglichen wurde, um Aussagen über den relativen Gehalt der Verbindungen im Gemisch zu treffen. Die Ergebnisse sämtlicher durchgeführter Reaktionen sind in Tabelle 3.3.2. zusammengefasst.

	m/z = 1002	m/z = 960	m/z = 942	m/z = 900	m/z = 858
Esterase aus Schweineleber (PLE)	++	+++	-	+	+++
Esterase aus <i>Candida lipolytica</i> (CLE)	-	+++	-	-	-
Esterase aus <i>Bazillus</i> <i>stearothermophilus</i> (BSE)	-	+	-	-	++
Lipase aus <i>Candida antarctica</i> (CAL)	+	++	-	-	++
Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i> (RNL)	-	++	++	+	++
Lipase aus Schweinepankreas (PPL)	-	+++	-	+	+
Lipase aus <i>Aspergillus niger</i> (ANL)	+	++	-	+++	+++
+++ sehr hohe Signalintensität (ion count > 500), ++ mittlere Signalintensität (ion count 100 - 500), + geringe Signalintensität (ion count < 100), - nicht nachweisbar					

Tabelle 3.3.2: Intensitäten der Massensignale der Produkte im Reaktionsgemisch der enzymatischen Deacetylierung von **131** nach 10 min

Es zeigten sich zwischen den einzelnen enzymatischen Reaktionen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Produkte. So konnten beispielsweise bei der Umsetzung mit Lipase aus Schweinepankreas (PPL) die einfach deacetylierten Produkte deutlich nachgewiesen werden. Der Dialdehyd **140** war jedoch nur in Spuren vorhanden, obwohl die Ausgangsverbindung komplett umgesetzt wurde und die Reaktion demzufolge sehr weit fortgeschritten war. Im Gegensatz dazu konnte die Esterase aus Schweineleber (PLE) in der gleichen Zeit das 1,4-Bisenoylacetat zwar nicht komplett umsetzen, es bildeten sich dennoch bereits deutliche Mengen von **140** (Abb. 3.3.2). Die nur teilweise deacetylierten Zwischenverbindungen stellen offensichtlich für PPL ein schlechteres Substrat dar als die Ausgangsverbindung **131**, wodurch eine weitere Deacetylierung erschwert wird. Bei PLE hingegen verhält es sich umgekehrt.

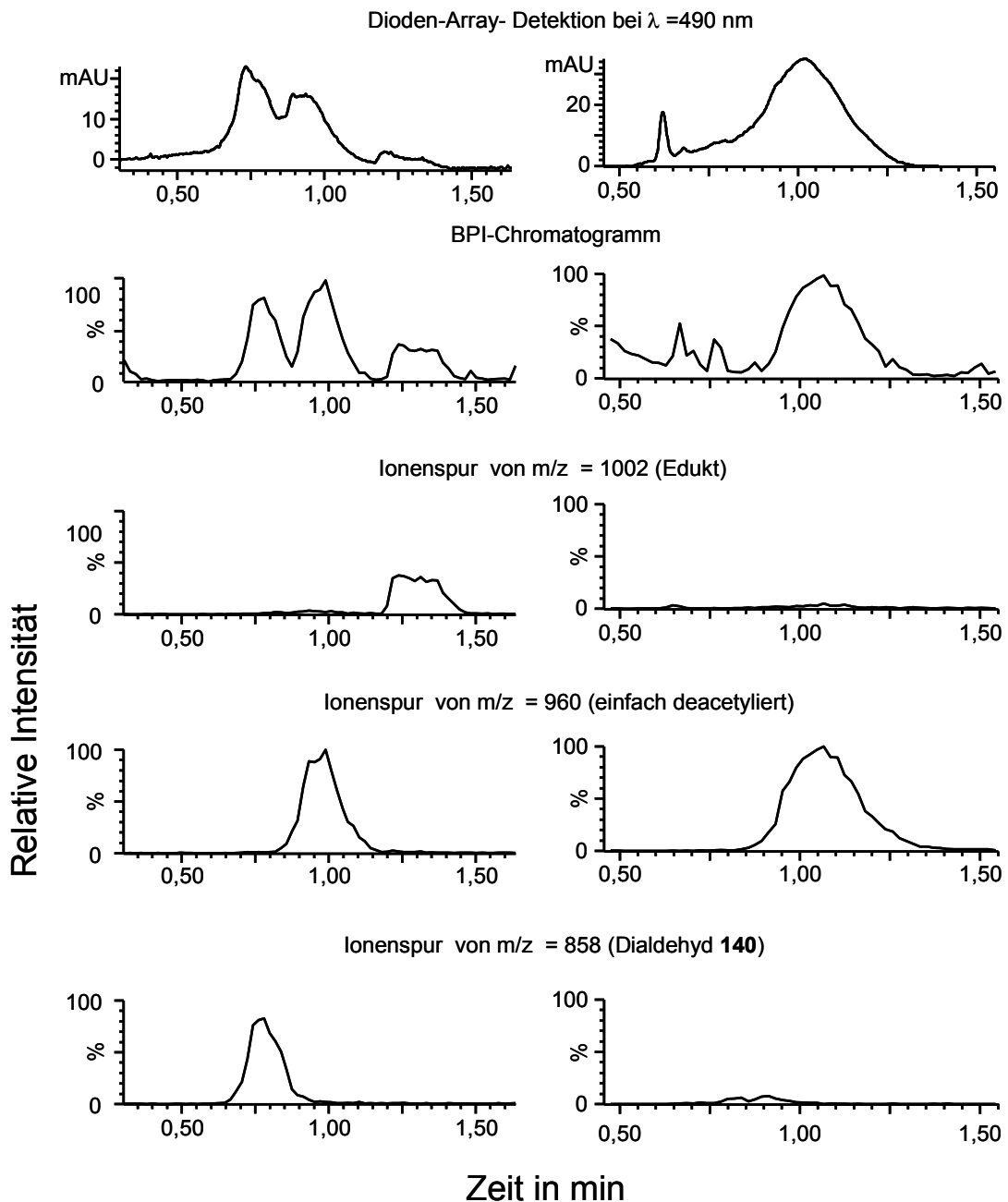


Abbildung 3.3.2: UPLC/UV-Vis/ESI-MS-Chromatogramme der Umsetzung von **131** mit Schweineleberesterase (linke Seite) und Schweinepankreaslipase (rechte Seite); gezeigt sind die Absorptionsverläufe bei 490 nm, die BPI-Chromatogramme und die einzelnen Ionenspuren (die Ionenspuren wurden auf das intensivste Ion normiert)

Bei der Umsetzung mit CLE konnte im Gegensatz zu den übrigen Enzymen kein Dialdehyd **140** nachgewiesen werden. Caulerpenin (**5**) wird allerdings durch CLE abgebaut und inhibiert dieses Enzym.^[5] Auch konnten in SDS-PAGE-Analysen Hinweise auf Quervernetzungsreaktionen zwischen den Esterasemolekülen und **5** gefunden werden.^[5] Dies spricht dafür, dass der Dialdehyd **140** zwar gebildet wurde, jedoch sofort mit

nukleophilen Gruppen des Enzyms reagierte und daher nach Abtrennung des Enzyms nicht mehr in der Lösung nachgewiesen werden konnte. Abschnitt 3.3.4 beschäftigt sich näher mit diesem Phänomen. In der Literatur sind Lipasen bekannt, die durch Caulerpenin (**5**) und damit wahrscheinlich auch durch andere 1,4-Bisenoylacetate inhibiert werden.^[104] Diese Studien verzichteten jedoch darauf, den Mechanismus der Inhibierung genauer zu untersuchen, so dass nicht bekannt ist, ob eine Quervernetzung auftrat oder lediglich eine kompetitive Enzymhemmung stattfand.

Cutignano *et al.* konnten in Versuchen mit Caulerpenin (**5**) und verschiedenen Lipasen, darunter auch die aus *Aspergillus niger* (ANL), das Preoxytoxin 2 (**141**) als Zwischenverbindung der Deacetylierung nachweisen, bei der bereits ein Enolester hydrolysierte und Essigsäure eliminiert wurde (Abb. 3.3.3). Da keine weiteren Zwischenprodukte der Caulerpeninhydrolyse nachgewiesen werden konnten, postulierte Cutignano einen Reaktionsmechanismus, bei dem die Lipase **141** in einem Schritt aus **5** bildet.^[105] Dabei wird bei der Bildung des „Acyl-Enzyms“ gleichzeitig Essigsäure eliminiert.

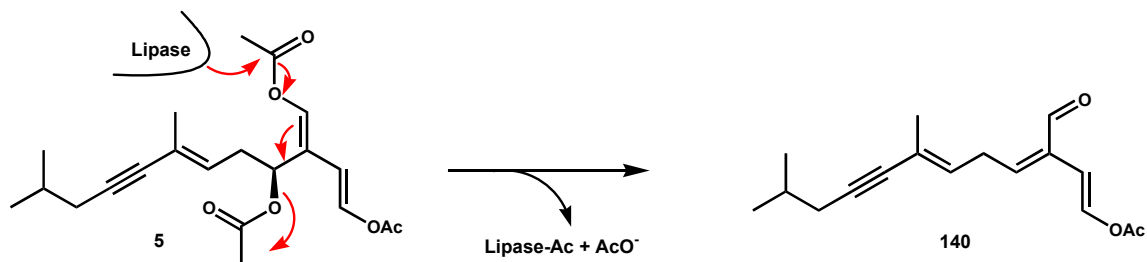


Abbildung 3.3.3: postulierter Mechanismus der Lipase-katalysierten Caulerpeninhydrolyse nach Cutignano *et al.*^[105]

Diese Ergebnisse ließen sich nur teilweise bestätigen. Die dem Preoxytoxin 2 (**141**) entsprechende Verbindung **137** liefert einen Molpeak bei $m/z = 900$, welcher bei der Umsetzung von **131** mit ANL besonders deutlich nachgewiesen werden konnte. Jedoch ließen sich bei dieser Reaktion auch einfach deacetylierte Verbindungen detektieren, was dafür spricht, dass die Deacetylierung zu **137** nicht konzertiert, sondern zumindest zu einem gewissen Teil schrittweise erfolgt. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Cutignano läuft die Reaktion wahrscheinlich bevorzugt über die Verbindungen **134** und **137** ab.

Lediglich bei der Umsetzung mit Lipase aus *Rhizopus niveus* (RNL) konnte auch Verbindung **136** nachgewiesen werden. Diese Verbindung geht wahrscheinlich durch spontane Eliminierung von Essigsäure aus **131** oder von H₂O aus **135** hervor, welche demzufolge nur von RNL gebildet wird.

Auch ließen sich die theoretisch möglichen Zwischenprodukte **142**, **143** und **144** nicht nachweisen, was entweder für eine sehr rasche Weiterreaktion zu **137** bzw. **138** durch spontane Eliminierung von Wasser spricht, oder für eine direkte Eliminierung von Essigsäure aus **133** und **134** (Abb.3.3.4).

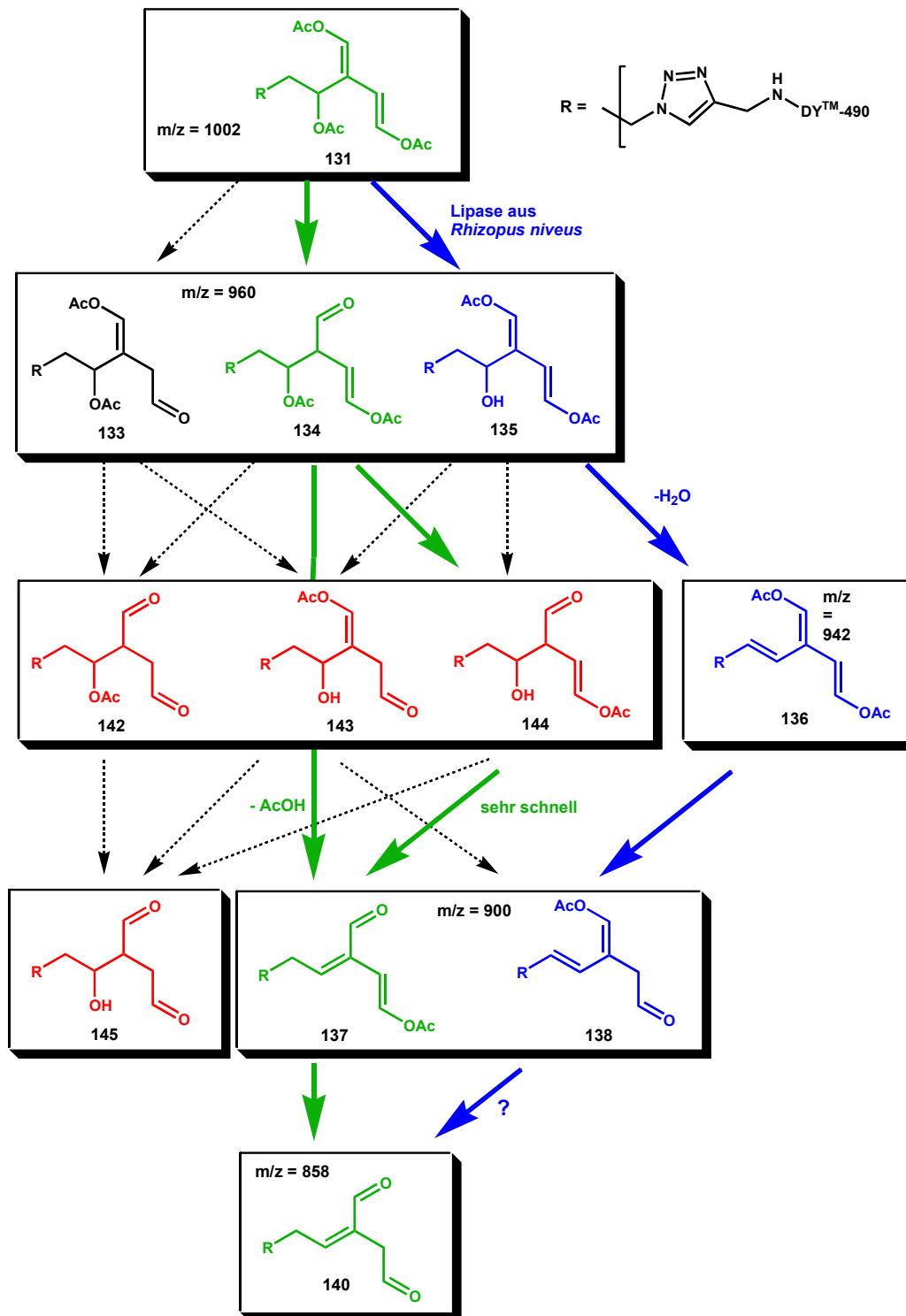


Abbildung 3.3.4: Postulierter Ablauf der enzymatischen Deacetylierung der fluoreszenten Sonde (grün: bevorzugter Reaktionsverlauf; blau: Reaktionsverlauf bei RNL; rot: die Verbindung konnte nicht detektiert werden)

Mithilfe der fluoreszenten Sonde konnte gezeigt werden, dass viele kommerziell erhältliche Hydrolasen in der Lage sind 1,4-Bisenoylacetate zu den entsprechenden Dialdehyden umzuwandeln. Die besten Umsätze konnten mit PLE und ANL erzielt werden, da diese in kurzer Zeit deutliche Mengen des Dialdehyds bildeten.

3.3.2 Deacetylierungsversuche von DY™-490-Bisenoylacetat durch Base und Säure

Bei der enzymatischen Deacetylierung von 1,4- Bisenoylacetaten können die Enzyme selbst von den Dialdehyden angegriffen werden, wodurch einerseits der entstehende Quervernetzer verbraucht wird und andererseits die Katalyse inhibiert wird. Um diese Nachteile zu umgehen, sollte in den nächsten Experimenten auf Enzyme verzichtet und die Abspaltung der Acetylgruppen auf rein chemischen Weg durch Änderung des pH-Wertes erreicht werden. Diese Methode besitzt allerdings den Nachteil, dass eine Reaktion mit Proteinen nur nach Neutralisation des Reaktionsgemisches möglich wäre, da eine *in-situ*-Umsetzung bei sehr hohem bzw. sehr niedrigem pH-Wert bereits Denaturierung der eingesetzten Proteine zur Folge haben könnte.^[106] Der Einsatz von Säuren oder Basen, wie zum Beispiel Salzsäure oder Natronlauge, ist jedoch wesentlich kostengünstiger als die Verwendung eines Enzyms. Außerdem sind viele Hydrolasen sehr empfindlich, da deren Aktivität stark von den Reaktionsbedingungen abhängt.

Aus diesem Grund wurde die fluoreszente Sonde **131** für 10 min bei einem pH-Wert von 12 umgesetzt, da bei diesen Bedingungen eine Spaltung der Esterfunktion erwartet wurde. Bei einem höheren pH-Wert wird die Abspaltung des Fluorophors riskiert.

Die UPLC/UV-Vis/MS-Analyse des neutralisierten Reaktionsgemisches zeigte einen vollständigen Umsatz von **131** und mehrere Deacetylierungsprodukte. Diese coeluierten im Bereich von $t_r = 0,6 - 1,0$ min und waren nur durch den Verlauf der Ionenspuren als separate Verbindungen zu erkennen (Abb. 3.3.5). Trotz der Neutralisation mit verdünnter Salzsäure bildeten, die Produktverbindungen während der Elektrosprayionisation deutlich Natriumaddukt-Ionen aus.

Im Gegensatz zur enzymatischen Deacetylierung konnten allerdings nur Spuren der Produkte nachgewiesen werden. Offensichtlich sind sie unter den gewählten Reaktionsbedingung nicht stabil.

Auch die Zusammensetzung des Produktgemisches zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den enzymkatalysierten Reaktionen. Wie zu erwarten konnte unter basischen Bedingungen kein definierter Reaktionsverlauf beobachtet werden, da hier jede der drei Acetylgruppen hochreaktiv ist. Es fanden sich neben dem gewünschten

Deacetylierungsprodukt **140** hauptsächlich Verbindung **145**, bei der die Abspaltung von Wasser noch nicht stattgefunden hat. Diese Verbindung konnte bei der enzymkatalysierten Reaktion nicht beobachtet werden. Das Vorhandensein der Verbindung mit dem Massenpeak von $m/z = 916$, lässt sich nicht durch Deacetylierung erklären, die zweifach deacetylierten Produkte **142 - 144** würden ein Signal bei $m/z = 918$ liefern. Im Unterschied zu **140** und **145** bildete diese Verbindung auch kein Natriumaddukt-Ion.

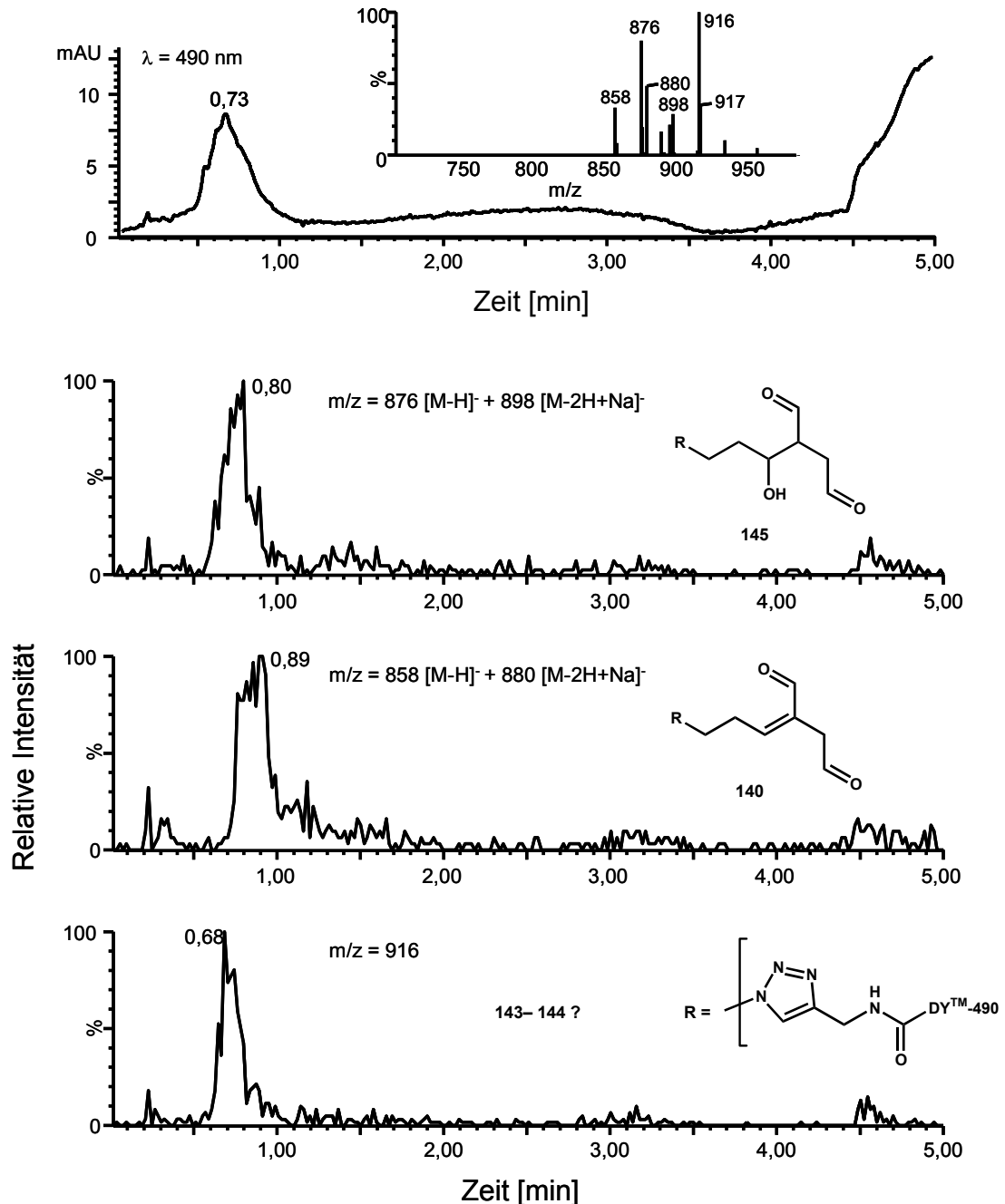


Abbildung 3.3.5: UPLC/UV-Vis/MS-Analyse des Reaktionsgemisches der Deacetylierung von **131** unter basischen Bedingungen; Oben: Verlauf der Dioden-Array-Detektion bei 490 nm und Massenspektrum im Bereich von $rt = 0,6 - 1,0$ min; Unten: Verläufe der einzelnen Ionenspuren, und den Verbindungen entsprechenden Strukturvorschläge.

Aufgrund der geringen Produktmenge stellt die Hydrolyse von 1,4-Bisenoylacetaten unter basischen Bedingungen keine Alternative zur enzymatischen Deacetylierung dar.

Ein anderes Produktspektrum konnte erhalten werden, wenn die Deacetylierung bei einem pH-Wert von 2 durch kurzes Erhitzen auf 80°C durchgeführt wurde (Abb. 3.3.6). Die hierbei entstehenden Verbindungen eluierten sauber getrennt voneinander, was die Identifizierung erleichterte. Zwar ließen sich die zweifach deacetylierten Verbindungen **137** und **138** identifizieren, eine Weiterreaktion zu **140** konnte jedoch nicht beobachtet werden. Längere Reaktionszeiten bewirkten weder eine vollständige Deacetylierung, noch eine Verbesserung des Verhältnisses von Edukt zu Produkten. Auch lässt sich die unbekannte Verbindung mit dem Massenpeak $m/z = 916$ detektieren. Die bei $t_r = 0,9$ min eluierende Verbindung mit einem Molpeak von $m/z = 932$ ist ebenfalls nicht exklusiv durch Deacetylierungsprozesse entstanden. Dies zeigt, dass bei diesem pH-Wert auch Nebenreaktionen zu unerwünschten Produkten auftreten und die Methode daher ebenfalls ungeeignet ist.

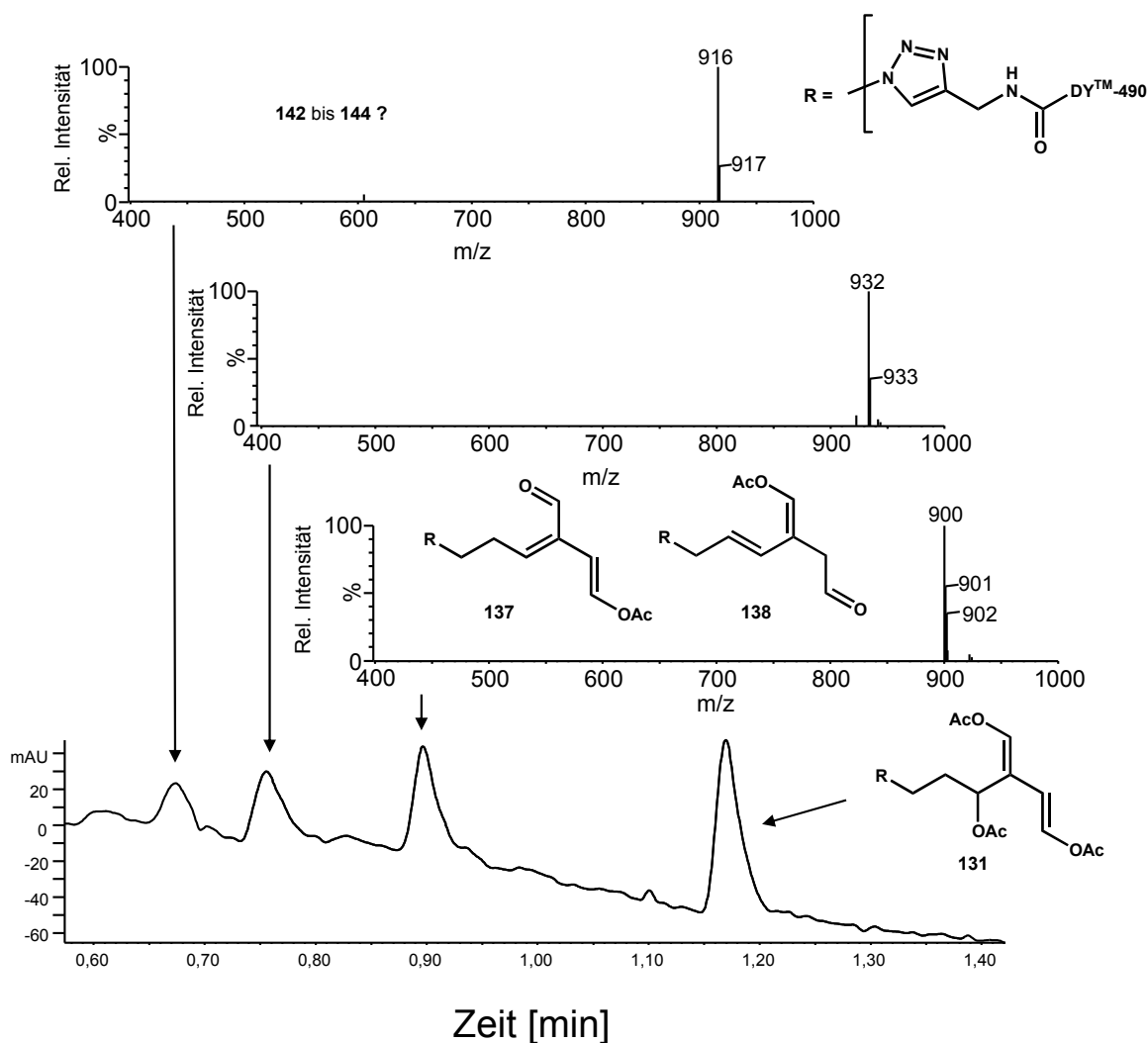


Abbildung 3.3.6: UPLC/UV-Vis/ESI-MS-Analyse der Reaktion von **131** bei $pH = 2$; dargestellt ist der Verlauf der Dioden-Array-Detektion bei 490 nm (unten) und die Massenspektren der Peaks

3.3.3 Die *in-vitro*-Proteinquervernetzung mit DY™-490-Bisenoylacetat und Caulerpenin

Es sollte überprüft werden, ob die in *in-vivo*-Experimenten beobachtete Proteinquervernetzung auch *in-vitro* realisierbar ist. Dabei wurde versucht die in der Alge vorliegenden Konzentrationsverhältnisse von Quervernetzer und Protein zu simulieren. Die in Abschnitt 3.3.2 durchgeführten Versuche zeigten, dass sich die enzymatische Deacetylierung von 1,4-Bisenoylacetaten mit PLE oder ANL sehr gut eignet, um den Quervernetzer zu generieren. Die kommerziell erhältliche Lipase zeigte in SDS-PAGE-Analysen jedoch mehrere Proteinbanden, bei denen es sich um Fragmente der Lipase oder Verunreinigungen handeln könnte. Da dies die Auswertung der SDS-Gele verkompliziert wurde PLE für die Reaktion eingesetzt. Albumin aus Hühnereiweiß (Ovalbumin) mit einem Molekulargewicht von 44000 Da diente als Proteinkomponente. So konnte eine eindeutige Unterscheidung von der Esterase erreicht werden. In SDS-PAGE-Gelen wurde stets eine Doppelbande beobachtet. Das Protein konkurriert mit der Esterase um den Quervernetzer und musste folglich in weitaus höheren Konzentrationen als das Enzym eingesetzt werden, um effektiv zu reagieren. Es wurde ein molares Verhältnis von Ovalbumin zu Esterase von ca. 30 : 1 gewählt. Die Proteinkonzentration im Reaktionsgemisch lag dadurch mit 15 mg/ml weit über dem Proteingehalt in *Caulerpa taxifolia* von 5 mg pro g Trockenmasse.^[107] Um eine Überladung der SDS-Gele zu vermeiden wurden die Gemische nach der Reaktion verdünnt. Die verwendete Caulerpeninkonzentration betrug 2 mg/ml und liegt unterhalb dem in der Alge beobachteten Wert von 0,5 – 1 % des Feuchtgewichtes.^[34, 108] Ein Zusatz von 20 µmol/l **131** ermöglichte die Visualisierung und Lokalisation des Quervernetzers, da dieser über die gleiche Reaktivität wie **5** verfügt. Wie in Abbildung 3.3.7 ersichtlich, kommt es unter den Bedingungen bei einer Reaktionszeit von 1h zur Ausbildung von Proteinquervernetzungsprodukten mit einer molaren Masse von mehr als 200 kDa.

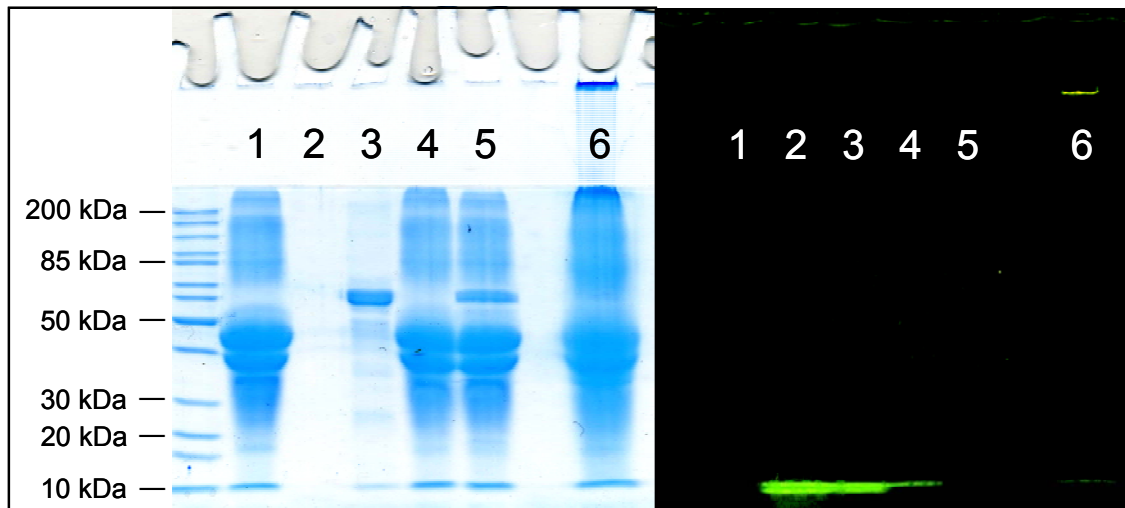


Abbildung 3.3.7: SDS-PAGE der in-vitro-Quervernetzung; Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm; Proben 2 und 3 wurden unverdünnt aufgetragen.

1 = Ovalbumin

2 = DY™-490-Bisenoylacetat (131) + Caulerpenin (5)

3 = PLE + DY™-490-Bisenoylacetat (131) + Caulerpenin (5)

4 = Ovalbumin + DY™-490-Bisenoylacetat (131) + Caulerpenin (5)

5 = Ovalbumin + PLE

6 = Ovalbumin + DY™-490-Bisenoylacetat (131) + Caulerpenin (5) + PLE

Auch blieb ein Teil des Proteinmaterials in der Ladetasche zurück, was für ein Polymer mit sehr hohem Molekulargewicht spricht. Die Fluoreszenz dieses Materials bestätigt, dass die Quervernetzung durch Reaktionsprodukte der 1,4-Bisenoylacetate bewirkt wurde. Bei den Kontrollversuchen, in denen auf eine der drei Komponenten verzichtet wurde, kam es zu keiner Bildung von Vernetzungsprodukten (Abb. 3.3.7 Ladetaschen 3 bis 5).

Dieses Ergebnis beweist, dass für eine enzymatische Quervernetzung nur 1,4-Bisenoylacetate und Esterasen erforderlich sind. Weitere, die Proteinquervernetzung unterdrückende Enzyme sind nicht essentiell. Bei den Versuchen wurde die Schweineleberesterase quantitativ umgesetzt und in die Quervernetzungsprodukte eingebunden, obwohl diese dem Gemisch stets als letzte Komponente zugegeben wurde. Ein Teil der Bisenoylacetate konnte aus diesem Grund nicht mehr deacetyliert werden und lag auch nach Reaktionsende unverbraucht vor. Dieser vorzeitige Abbruch und die stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktion führten dazu, dass nur ein Teil des Ovalbumins quervernetzt werden konnte. Offensichtlich war die Esterase der bevorzugte Reaktionspartner der entstandenen Quervernetzer. In *C. taxifolia* wurde stets eine nahezu vollständige Quervernetzung des gesamten Proteingehalts beobachtet. Daher sollten sich mit der aus der Alge isolierten und aufgereinigten Esterase wesentlich bessere Ergebnisse

erzielen lassen. Eventuell ist diese an das Substrat Caulerpenin (**5**) angepasst ist und wird daher im Gegensatz zu PLE kaum von dem Quervernetzer angegriffen. Die aufwändige Isolierung der vermutlich membrangebundenen Esterase aus der Alge^[25] konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Auch ist eine zusätzliche enzymatische Unterstützung der Quervernetzung nicht auszuschließen. Dennoch konnte durch dieses Experiment das Quervernetzungspotential von 1,4-Bisenoylacetaten, insbesondere von Caulerpenin (**5**), in einem künstlichen System demonstriert werden.

3.3.4 Selektive kovalente Markierung von Esterasen mit DYTM-490-Bisenoylacetat

Neben der Quervernetzung werden kovalente Reaktionen von niedermolekularen Verbindungen mit Proteinen auch für deren Markierung ausgenutzt. Die Verwendung von fluoreszenten Verbindungen erlaubt eine einfache Lokalisation der Proteine im Gewebe und wird in der Forschung intensiv angewendet.^[109] Eine schnelle Identifizierung einzelner Enzyme in Proteingemischen und Gewebeproben ist für die Medizin von Bedeutung. Beispielsweise sind Esterasen an Entzündungsreaktionen beteiligt, so dass deren selektive Identifizierung Potential für die medizinischen Diagnostik von Krankheiten hat.^[110, 111] Auch Lipasen besitzen hohen diagnostischen Wert. So werden Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse unter anderem durch Analyse der Lipasen im Blutserum diagnostiziert.^[112] Andererseits lassen sich mit gezielten kovalenten Reaktionen bestimmte Enzyme permanent inhibieren. Zum einen ermöglicht dies Untersuchungen von biochemischen Prozessen und zum anderen auch die Bekämpfung von Krankheiten.^[113, 114] Dabei stellt die selektive Modifikation ausschließlich der gewünschten Proteine die größte Herausforderung dar. Da 1,4-Bisenoylacetate selbst nicht mit Proteinen reagieren, sondern erst durch Esterasen oder Lipasen aktiviert werden müssen, sollte in den folgenden Experimenten geprüft werden, ob die bereits beobachtete Reaktion der Dialdehyde mit den Enzymen selbst für selektive Markierungsreaktionen genutzt werden kann.

Dazu wurde die fluoreszente Sonde **131** mit Esterasen umgesetzt und überprüft, ob eine kovalente Reaktion stattfand. Zunächst wurde polymergebundene Schweineleberesterase eingesetzt bei der nach der Reaktion nicht umgesetztes 1,4-Bisenoylacetat bzw. dessen frei vorliegende Reaktionsprodukte durch wiederholtes Waschen mit dest. Wasser leicht vom Enzym abgetrennt werden können. Die so behandelten Esterase-Polymerkügelchen (beads) zeigten bei Belichten mit 480 nm deutliche Fluoreszenz, was für eine kovalente Reaktion spricht (Abb. 3.3.8). Wurde statt der Sonde **131** das fluoreszente Amid **130** verwendet, welches nicht über die Bisenoylacetateinheit verfügt, so fluoreszierten die Esterase-beads nicht. Die beobachtete Fluoreszenz des mit **131** behandelten Enzyms kann daher nicht

durch unspezifische Wechselwirkung erklärt werden, sondern beruht wahrscheinlich auf der Deacetylierung zu dem Dialdehyd **140** und anschließender kovalenter Reaktion. Durch ein Kontrollexperiment mit unbehandelten Esterase-beads konnte auch eine Eigenfluoreszenz des Polymers ausgeschlossen werden.

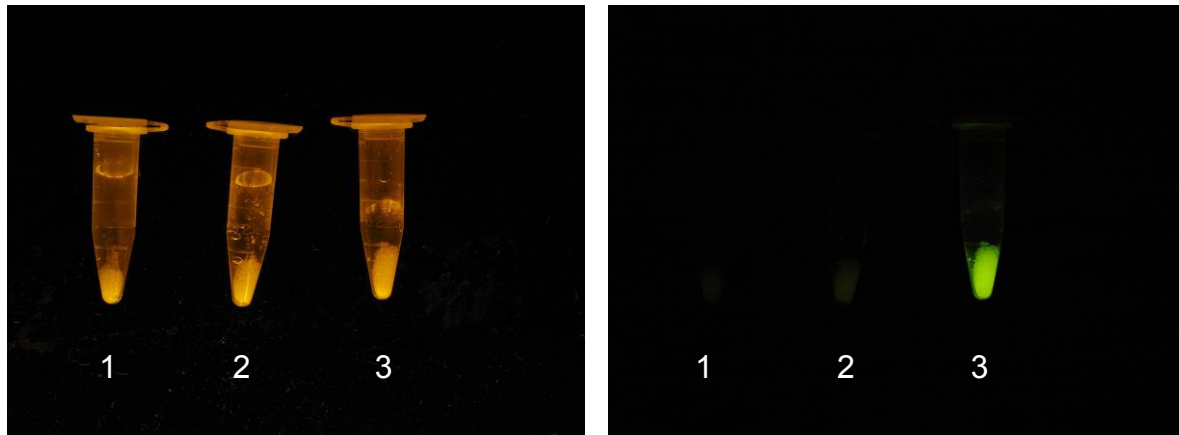


Abbildung 3.3.8: Eppendorf-Vials mit auf Eupergit® immobilisierter Schweineleberesterase unter Tageslicht (links) und bei Belichtung mit 480 nm (rechts); 1 = ohne Behandlung, 2 = nach Behandlung mit **130**, 3 = nach Reaktion mit **131**; 1h Reaktionszeit

Bei diesem Experiment hatte der entstehende Quervernetzer neben der Esterase keinen weiteren potentiellen Reaktionspartner. Um zu prüfen, ob dieser selektiv mit dem Enzym reagiert oder jedes beliebige Protein im Gemisch angreift, wurde **131** mit CLE in Gegenwart eines Modellproteins in Reaktion gebracht und das Gemisch per SDS-PAGE analysiert. Damit sollte bestimmt werden, an welche der beiden Proteine die fluoreszente Sonde bzw. der Dialdehyd **140** bindet. Als Modellprotein diente hierbei das bereits in *in-vivo*-Versuchen eingesetzte DY™-481XL-markierte Histon. Dadurch erhoffte man sich eine leichtere Zuordnung der möglicherweise entstehenden Quervernetzungsprodukte, da di-, tri- oder gar oligomerisiertes Histon durch seine Fluoreszenz leicht als solches identifiziert werden kann. Jedoch konnte unter diesen Reaktionsbedingungen keine Quervernetzung beobachtet werden, da auf Zugabe von Caulerpenin (**5**) verzichtet wurde und dadurch weitaus geringere Konzentrationen des 1,4-Bisenoylacetats vorlagen, als für die Quervernetzung benötigt wird (vgl. 3.3.3) (Abb. 3.3.9).

Bei Belichtung des Gels mit 480 nm zeigt sich, dass die fluoreszente Sonde ausschließlich mit der Esterase reagiert hat. Eine Reaktion von **131** mit dem Modellprotein hätte aufgrund der Überlagerung der Emissionsbanden zu gelber Fluoreszenz geführt.

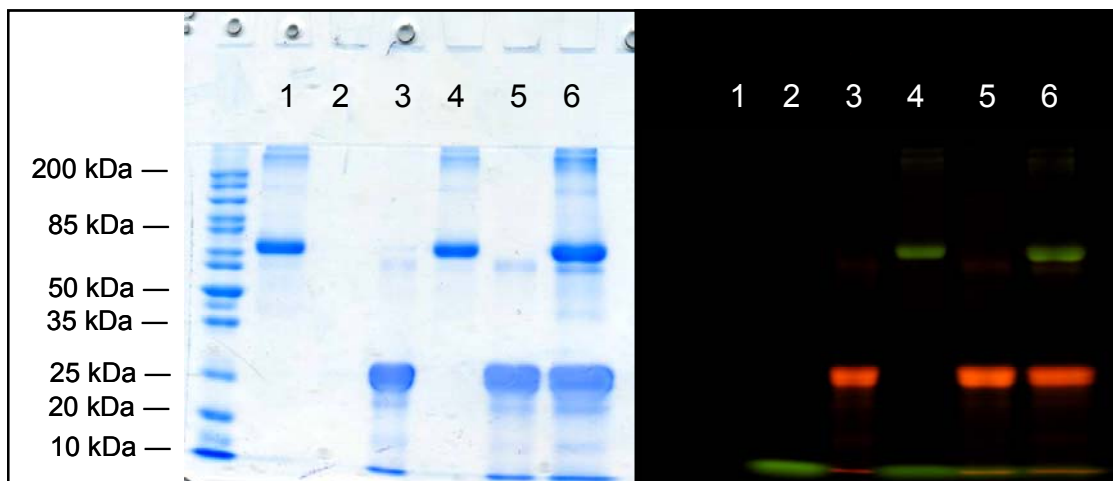


Abbildung 3.3.9: SDS-PAGE der Reaktion von DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) mit Esterasen und Modellprotein; Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm

1 = Esterase aus *Candida lipolytica* (CLE)

2 = DY™-490-Bisenoylacetat (**131**)

3 = DY™-481XL-Histon

4 = CLE + DY™-490-Bisenoylacetat (**131**)

5 = DY™-481XL-Histon + DY™-490-Bisenoylacetat (**131**)

6 = DY™-481XL-Histon + DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) + CLE

In Kontrollexperimenten wurde überprüft, ob die beobachtete Selektivität der fluoreszenten Sonde für CLE in deren Fähigkeit begründet ist, die Deacetylierung zu katalysieren. So wurde Ovalbumin in Gegenwart von CLE bzw. PLE mit mehreren fluoreszenten Verbindungen umgesetzt und per SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.3.10). Auch hier zeigt sich, dass **131** selektiv mit den Esterasen reagierte und nicht mit Ovalbumin. Hingegen war der NHS-Ester von DY™-490 (**128**) in der Lage, sowohl die Esterasen als auch Ovalbumin kovalent zu markieren, beide verfügten also über freie Lysinreste an denen Reaktion stattfinden konnte. Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den fluoreszenten Verbindungen und CLE bzw. Ovalbumin konnten ausgeschlossen werden, da DY™-490-Propargylamid (**130**) kein Markierungspotential zeigte. Die beobachtete selektive Markierung der Esterase wird daher eindeutig durch die Bisenoylacetateinheit hervorgerufen.

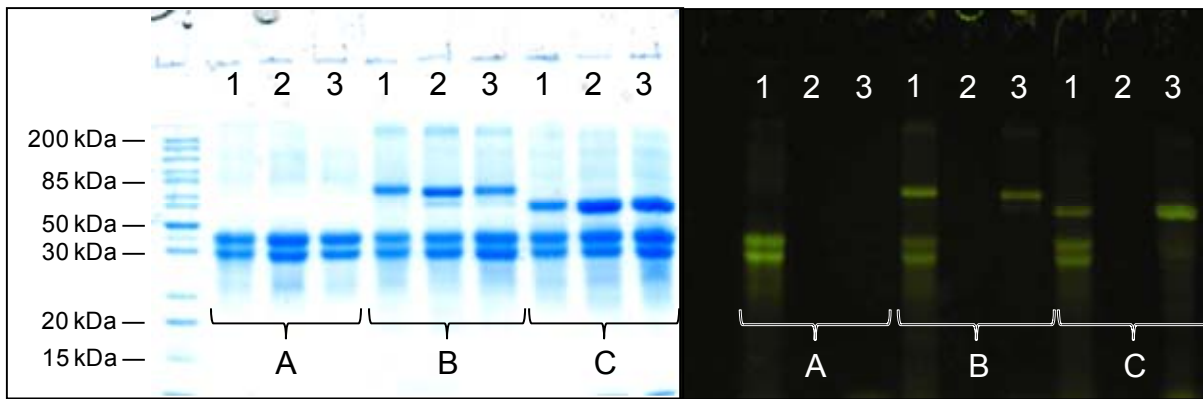


Abbildung 3.3.10: SDS-PAGE der Versuche zur Markierung von Ovalbumin in Gegenwart von Esterasen; Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm;

- 1 = DY™-490-NHS-Ester (128)
- 2 = DY™-490-Propargylamid (130)
- 3 = DY™-490-Bisenoylacetat (131)
- A = Ovalbumin (Kontrolle)
- B = Ovalbumin + CLE
- C = Ovalbumin + PLE

Bei diesen Markierungsreaktionen werden nur aktive Esterasen markiert, da nur diese in der Lage sind, die fluoreszente Sonde zu deacetylieren. Wurden die Enzyme vor der Reaktion durch 3 minütiges Kochen denaturiert, fand keine Markierung statt (Abb. 3.3.11).

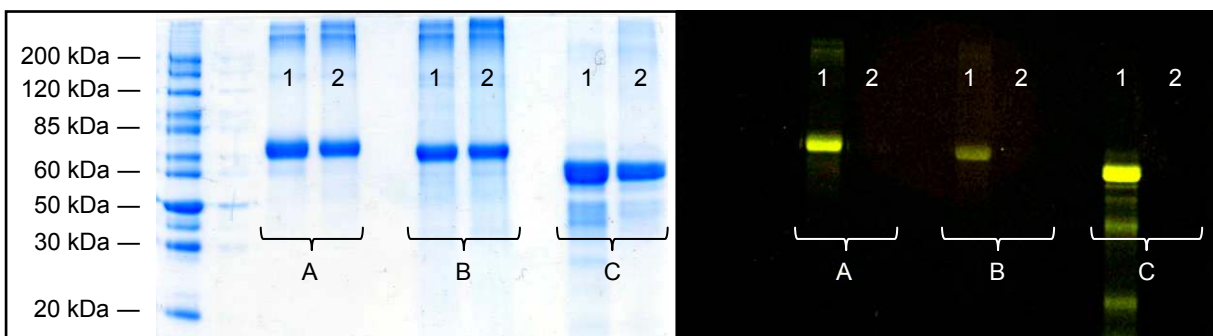


Abbildung 3.3.11: SDS-PAGE der Markierung von verschiedenen Esterasen mit DY™-490-Bisenoylacetat (131); links: angefärbtes Gel; rechts: Belichtung mit 480 nm;

- 1 = native Esterase
- 2 = denaturierte Esterase
- A = Esterase aus *Candida lipolytica* (CLE)
- B = Esterase aus *Thermoanaerobium brockii* (TBE)
- C = Schweineleberesterase (PLE)

Wird **131** mit verschiedenen esterspaltenden Enzymen umgesetzt, so werden ausschließlich Esterasen markiert, nicht jedoch Lipasen (Abb. 3.3.12).

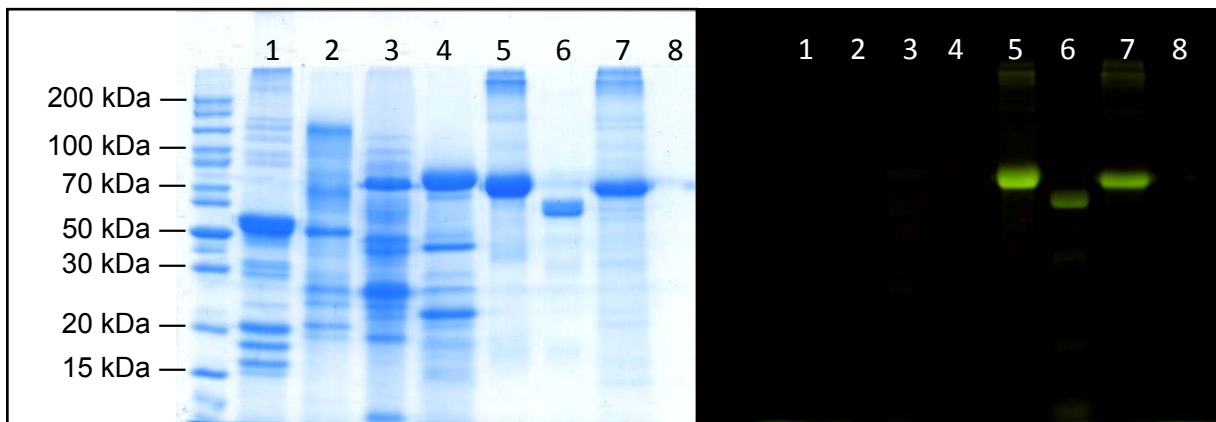


Abbildung 3.2.12: SDS-PAGE der Markierung von verschiedenen Lipasen und Esterasen mit DY™-490-Bisenoylacetat (**131**); Links: mit RAPIDStain™ angefärbtes Gel; Rechts: Belichtung mit 480 nm

- 1 Lipase aus Schweinepankreas
- 2 Lipase aus *Aspergillus niger*
- 3 Lipase aus *Rhizopus niveus*
- 4 Lipase aus *Candida antarctica*
- 5 Esterase aus *Candida lipolytica*
- 6 Esterase aus Schweineleber
- 7 Esterase aus *Thermoanaerobium Brockii*
- 8 DY™-490-Bisenoylacetat (Kontrolle)

Dieses Ergebnis überrascht, da jedes dieser Enzyme in der Lage ist, **131** zu dem Dialdehyd **140** zu deacetylieren (vgl. Abschnitt 3.3.1). Offensichtlich kann **140** leichter mit den Esterasen reagieren als mit den Lipasen. Möglicherweise findet diese Reaktion bereits im aktiven Zentrum statt, auch wenn ein Teil der gebildeten Quervernetzer dieses verlassen kann und sich im Reaktionsgemisch nachweisen lässt. Auch ist nicht geklärt, ob die Reaktion unter Bildung von di-Imin- oder Pyrrolstrukturen stattfindet (Abb. 3.3.13).

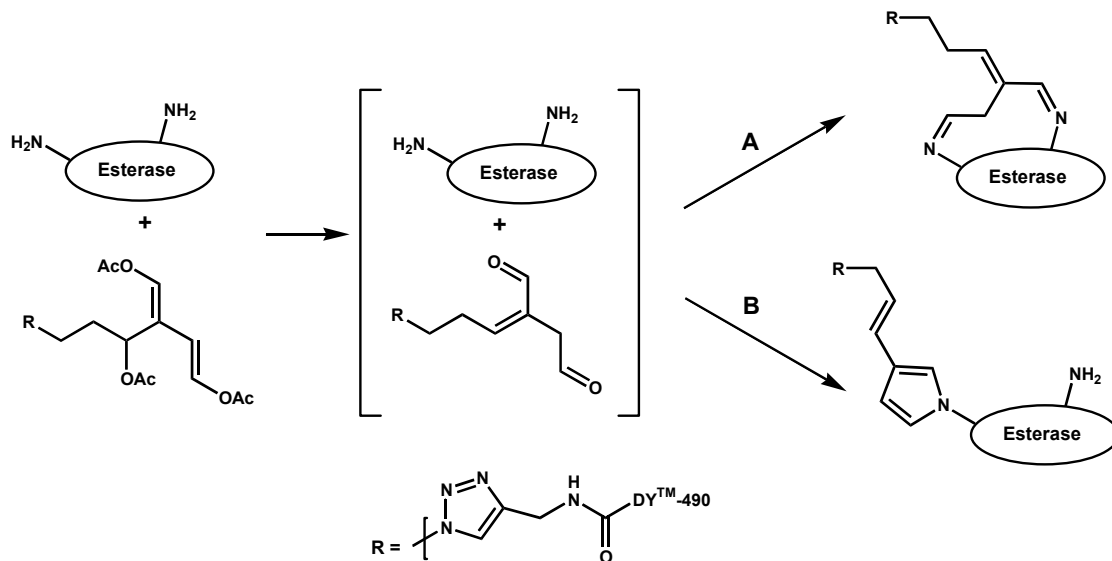


Abbildung 3.3.11: Vermutete Reaktionsmechanismen der Markierungsreaktion von Esterasen mit DY™-490-Bisenoylacetat (**131**)

Durch massenspektrometrische Analyse der markierten Esterase sollte einerseits der Reaktionsmechanismus und andererseits der Markierungsgrad sowie die Position der Markierung im Enzym aufgeklärt werden. Eine effiziente Methode der Proteinanalytik ist es, die zu analysierenden Proteine mit einem Enzym in kleinere Peptide zu zerlegen und diese mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie zu analysieren.^[115] Der Vergleich der Massenspektren von markierter und nativer Schweineleberesterase zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Ursache dafür könnte zum einen die schlechte Ionisierbarkeit der markierten Peptidfragmente sein, da das Fluorophor mit drei anionischen Gruppen eine effektive Bildung positiv geladener Ionen unterdrückt. Auch könnte eine unvollständige Spaltung der markierten Esterase in Peptidfragmente zu diesem Ergebnis führen. Das dafür eingesetzte Trypsin spaltet Proteine bevorzugt an der Carboxylfunktion von freiem Lysin und Asparagin durch Amidhydrolyse.^[116, 117] Wenn die Seitenketten des Lysins jedoch durch **131** markiert wurden, ist es möglich, dass Trypsin diese Position nicht als Lysin erkennen konnte und daher keine Hydrolyse stattfand. Daher ließ sich die Art der Bindung zwischen Esterase und **131** nicht bestimmen. Weitere Studien diesbezüglich konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, so dass der genaue Reaktionsmechanismus der selektiven Esterasemarkierung nicht aufgeklärt werden konnte.

Es existiert bereits eine Vielzahl von Techniken, die zur selektiven Markierung bestimmter funktioneller Proteine eingesetzt werden.^[118, 119] Bei der Markierung von Hydrolasen, zu denen die Lipasen und Esterasen zählen, werden Inhibitoren eingesetzt, welche beispielsweise eine fluorophore Gruppe tragen und auf das aktive Zentrum des Zielenzyms zugeschnitten sind. Der gebildete Enzym-Inhibitor-Komplex kann dann z. B. durch

Gelelektrophorese analysiert werden.^[120, 121] Da Lipasen und Esterasen große Bedeutung für die Enzymdiagnostik besitzen, ist die Entwicklung solcher Inhibitoren oft darauf ab, diese Enzyme voneinander zu unterscheiden.^[122] Aufgrund der sehr ähnlichen Wirkungsweise dieser Enzyme stellt dies eine große Herausforderung dar. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren der Esterasemarkierung beschränkt sich jedoch nicht nur darauf, selektiv aktive Esterasen in einem Proteingemisch und möglicherweise auch in Gewebeproben kovalent mit einem Fluorophor zu versehen. Das verwendete Syntheseprinzip von **131** ermöglicht einen schnellen Zugang zu unterschiedlich substituierten Bisenoilacetaten. Die im letzten Schritt eingesetzte „Click“-Reaktion mit dem Azidobisenoilacetat **126** bzw. **127** gestattet, dass nahezu jedes beliebige Molekül eingeführt werden kann, solange es über eine terminale Alkinfunktion verfügt. Daraus ergeben sich eine Vielzahl von potentiellen Anwendungen in der Enzymanalytik, sowie die Möglichkeit zur Anreicherung und Immobilisierung von Esterasen. Von hoher Bedeutung für die Anwendbarkeit, sind die hohe Selektivität und die Möglichkeit zwischen Lipasen und Esterasen zu unterscheiden.

3.4 Bioassays zur Untersuchung der Fraßabwehr von *C. taxifolia*

Um die Verteidigungschemie eines Organismus' zu untersuchen, reicht es oftmals nicht aus einzelne Verbindungen aus den Organismen zu extrahieren und auf ihre Wirkung zu testen. Häufig ist nur eine Mischung von Komponenten wirksam oder die biochemischen Abwehrreaktionen müssen erst induziert oder aktiviert werden. Ein Extrakt oder auch isolierte Verbindungen können deshalb mitunter nicht das biochemische Verteidigungspotential eines Organismus wiedergeben, wenn dessen Abwehr nicht ausschließlich auf konstitutiver, also permanenter vorhandener Wehrchemie, beruht. Die experimentelle Simulierung von lokalen Konzentrationserhöhungen der Wehrkomponenten, z. B. direkt am verletzten Gewebe, ist sehr schwierig. Ebenso lässt sich die Verteidigung nicht immer auf eine Freisetzung giftiger oder abschreckender Verbindungen zurückführen. Bei der Auswahl und Planung von Bioassays müssen solche Sachverhalte berücksichtigt werden.

Gemäß der Literatur beruht der Verteidigungsmechanismus von *Caulerpa taxifolia* hauptsächlich auf der Freisetzung von Caulerpenin (**5**) und dessen Potential, toxisch auf Herbivoren zu wirken und diese abzuschrecken.^[36, 49, 50] In Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass nach Verwundung der Alge Caulerpenin (**5**) enzymatisch umgewandelt wird und der dabei entstehende Dialdehyd Oxytoxin 2 (**13**) die Algenproteine quervernetzt. Inwieweit sich diese Wundreaktion auf das Verteidigungspotential von *C. taxifolia* auswirkt, wurde in diesen Studien jedoch nicht untersucht. Aus diesem Grund sollte in einer Reihe von Bioassays der Einfluss der verwundungsinduzierten Proteinquervernetzung auf die Verteidigung der Alge gegen Herbivoren untersucht werden.

Um den Abwehrmechanismus beobachten zu können, wurden Choice-Assays durchgeführt, in denen die verwendeten Herbivoren die Wahl zwischen 2 Futterarten hatten. Für die Fütterungsexperimente wurden die beiden Flohkrebsspezies *Ampithoe longimana* und *Paracerceis caudata* als Modellorganismen ausgewählt. Diese Arten sind an der nordamerikanischen Atlantikküste heimisch und dementsprechend gehört die in den Tropen beheimatete *C. taxifolia* nicht zu ihrer typischen Nahrung. Deswegen konnten sich diese Herbivoren im Laufe der Evolution nicht an die Verteidigung der Alge anpassen.

Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurde der Aufenthaltsort der Flohkrebse bestimmt. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass das Futter, auf dem sich der Herbivor befindet auch befressen wird.^[123, 124] Dieser Versuchsaufbau wies den Vorteil auf, dass sich die dem Futter zugesetzten Verbindungen im Seewasser in dieser relativ kurzen Zeit nicht verteilen konnten. Eine direkte Quantifizierung der gefressenen Futtermenge hätte sich als schwierig erwiesen, da die Flohkrebse nur sehr geringe Mengen Nahrung aufnehmen. Um auszuschließen, dass bestimmtes Futter aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften

bevorzugt wird, wurde künstliches Futter auf Agarbasis eingesetzt. Die Herstellung erfolgte mit Hilfe von Pulvern aus gefriergetrockneter *Ulva spp.* und *C. taxifolia*. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass *Ulva spp.* als Futter für diese Flohkrebse geeignet ist. Diese Alge diente daher hauptsächlich als Kontrollfutter.^[125] Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben.^[126]

3.4.1 Bioassays mit *Ulva spp.* und Caulerpenin

Zu Beginn wurde in einem Experiment überprüft, ob sich die in der Literatur beobachteten fraßhemmenden Eigenschaften von Caulerpenin (5) auch bei den verwendeten Versuchstieren reproduzieren ließen.^[49, 127, 128] Dazu wurden jeweils 14 Flohkrebse beider Arten Kontrollfutter und mit 7 mg/g Caulerpenin (5) behandeltes Futter angeboten. Diese Menge entspricht dem Caulerpeningehalt der verwendeten Kultur von *C. taxifolia*, aus welcher das eingesetzte Caulerpenin (5) extrahiert wurde. Da die Verbindung als methanolische Lösung bei der Futterpräparation zugefügt wurde, wurde das Kontrollfutter mit der gleichen Menge Methanol versetzt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf das Methanol zurückzuführen sind. Wie in Abbildung 3.4.1 zu erkennen ist, bevorzugten beide Flohkrebarten das Caulerpenin-freie Kontrollfutter, sie verhielten sich wie die in der Literatur beschriebenen Seeigel und Fische.^[49, 128, 129]

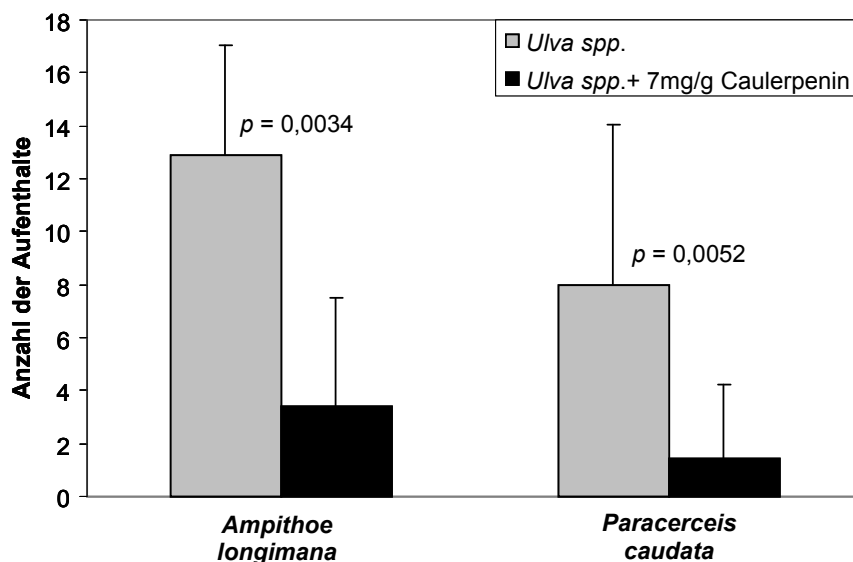


Abbildung 3.4.1: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen Futter basierend auf *Ulva spp.* und *Ulva spp.* mit Zusatz von Caulerpenin (5)

Es wurde somit bestätigt, dass bei dieser Konzentration an Caulerpenin (5) eine fraßhemmende Wirkung zu beobachten ist.

Sowohl bei den in der Literatur dokumentierten Experimenten als auch bei dem selbst durchgeführten Versuch wurde nicht berücksichtigt, dass die Caulerpeninkonzentration bei einer Verwundung, wie sie auch durch Fraßaktivität hervorgerufen wird, aufgrund der enzymatischen Umwandlung stark herabgesetzt wird. Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau der natürliche Prozess der Verteidigung einer verwundeten Alge nicht realitätsnah simuliert werden.

3.4.2 Bioassays mit „intakter“ und „verwundeter“ *C. taxifolia*

Für den Vergleich des Abwehrpotentials zwischen intakter und verwundeter Alge mussten zwei Futterarten hergestellt werden, die diese beiden Zustände der Alge simulierten. Bei der Herstellung des gefriergetrockneten Algenpulvers ist eine Verletzung während des Mörserns unumgänglich. Deshalb musste für die Präparation des Futters auf Basis von intakter *C. taxifolia* die Verwundungsreaktion inhibiert werden. Dazu wurde die Alge für 3 Minuten gekocht, bevor sie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und im letzten Schritt gefriergetrocknet wurde. Auf diese Weise wurden die Esterasen die für die Deacetylierung von Caulerpenin (5) verantwortlich sind denaturiert, so dass keine enzymatische Umwandlung zu Folgeprodukten stattfinden konnte. Durch die Extraktion mit Ethylacetat und anschließender GC/MS-Messungen wurde das Vorhandensein von Caulerpenin (5) im gefriergetrockneten Pulver bestätigt. Das auf diesem Pulver basierende Futter war für die Simulation der chemischen Zusammensetzung der intakten Alge geeignet, da auch während des Experimentes keine Wundreaktionen ausgelöst werden konnten. Jedoch wurde dieses Futter trotz des Caulerpeningehaltes nicht signifikant gemieden, auch wenn die Kontrollalge als Alternative zur Verfügung stand (Abb. 3.4.2). Möglicherweise lag die Caulerpeninkonzentration unter der im ersten Versuch verwendeten Konzentration, und reichte nicht aus, um einen Effekt auf die Herbivoren auszuüben. Eine Quantifizierung von Caulerpenin (5) im Futter gestaltete sich allerdings als unmöglich. Allein diese Beobachtung stellt jedoch eine einzig auf die Freisetzung von Caulerpenin (5) basierte Verteidigung in Frage, da diese nur bei hohen Konzentrationen effektiv zu sein scheint.

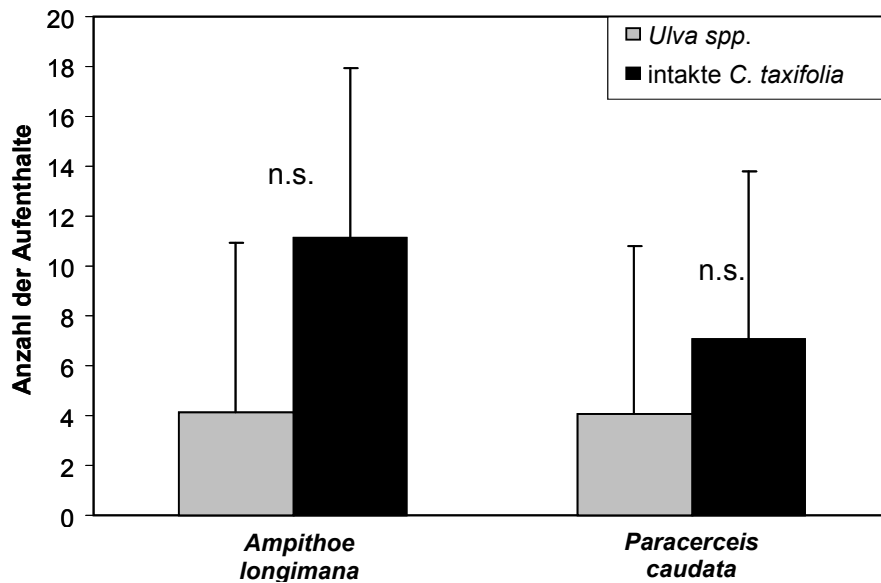


Abbildung 3.4.2: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen Futter basierend auf *Ulva spp.* und intakter *C. taxifolia*

Für die Herstellung des Futters, welches verwundeter *C. taxifolia* entsprach, wurde die frische Alge für 5 min gemörsert, um eine Verwundung zu simulieren. Anschließend wurde sie schockgefroren, erneut gemörsert und gefriergetrocknet. In Ethylacetat-Extrakten dieses Pulvers konnte mittels GC/MS-Messung kein Caulerpenin (**5**) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Deacetylierung von **5** während der Wundreaktion vollständig ablaufen konnte. Bot man diese beiden Futterarten gleichzeitig an, so wurde intakte *C. taxifolia* signifikant bevorzugt, trotz des Gehaltes an Caulerpenin (**5**) (Abb. 3.4.3).

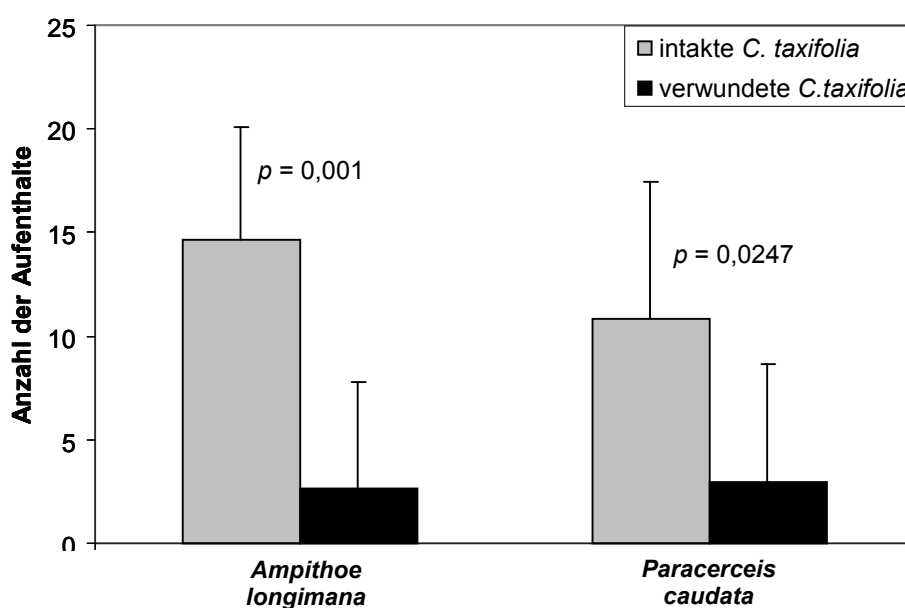


Abbildung 3.4.3: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen Futter basierend auf intakter *C. taxifolia* und verwundeter *C. taxifolia*

Dies zeigt eindeutig, dass die Fraßresistenz der Alge nicht auf Caulerpenin (**5**) selbst zurückzuführen ist, sondern durch die verwundungsinduzierten Veränderungen in der Biochemie der Alge hervorgerufen wird.

In weiteren Versuchen sollte deshalb überprüft werden, ob Transformationsprodukte von Caulerpenin (**5**), wie Oxytoxin 2 (**13**) bzw. Folgereaktionen, die diese Verbindung eingeht, zu einer Fraßhemmung führen.

Möglicherweise ist Oxytoxin 2 (**13**) aufgrund seines Dialdehydcharakters und der damit einhergehenden Reaktivität wesentlich toxischer als Caulerpenin (**5**) und stellt den eigentlichen Abwehrmetaboliten der Alge dar. So zeigte beispielsweise Halimedatrial (**146**), ein aus *Halimeda* spp. extrahiertes Diterpen, welches ein stabilisiertes 1,4-Dialdehydsystem besitzt, in Bioassays eine höhere Wirkung als Halimedatetraacetat (**147**), ein in derselben Grünalge vorkommendes Bisenoylacetat (siehe Abb. 3.4.4).^[130]

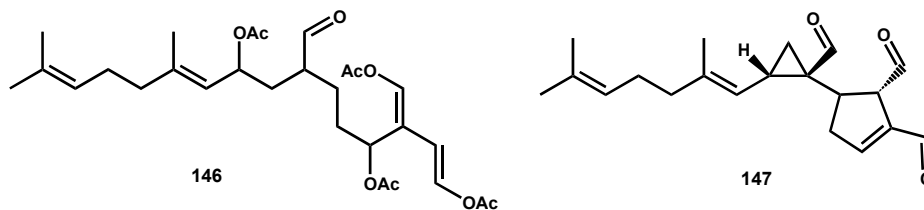


Abbildung 3.4.4: Halimedatetraacetat (**145**) und Halimedatrial (**146**) aus *Halimeda* spp.

Caulerpenin (**5**) könnte somit nur eine inaktive Speicherform des Verteidigungsmetaboliten darstellen und dementsprechend nur sehr geringes fraßhemmendes Potential besitzen. Diese Überlegungen ließen sich allerdings nicht direkt in einem Bioassay überprüfen. Oxytoxin 2 (**13**) lässt sich aufgrund seiner hohen Reaktivität gegenüber Nucleophilen und Proteinen nicht aus *C. taxifolia* extrahieren und aufreinigen. Ein mit Oxytoxin 2 (**13**) angereichertes künstliches Futter konnte daher nicht hergestellt werden. Wie in Kapitel 3.2 gezeigt wurde, wirkt Oxytoxin 2 (**13**) als Proteinquervernetzer und ist bereits 4 min nach der Verwundung vollständig in einem Protein-Biopolymer fixiert. Es liegt daher nicht mehr frei in verwundeter Alge vor. Die beobachtete Präferenz des intakten Futters lässt sich daher nicht durch eine fraßhemmende Wirkung des Dialdehyds erklären. Aus diesem Grunde sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, ob möglicherweise die verwundungsinduzierte Proteinquervernetzung das Fraßverhalten beeinflusst.

3.4.3 Bioassays mit verwundeter *C. taxifolia* und zugesetzten Lysin und Cystein

In Modellreaktionen, in denen Oxytoxin 2 (**13**) mittels immobilisierter Esterase *in-situ* aus Caulerpenin (**5**) erzeugt wurde, reagierte der Dialdehyd mit den nukleophilen Amino- und Thiolgruppen von Lysin und Cystein zu Addukten.^[25] Dies spricht dafür, dass in *C. taxifolia* **13** ebenfalls mit diesen funktionellen Gruppen der Algenproteinen reagiert und dadurch die Proteine quervernetzt. Wird der gesamte Proteingehalt von *C. taxifolia* hydrolysiert und anschließend der Gehalt einzelner Aminosäuren von intakter und verwundeter Alge mittels RP-HPLC/MS bestimmt zeigt sich, dass nach Verwundung eine deutliche Abreicherung von Lysin eintritt.^[25] Dieses reagiert mit **13** zu Imin- bzw. Pyrroladdukten. Cystein liegt in Proteinen häufig nicht mit einer freien Thiolgruppe vor, sondern ist überwiegend über Disulfidbrückenbindungen mit anderen Cystein-Resten verknüpft, was die Tertiärstruktur des Proteins stabilisiert. Derartig gebundenes Cystein kann sich daher vermutlich nicht an der Proteinquervernetzung beteiligen. Jedoch ließ sich nicht verbrücktes Cystein nicht einzeln quantifizieren, wodurch sich nicht eindeutig belegen ließ, ob sich diese Aminosäure auch in der Alge an der Vernetzung beteiligt. Ausgehend von den Ergebnissen der Modellreaktion ist jedoch anzunehmen, dass es ebenfalls zu einer Abreicherung dieser Aminosäure während der Verwundung von *C. taxifolia* kommt.

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass Flohkrebse in Choice-Assays in der Lage sind zwischen verschiedenen Futterqualitäten zu unterscheiden,^[123] so dass sich aus der beobachteten Futterpräferenz Aussagen über den Nährstoffgehalt treffen lassen. Die beobachtete Präferenz für das Futter mit intakter Alge, lässt sich daher eventuell dadurch erklären, dass sich die Qualität der Alge als Nahrungsquelle bei Verwundung verringert. Handelt es sich bei Lysin und Cystein um essentielle Aminosäuren für Herbivoren, so würde deren Abreicherung im Algengewebe nach Verletzung den beobachteten Qualitätsverlust erklären.

Um dies zu überprüfen wurde Futter auf der Basis verwundeter Alge hergestellt, welches mit jeweils 30 µg/g Lysin und Cystein angereichert wurde. Diese Aminosäuren wurde nach der Gefriertrocknung des Algenpulvers zugesetzt, somit konnte keine Reaktion mit Oxytoxin 2 (**13**) stattfinden und sie waren dadurch für die Herbivoren verfügbar. Dennoch wurde dieses Futter gegenüber dem unbehandelten Futter nicht signifikant bevorzugt, die Nahrungsqualität ließ sich demzufolge durch Zugabe von Lysin und Cystein nicht verbessern (Abb. 3.4.5).

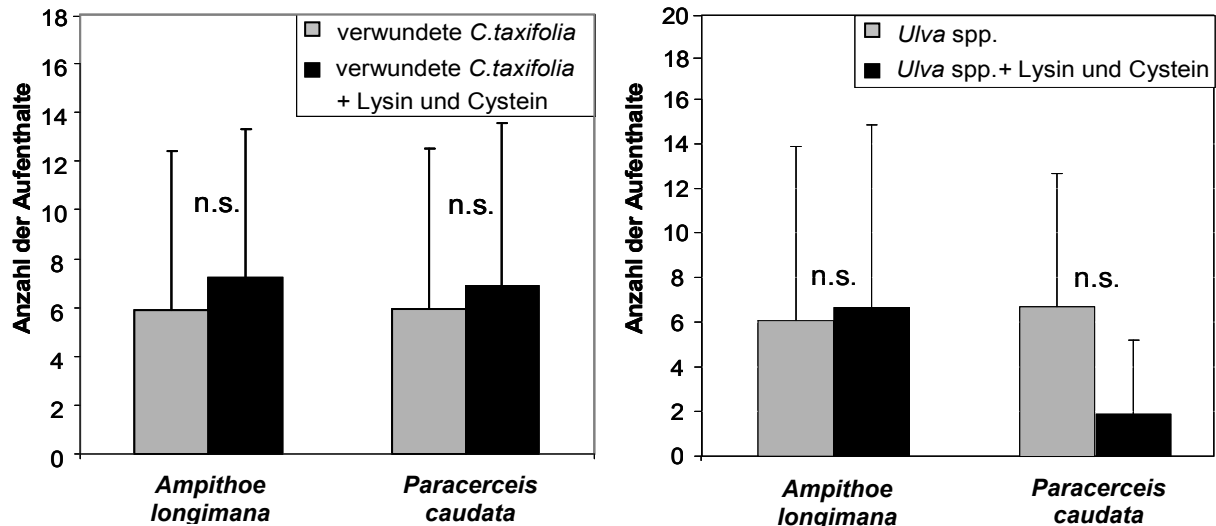


Abbildung 3.4.5: Links: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen verwundeter *C. taxifolia* mit und ohne Zusatz von Lysin und Cystein (jeweils 30 $\mu\text{g/g}$)
Rechts: Kontrollexperiment mit *Ulva* spp. unter gleichen Versuchsbedingungen

Das Fraßverhalten der Herbivoren wird daher nicht durch die Abreicherung dieser Aminosäuren beeinflusst.

3.4.4 Bioassays mit verwundeter *C. taxifolia* und zugesetztem Protein

Die in Kapitel 3.2 durchgeführten SDS-PAGE-Untersuchungen von *C. taxifolia* zeigten, dass nicht nur einzelne, bestimmte Proteine an der Bildung des Wundverschlusses beteiligt sind, sondern der gesamte Proteingehalt der Alge durch die Quervernetzungsreaktion in das Biopolymer rekrutiert wird. Möglicherweise sind die Herbivoren nicht in der Lage, die so gebundenen Proteine für ihren Stoffwechsel zu verwenden.

Um dies zu überprüfen, wurde Futter auf der Basis von verwundeter Alge hergestellt, dem zusätzliches Protein in Form von Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt wurde. Die verwendete Konzentration von 0,5 mg/g wurde gemäß dem natürlichen Proteingehalt von *C. taxifolia*^[107] abgeschätzt. Da die Zugabe des BSA ebenfalls nach der Gefriertrocknung erfolgte, konnte es nicht in das Proteinbiopolymer aufgenommen werden. Dieses Futter enthielt somit frei verfügbares Protein, dessen Gehalt dem der intakten Alge entsprach. Im Bioassay wurde diese Nahrung signifikant gegenüber dem unbehandelten Äquivalent der verwundeten Alge bevorzugt (Abb. 3.4.6). In einem Kontrollversuch wurde Futter auf Basis von *Ulva* spp. mit BSA hergestellt und mit unbehandelten verglichen. Hierbei zeigte sich keine Bevorzugung des BSA-haltigen Futters. Dies belegt, dass die Zugabe von BSA nur dann zu einer Steigerung der Futterqualität führte, wenn die Proteine der Alge zuvor durch die Wundreaktion abgereichert wurden. In der Literatur wird diskutiert, dass *Ampithoe*

longimana einen geringeren Proteingehalt in der Nahrung durch das Konsumieren größerer Futtermengen kompensieren kann.^[123, 131] Dies würde aber bedeuten, dass *A. longimana* länger auf dem proteinärmeren Futter hätte fressen müssen, was aber nicht beobachtet wurde. Stattdessen bevorzugte der Amphipode das proteinreichere Futter.

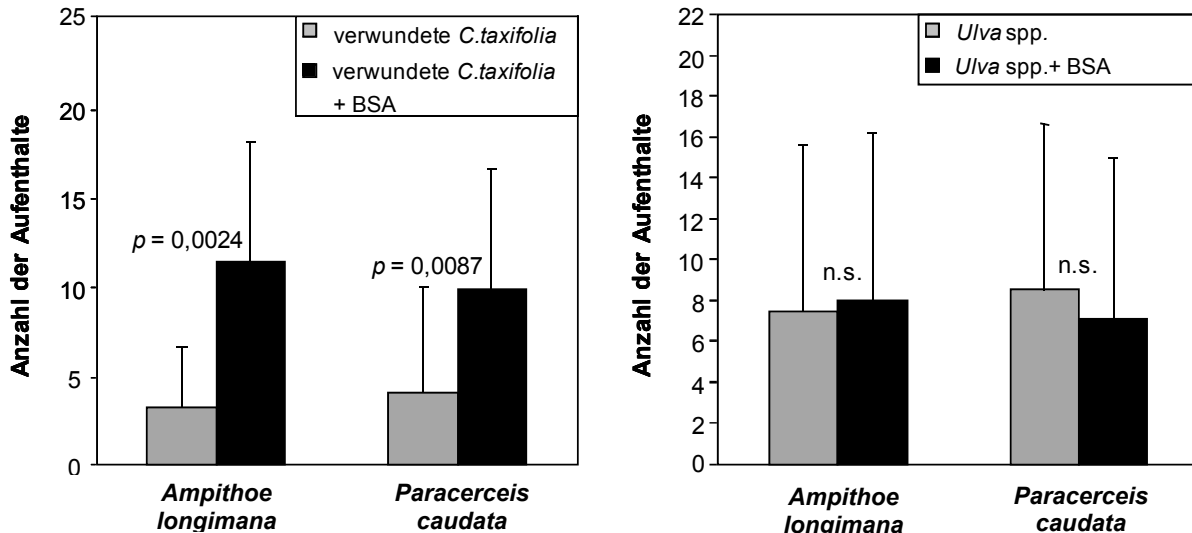


Abbildung 3.4.6: Links: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen Futter basierend auf verwundeter *C. taxifolia* mit und ohne Zugabe von BSA (0,5 mg/g)
Rechts: Kontrollversuch mit *Ulva* spp. unter gleichen Versuchsbedingungen

In einem weiteren Choice-Assay wurde getestet, ob sich die Futterqualität der verwundeten Alge allein durch die Zugabe von Protein vollständig wiederherstellen lässt. Dazu wurde das auf intakter Alge basierende Futter mit dem auf der Basis der verwundeten Alge mit zugesetztem BSA verglichen. Zwar wurde keines der beiden Futterarten signifikant bevorzugt, tendenziell scheint aber die intakte Alge eine höhere Futterqualität aufzuweisen (Abb. 3.4.7).

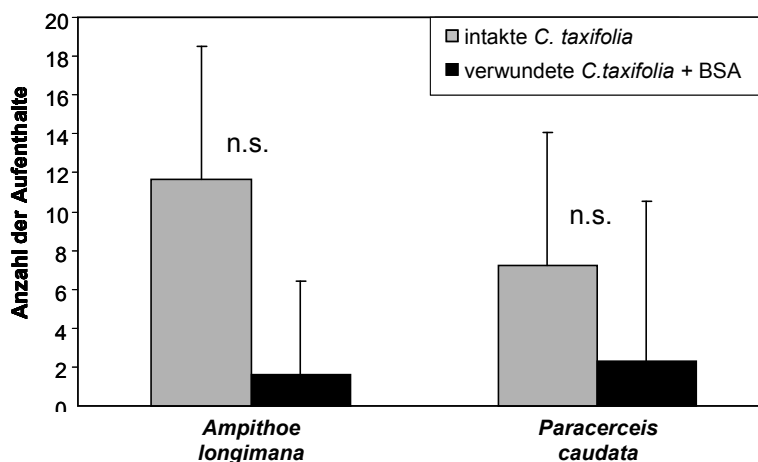


Abbildung 3.4.7: Vergleich der Futterwahl von *A. longimana* und *P. caudata* zwischen Futter basierend auf intakter *C. taxifolia* und verwundeter *C. taxifolia* mit 0,5 mg/g BSA

Offensichtlich wird die Nahrungsqualität auch durch andere Faktoren beeinflusst. Beispielsweise sinkt der pH-Wert im Algengewebe infolge der Wundreaktion von 7,1 auf 4,9, da bei der verwundungsaktivierten Deacetylierung von Caulerpenin (**5**) neben einem Äquivalent Oxytoxin 2 (**13**) auch 3 Äquivalente Essigsäure freigesetzt werden.^[25] Ob sich dies auf das Fraßverhalten auswirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die verwundungsaktivierte Proteinquervernetzung in *C. taxifolia* nicht nur der Wundversiegelung dient, sondern auch zu einer Reduzierung der Futterqualität und der damit verbundenden fraßhemmenden Wirkung auf Herbivoren führt. Da neben *Caulerpa* spp. auch andere siphonale Grünalgen Sekundärmetabolite produzieren, die dem Caulerpenin (**5**) sehr ähneln und ebenfalls über eine Bisenoylacetateinheit verfügen, ist es durchaus denkbar, dass es sich hierbei um eine universelle Abwehrstrategie dieser Algengattung handelt.

Ein solcher Verteidigungsmechanismus ist bisher nur vom Liguster (*Ligustrum obtusifolium*) bekannt. Der Baum nutzt eine ähnliche verwundungsinduzierte Proteinquervernetzung für die Verteidigung gegen Raupen aus.^[102] Hierbei wird der Sekundärmetabolit Oleuropein (**147**) nach der Verwundung zu einem Proteinquervernetzer **148** umgewandelt (siehe Abb. 3.4.9). Die Proteine des Ligusters werden in einem Vernetzungsprodukt **149** gebundenen und denaturiert, was deren Nutzbarkeit für den Stoffwechsel von Raupen verringert. Die kovalente Reaktion des Quervernetzers **148** mit den Aminogruppen des Lysins führt außerdem zu dessen Abreicherung.

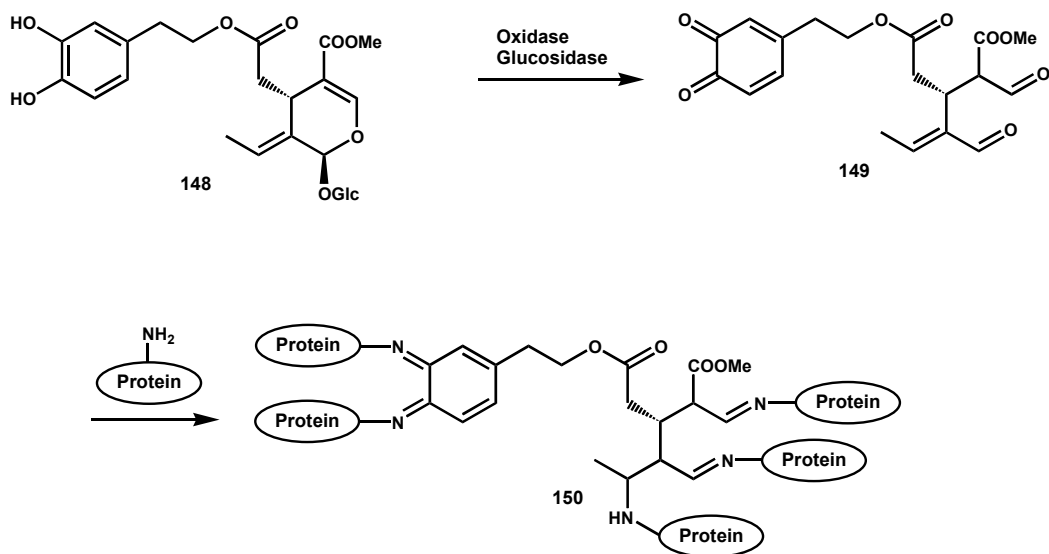


Abbildung 3.4.9: Postulierter Mechanismus der Proteinquervernetzung bei *Ligustrum obtusifolium* nach Konno et al.^[102]

Da diese Aminosäure für Larven und Raupen essentiell ist, trägt dieser Prozess maßgeblich der Verringerung der Futterqualität bei.^[132] Beispielsweise wird das Wachstum der Larven des Eri-Seidenspinners *Samia ricini*, gehemmt, wenn diese sich ausschließlich von Liguster ernähren.^[133]

Im Laufe ihrer Evolution konnten sich einige Schmetterlingsarten, deren Larven auf Liguster fressen wie z. B. *Brahmaea wallichii*, an diese Fraßabwehr anpassen. Sie sondern freies Glycin in ihr Verdauungsekret ab, welches mit dem Vernetzer **148** reagiert, so dass diese Verbindung abgefangen und so die Proteinquervernetzung unterdrückt wird.^[132]

Caulerpa taxifolia wird nur von sehr wenigen Herbivoren des Mittelmeeres als Nahrung akzeptiert, was dafür spricht, dass nur wenige Arten an diese Verteidigungsstrategie angepasst sind. Die im Mittelmeer heimische *Caulerpa prolifera*, welche ebenfalls Caulerpenin (**5**) bildet und es verwundungsaktiviert umsetzt, stellt die bevorzugte Nahrung der beiden marinen Schnecken *Lobiger serradifalci* und *Oxynoe olivacea* dar (Abb. 3.4.10).^[134]



Abbildung 3.4.10: marine Seeschnecken, links: *Lobiger serradifalci*, rechts: *Oxynoe olivacea*

In der Schleimschicht von *O. olivacea* konnten die Caulerpenin-Folgeprodukte Oxytoxin 1 (**8**) und Oxytoxin 2 (**13**) nachgewiesen werden, welche die Schnecke offenbar über die Nahrung bezieht.^[135] Dies weist auf eine evolutionäre Anpassung dieser Arten an die Verteidigung von *Caulerpa* spp. hin, bei der die verwundungsinduzierte Umwandlung von Caulerpenin (**5**) durch die Schnecke unterdrückt wird, um die Proteinquervernetzung zu unterbinden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Um die Bedeutung des Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**5**) bei der Wundverschlussreaktion von *Caulerpa taxifolia* aufzuklären, wurde erfolgreich ein 1,4-Bisenoylacetat synthetisiert, welches eine Azidgruppe trägt. Mittels „Click“-Reaktion ließ sich in dieses Molekül eine fluorophore Gruppe einführen. Hierdurch war eine Lokalisation dieser Verbindung und sämtlicher Reaktionsprodukte mit Fluoreszenzmikroskopie jederzeit möglich. Die Verbindung konnte in *in-vivo*-Versuchen mit *Caulerpa taxifolia* eingesetzt werden.

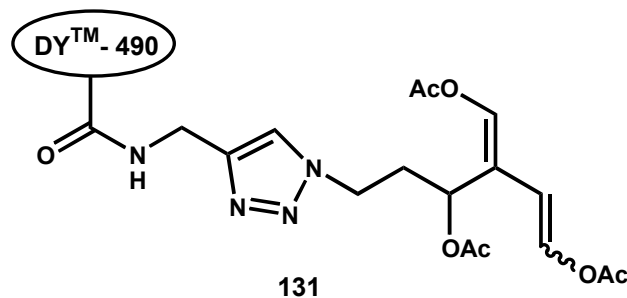


Abbildung 4.1.1: Struktur der fluoreszenten Sonde **131**

- Hierbei konnte bestätigt werden, dass **131** wie der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**5**) reagiert und von der verwundeten Alge deacetyliert wird. Die Tatsache, dass das 1Z-Isomer des Bisenoylacetats deacetyliert wurde, lässt auf eine Esterase mit einer gewissen Substrattoleranz schließen.
- Durch SDS-PAGE-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Bisenoylacetat an der verwundungsinduzierten Proteinquervernetzung teilnimmt und Bestandteil des entstehenden Protein-Biopolymers wird. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der aus Caulerpenin (**5**) gebildete Dialdehyd Oxytoxin 2 (**13**) alle notwendigen Struktureigenschaften für eine Proteinquervernetzung hat.
- In mikroskopischen Studien konnte unter Verwendung des Bisenoylacetats **131** und eines fluoreszentmarkierten Modellproteins nachgewiesen werden, dass beide Komponenten colokalisiert im Wundverschluss auftreten. Die verwundete Region wird daher durch die von Caulerpenin (**5**) medierte Bildung des unlöslichen festen Proteinbiopolymers versiegelt. Die Aufnahmen sprechen dafür, dass die Algenesterase und Caulerpenin (**5**) vor der Verwundung in Vakuole und Cytosol durch Kompartimentierung getrennt vorliegen.

Da 1,4-Bisenoylacetate auch in anderen siphonalen Grünalgen nachgewiesen werden konnten,^[108, 136, 137] stellt dieser Mechanismus möglicherweise ein universelles Prinzip zur Wundversiegelung dieser Organismen dar. Durch Wiederholung der durchgeführten *in-vivo*-Versuche mit anderen Algenarten könnte diese Vermutung bestätigt werden.

Mit Hilfe von Bioassays konnte gezeigt werden, dass *C. taxifolia* diesen Mechanismus auch zur Abwehr von Fraßfeinden nutzt. Die Quervernetzung der Algenproteine als Folge von Gewebeverletzungen führt zur Verringerung der Qualität der Alge als Futterquelle, da die im Biopolymer gebundenen Proteine von Herbivoren nicht genutzt werden können.

Das fluoreszent markierte 1,4-Bisenoylacetat **131** wurde in einer Reihe von *in-vitro*-Versuchen eingesetzt, um das Potential derartiger Verbindungen für die kovalente Modifikation von Proteinen zu testen.

- Alle getesteten Esterasen und Lipasen sind in der Lage 1,4-Bisenoylacetate durch Deacetylierung in reaktive Dialdehyde umzuwandeln. Diese Reaktionen laufen nach einem definierten Reaktionsmechanismus ab.
- Eine Deacetylierung kann auch durch Einwirkung von Basen oder Säuren stattfinden, jedoch sind die dabei entstehenden Verbindungen unter diesen Reaktionsbedingungen nicht ausreichend stabil, um gezielte weitere Reaktionen eingehen zu können.
- Der Einsatz von **131** erlaubt zu zeigen, dass Ovalbumin nach Behandlung mit Caulerpenin (**5**) und Schweineleberesterase ein quervernetztes Polymer bildet. Esterasen und Bisenoylacetate sind somit hinreichend zur Biopolymerbildung.
- In Gegenwart einer hohen Konzentration von Ovalbumin konnte mittels der Kombination aus Caulerpenin (**5**) und Schweineleberesterase eine Quervernetzung dieses Proteins erreicht werden. Die Esterase wird dabei selbst vollständig in das Biopolymer eingebaut.
- Das fluoreszent markierte 1,4-Bisenoylacetat reagierte in mikromolaren Konzentrationen selektiv mit aktiven Esterasen in einem Proteingemisch. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse der entstehenden Addukte sprechen für eine kovalente Bindung zwischen den beiden Komponenten. Es erfolgt keine Addition an denaturierte Esterasen, aktive Lipasen werden ebenfalls nicht markiert. Somit steht ein selektives Reagenz zur Esterasemarkierung zur Verfügung.

Um die entstehenden markierten Proteine und Enzyme genauer strukturell aufzuklären, könnten 1,4-Bisenoylacetate eingesetzt werden, welche statt eines Fluorophors gut ionisierbare Gruppen tragen und daher eine Analyse mittels MALDI-ToF erleichtert wird. Immobilisierte Bisenoylacetate könnten beispielsweise zur selektiven Anreicherung aktiver Esterasen eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit verwendete Synthesevariante erlaubt einen einfachen Zugang zu einer Vielzahl von 1,4-Bisenoylacetaten mit unterschiedlichen Funktionen.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
ANL	Lipase aus <i>Aspergillus niger</i> (<i>A. niger</i> lipase)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asparagin
bs	breites Singulett
BPI	Basispeakintensität (base peak intensity)
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
BSE	Esterase aus <i>Bazillus stearotherophilus</i> (<i>B. stearotherophilus</i> esterase)
CAL	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> (<i>C. antarctica</i> lipase)
Caul. intakt	künstliches Futter auf Basis intakter <i>Caulerpa taxifolia</i>
Caul. verw.	künstliches Futter auf Basis mechanisch verwundeter <i>Caulerpa taxifolia</i>
CLE	Esterase aus <i>Candida lipolytica</i> (<i>C. lipolytica</i> esterase)
Cyn.	Caulerpenin-haltiges Futter aus <i>Ulva</i> spp.
Cys	Cystein
d	Dublett
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett eines Dubletts
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DHP	3,4-Dihydro-2H-pyran
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
dt	Dublett eines Tripletts
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoßionisierung
ESI	Elektronensprayionisierung
eV	Elektronenvolt
Gly	Glycin
GC	Gaschromatographie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
Hz	Hertz

kDa	Kilo-Dalton
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
Leu	Leucin
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
Lys	Lysin
m	Multipllett
M	molar
MALDI	Matrixassistierte-Laser-Desorptions-Ionisation
MeOH	Methanol
mM	millimolar (mmol/l)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
nM	nanomolar
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDA	Photodiodenarray
PLE	Esterase aus Schweineleber (porcine liver esterase)
PPL	Lipase aus Schweinepankreas (porcine pancreas lipase)
ppm	Teile pro Million (parts per million)
q	Quartett
Rel.	relativ(e)
RNL	Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i> (<i>R. niveus</i> lipase)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RT	Raumtemperatur
rt	Retentionszeit (retention time)
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STD	Standardabweichung
t	Tripllett
td	Tripllett eines Dubletts
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran(yl)
TIC	Anzeige sämtlicher Ionen in MS-Chromatogrammen (total ion count)

TMDSO	Tetramethyldisilan
ToF	Flugzeit (time of flight)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (ultra performance liquid Chromatography)
UV	Ultraviolett
Val	Valin
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbares Licht

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Geräte

6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem 200 MHz bzw. 400 MHz NMR-Spektrometer von Bruker aufgenommen.

Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm, die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu TMS bzw. dem verwendeten Lösungsmittel angegeben.

Lösungsmittel	δ-Werte $^1\text{H-NMR}$	δ-Werte $^{13}\text{C-NMR}$
CDCl_3	7,24	77,0
$[\text{}^2\text{H}_4]\text{-MeOH}$	3,35	49,3
D_2O	4,66	-
TMS	0	0

6.1.2 Chromatographische Trenn- und Analysemethoden

6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die EI-Spektren wurden bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV auf einem Finnigan MAT Magnum aufgenommen.

GC-Säule: „JW Scientific D-5MS“ 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm Filmdicke

Trägergas: Helium

Säulenvordruck: 130 kPa

Ofenprogramm: 50 °C (2 min), 15 °C/min 280 °C (2 min)

6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Für die Messungen wurde ein Waters Acquity UPLC/MS-System mit einem 2996 PDA Detektor und Micromass®Q-ToF micro ESI-TOF-Massenspektrometer verwendet.

LC-Säule: BEH C₁₈ Säule (2,1 x 50 mm), Partikelgröße 1,7 µm (Waters)

Eluenten: Acetonitril, ULC/MS-grade von Biosolv mit 0,1 % Ameisensäure (v/v)

Wasser, ULC/MS-grade von Biosolv mit 0,1 % Ameisensäure (v/v)

Flussrate: 0,6 ml/min

Gradient:	Zeit in min	% Wasser	% Acetonitril
	0	90	10
	0,2	90	10
	3,0	0	100
	4,0	0	100
	4,5	90	10
	5 (Ende)	90	10

ESI-Parameter:

Capillary Voltage:	3000 V (positiv Modus) 2700 V (negativ Modus)
Sample Cone:	30 V
Source Temperature:	120 °C
Desolvation Temperature:	300 °C
Cone Gas Flow:	35 l/h
Desolvation Gas Flow:	600 l/h
Collision Energy:	5 V

6.1.2.3 präparative Flüssigkeitschromatographie (prep. HPLC)

Die Trennungen wurden mit Hilfe eines LC-8A Flüssigchromatographen von Shimadzu durchgeführt, unter der Verwendung eines SPD-10AV UV-Vis Detektors.

Säule: LiChro CART[®] 250-10 Purospher[®] RP-18 endcapped (Partikelgröße 5 µm)

Eluenten: Acetonitril, Optigrade mit 0,1 % Ameisensäure (v/v)
Wasser, quartzdestilliert mit 0,1 % Ameisensäure (v/v)

Flussrate: 4 ml/min

Gradient:	Zeit in min	% Wasser	% Acetonitril
	0	90	10
	0,5	90	10
	10	50	50
	15	0	100
	20	0	100
	21	70	30
	25(Ende)	90	10

6.1.2.4 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 (F254, 0,2 mm (Merck)) verwendet. Die Detektion erfolgte durch UV-Anregung (254 nm und 366 nm) und/oder Anfärbung durch die Behandlung im Tauchbad mit basischer Kaliumpermanganat-Lösung bzw. Molybdato-phosphorsäure/Cer(IV)sulfat und anschließendem Erhitzen.

Herstellung des basischen Kaliumpermanganat-Tauchbades: 3 g Kaliumpermanganat und 20 g Kaliumcarbonat wurden in 300 ml Wasser gelöst und mit 5 ml 5 %iger Natriumhydroxidlösung versetzt.

Herstellung des Molybdato-phosphorsäure/Cer(IV)sulfat-Tauchbades: 2,5 g Molybdato-phosphorsäure und 1 g Cer(IV)sulfat wurden in 65 ml Wasser gelöst und es wurden vorsichtig unter Rühren 6 ml konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise zugefügt.

6.1.2.5 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Merck 0,04 – 0,063 mm) verwendet. Als Eluenten dienten Diethylether, Petrolether (Siedebereich 60 – 70°C) und Ethylacetat, welche vor Benutzung vakuumdestilliert wurden.

6.1.3 Puffer für Enzymreaktionen

6.1.3.1 Herstellung des Hydrogencarbonatpuffers (pH = 8,3)

Für eine 10-fache Stammlösung wurden 21 g Natriumhydrogencarbonat und 1 g Natriumazid in 400 ml dest. Wasser gelöst und mit verd. Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt.

Vor der Anwendung wurde diese Lösung mit dest. Wasser 1:10 verdünnt.

6.1.3.2 Herstellung des Phosphatpuffers bzw. Elutionspuffers (pH = 7,4)

2,19 g Natriumdihydrogenphosphat, 14,97 g Dinatriumhydrogenphosphat, 5,8 g Natriumchlorid und 0,32 g Natriumazid wurden in 1 l dest Wasser gelöst. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert und unverdünnt eingesetzt.

6.1.4 Gelelektrophorese

Die SDS-Gele wurden in einer Gelgießapparatur von BIO-RAD vorbereitet und die Elektrophorese in einem Mini-PROTEAN® Tetra System Vierfachgel Electrophoresesystem von BIO-RAD durchgeführt.

6.1.4.1 Herstellung eines 12 % Acrylamidgels

Für das Trenngel wurden 4,5 ml Rotiphorese 40-Lösung (Roth) mit 3,8 ml Trenngelpuffer (1,5 M TRIS pH = 8,8), 6,4 ml destilliertem Wasser und 0,15 ml 10 %iger SDS-Lösung gemischt. Unter Rühren wurden 6 µl reines TEMED und 0,15 ml 10 %ige APS-Lösung zugegeben. Mit dieser Lösung wurde die Kammer der Gelgießapparatur bis ca. 2 cm unterhalb der Plattenobergrenze gefüllt und mit *iso*-Propanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (Dauer ca. 20 min) wurde das *iso*-Propanol abgegossen und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Verbliebenes Wasser zwischen den Platten wurde mit einem Zellstofftuch entfernt.

Für die Herstellung des Sammelgels wurden 3,6 ml destilliertes Wasser mit 0,62 ml Rotiphorese 40-Lösung und 0,63 ml Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS pH = 6,8) vermischt. Nach Zugabe von 5 µl TEMED und 50 µl 10 %ige APS-Lösung wurde das Gemisch auf das Trenngel geschichtet und der Kamm für die Ladetaschen eingesetzt. Nach der

Polymerisation wurden die Gele mitsamt den Glasplatten aus der Apparatur genommen, in feuchte Zellstofftücher gewickelt und bis zur ihrer Verwendung maximal 1 Woche bei ca. 4 °C in Plastiktüten aufbewahrt.

6.1.4.2 Herstellung des Ladepuffers

In einem 15 ml Falcontube wurden 3 ml Glycerin, 1 g SDS, 3 mg Bromphenolblau und 3,75 ml Sammelgelpuffer vermischt und mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Der Ladepuffer wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt und unverdünnt verwendet.

6.1.4.3 Herstellung des Elektrophoresepuffers

Für eine 5-fache Stammlösung wurden 15,1 g TRIS (Roth) und 94 g Glycerin in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 50 ml 10 %iger SDS-Lösung (m/v) wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Vor der Anwendung wurde diese Lösung 1:5 verdünnt.

6.1.4.4 Proteinstandard

Als Proteinstandard diente eine PageRuler™ Unstained Protein Ladder von Fermentas mit Banden bei folgenden Massen (in kDa): 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 (die Bande bei 50 kDa ist intensiver und dient als Referenz). Diese Lösung konnte direkt und unverdünnt eingesetzt werden.

6.1.4.5 Entwicklung der Gele

Bei Experimenten mit fluoreszenten Proben wurde das Gel vor dem Anfärben auf einem UV-Tisch (UV-Star Biometer von Biometra) bei 312 nm bzw. bei 480 nm (VisiBlue-converter plate) belichtet und abfotografiert.

Zum Anfärben wurden die Gele dreimal für je 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit RAPID Stain™ von G-Bioscience unter leichtem Schwenken für eine Stunde angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Gel eingescannt.

6.1.5 Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Für die LSM-Aufnahmen wurde ein LSM 510 META von Zeiss mit folgenden Parametern verwendet:

Objektiv:	EC Plan-Neofluar 10x 0.30/M27
Anregung:	488 nm (100 %)
Pinhole:	150 – 200 μm
Beam Splitters:	MBS: NT 80/20 DBS2: NFT 545
Emissionsfilter:	Channel 1: 500-530 nm Channel 2: 565-615 nm

Die Stack-Size wurde an die Probengröße individuell angepasst, so dass 10 bis 20 Schnitte aufgenommen werden konnten.

6.2 Kulturbedingungen der Versuchsorganismen

6.2.1 Herstellung von künstlichem Seewasser

6.2.1.1 Herstellung von künstlichem Seewasser mit Instant Ocean

Für 30 l Seewasser wurden 825 g Instant Ocean (Aquarium Systems) zu 30 l entionisiertem Wasser gegeben und über Nacht gerührt, um eine vollständige Lösung und den Temperaturangleich zu gewährleisten. Nach Zugabe von 6,6 ml der Lösung 3 und 17,7 ml der Lösung 4 (siehe 6.2.1.2.) war das Medium einsatzbereit.

6.2.1.2 Herstellung von künstlichem Seewassermedium nach Maier und Calenberg^[138]

Für 5 l Seewasser wurden 120 g NaCl, 40 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 3,75 g KCl, 7,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 6 g HEPES und 200 mg NaHCO_3 in ein 5 l Becherglas eingewogen und in ca. 4,5 l quartzdestilliertem Wasser gelöst. Dazu wurden folgende Lösungen gegeben:

Lösung 3	1,1 ml	K_2HPO_4	1,79 g/200 ml
Lösung 4	2,45 ml	$NaNO_3$	17,9 g/200 ml
Lösung 11	50 ml	$Na_2SiO_3 \times 9 H_2O$ mit HCl auf pH = 3 eingestellt	3,5 g/500 ml
Lösung 16	5 ml	Na_2 -Glycerophosphat x 5 H_2O	12 g/500 ml
Lösung 17	5 ml	$AlCl_3 \times 6 H_2O$ KI RbCl LiCl $SrCl \times 6 H_2O$ KBr vor dem Auffüllen auf pH = 10-12 eingestellt (mit 10 M NaOH)	60,5 mg/500 ml 83 mg/500 ml 90 mg/500 ml 530 mg/500 ml 13,35 mg/500 ml 29,76 mg/500 ml
Lösung 19	5 ml	Thiamin-HCl Biotin (Vitamin H) Cyanocobalmin (Vitamin B12) Nicotinsäureamid	50 mg/500 ml 0,5 mg/500 ml 0,5 mg/500 ml 0,1 mg/500 ml

Anschließend wurde mit quartzdestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt und bis zum vollständigen Lösen der Salze gerührt. Danach wurde der pH Wert mit 10 M NaOH auf 7,8 eingestellt, das Seewasser in autoklavierbare 1-Liter-Flaschen überführt und 20 Minuten bei 121°C (mit Medienfühler) autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde 1 ml der separat autoklavierten Lösung 18 zugegeben.

Lösung 18	1 ml	Na_2EDTA $(NH_4)Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O$ H_3BO_3 $MnCl_2 \times 4 H_2O$ $ZnCl_2$ $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ $CuSO_4 \times 5 H_2O$ $CoCl_2 \times 6 H_2O$ $NaVO_3$ $Na_2SeO_3 \times 5 H_2O$	18,61 g/ 500 ml 4,9 g/ 500 ml 3,09 g/ 500 ml 0,99 g/ 500 ml 0,68 g/ 500 ml 0,24 g/ 500 ml 25 mg/ 500 ml 12 mg/ 500 ml 6 mg/ 500 ml 1,3 mg/ 500 ml
-----------	------	---	--

Jede dieser Lösungen wurde mit der angegebenen Menge quartzdestilliertem Wasser angesetzt.

6.2.2 Kultivierung von *C. taxifolia*

C. taxifolia wurde in Villefranche-sur-mer (Hafen, 5 m Tiefe) gesammelt und per Express nach Jena geschickt. Kulturen aus Aquarienhaltung wurden von Aqua Marine Senior, Berlin, KN Aquaristik, Nordhorn oder Mrutzek Meeresaquaristik, Ritterhude/Platjenwerbe bezogen. Die Algen wurden mit künstlichem Seewasser gewaschen und in belüftete Aquarien überführt, die je nach Größe 10-15 l künstliches Seewasser enthielten. Die Aquarien wurden nahe an der Fensterbank bei Raumtemperatur (20 - 25°C) unter natürlichem Licht gehalten. Ein- bis zweimal im Monat wurden die Algen in frisches Medium umgesetzt. Dabei wurde sie mit sauberem Seewasser gewaschen und vorsichtig von äußeren Kontaminationen gesäubert, bevor sie in ein sauberes Aquarium mit temperiertem Seewasser (Instant Ocean) überführt wurden.

6.2.3 Haltung der Flohkrebse

Die Flohkrebse *Ampithoe longimana* und *Paracerceis caudata* wurden vom Institute of Marine Science in Morehead City, North Carolina, USA gesammelt, per Luftfracht verschickt und im Labor in künstliches Seewasser bei ca. 20 °C überführt. Sie wurden bei einer Photoperiode von 14 h Licht / 10 h Dunkelheit gehalten und jeden zweiten Tag in ein Aquarium mit frischem Seewasser überführt. Als Futter diente auf Agar basierendes Kontrollfutter hergestellt aus *Ulva* spp. (siehe Abschnitt 6.4.3).

6.3 Isolierung von Caulerpenin (5) aus *C. taxifolia*

Frisches Algenmaterial wurde zunächst mit Zellstoff abgetupft und gewogen. Das Algenmaterial wurde nun mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend fein gemörsert. Bei kleinen Mengen Alge (≤ 500 g) wurden vor dem Gefrieren die Algenenzyme deaktiviert, indem die Algen für 3 min gekocht wurden. Dies sollte einen Abbau des Caulerpenins (5) bei etwaigem Antauen des Materials verhindern und so bessere Ausbeuten ermöglichen. Wurden größere Mengen extrahiert, wurde auf das Kochen verzichtet. Im noch gefrorenem Zustand wurden die Fragmente in Ethylacetat (ca. 2 ml pro g Alge) suspendiert und unter Rühren mindestens 1 Stunde bzw. bis zur vollständigen Erwärmung auf Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wurde das feste Algenmaterial durch Filtration über Kieselgel abgetrennt, wobei das Kieselgel mehrmals mit Ethylacetat nachgespült wurde (bei kleinem Ansatz erfolgte die Abtrennung mittels Zentrifugation (2 min bei 5200 g) und erlaubte so einen erneuten Extraktionsvorgang). Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Entfernung von Fettsäuren mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung (2 x 1ml pro ml

Ethylacetat) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der so erhaltene Rohextrakt säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat 7/3 an Silicagel aufgereinigt. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels wurde das so erhaltene Rohprodukt anschließend erneut an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (3/1, v/v) säulenchromatographisch aufgetrennt, um die noch enthaltene Sterole zu entfernen. Nach der Elution der Sterole erfolgte die weitere Elution mit Petrolether/Diethylether 5/5, um reines Caulerpenin (**5**) zu gewinnen.

6.4 Bioassays

6.4.1 Herstellung von künstlichem Futter auf Agarbasis

6.4.1.1 Reines Kontrollfutter aus *Ulva* spp. („Kontrolle“)

In einem Mörser wurden frische *Ulva* spp. mit flüssigem Stickstoff übergossen, sehr fein gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Von dem so erhaltenen feinen Pulver wurden 200 mg in 1,6 ml Wasser suspendiert und in ein 15 ml Falcontube gefüllt. Bei den Experimenten mit Caulerpenin (**5**) (siehe Abschnitt 6.4.2) wurde bei diesem Schritt 250 µl reines Methanol hinzugefügt. In einem Becherglas wurden 0,72 g Agar-Agar (Fluka) eingewogen, mit 20 ml Wasser versetzt und für 30 s in der Mikrowelle erhitzt. 1,8 ml der nun klaren Lösung wurden zügig in das Falcontube mit der Algensuspension gegeben. Dieses wurde sofort verschlossen, geschüttelt (Vortexer) und mit der Öffnung nach unten gestellt. Nach dem Erkalten wurden das Falcontube geöffnet und der Agarzylinder in ca. 3 mm breite Scheiben geschnitten und diese geviertelt.

6.4.1.2 Caulerpenin-haltiges Futter aus *Ulva* spp. („Cyn.“)

Das Futter wurde nach demselben Verfahren wie das Kontrollfutter (siehe Abschnitt 6.4.1.1) hergestellt, allerdings wurden vor der Zugabe der Agarlösung 250 µl einer 100 mg/ml Lösung von Caulerpenin (**5**) in Methanol zugegeben, so dass die Konzentration im fertigen Futter 7 mg/ml betrug.

6.4.1.3 Futter aus *Ulva* spp. mit BSA bzw. Lysin und Cystein („Kontrolle + BSA“ bzw. „Kontrolle + Lys + Cys“)

Es wurde analog zu der Herstellung des reinen Kontrollfutters verfahren (siehe Abschnitt 6.4.1.1) allerdings wurden vor der Agarzugabe 1,8 mg BSA bzw. 108 µg Lysin und 108 µg Cystein zur Algensuspension gegeben.

6.4.1.4 Futter basierend auf intakter *C. taxifolia* („Caul. intakt“)

Frische *C. taxifolia* wurde für 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt, anschließend mit flüssigem Stickstoff übergossen, sehr fein gemörsert und schließlich gefriergetrocknet. Etwa 3 mg dieses Pulvers wurden mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und die Lösung per GC/MS analysiert, um nachzuweisen, dass Caulerpenin (**5**) nicht abgebaut wurde. 200 mg des gefriergetrockneten Pulvers wurden für die Herstellung des Futters verwendet, wobei analog zu der Herstellung des Kontrollfutters verfahren wurde (siehe Abschnitt 6.4.1.1).

6.4.1.5 Futter basierend auf verwundeter *C. taxifolia* („Caul. verw.“)

Ca. 5 g frische *C. taxifolia* wurde für 5 min gemörsert, um die Verwundung zu simulieren, anschließend mit flüssigem Stickstoff übergossen, gemörsert und gefriergetrocknet. Etwa 3 mg dieses Pulvers wurden mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und der Extrakt per GC/MS-Messung analysiert, um nachzuweisen, dass Caulerpenin (**5**) vollständig abgebaut wurde. 200 mg des gefriergetrockneten Pulvers wurden für die Herstellung des Futters verwendet, wobei analog zu der Herstellung des Kontrollfutters verfahren wurde (siehe 6.4.1.1).

6.4.1.6 Futter basierend auf verwundeter *C. taxifolia* mit BSA bzw. Lysin und Cystein („Caul. verw. + BSA“ bzw. „Caul. verw. + Lys + Cys“)

Es wurde wie bei der Herstellung des Futters basierend auf verwundeter *C. taxifolia* (siehe Abschnitt 6.4.1.5) verfahren allerdings wurden vor der Agarzugabe 1,8 mg BSA bzw. 108 µg Lysin und 108 µg Cystein zur Algensuspension gegeben.

6.4.2 Allgemeiner Versuchsaufbau der Choice-Assays

In einen Eiswürfelbehälter mit 14 Kammern wurde künstliches Seewasser in jede Kammer bis zu einer Höhe von 2 cm gegeben. In jede dieser Kammern wurde ein Flohkrebs der und je ein Stück von zwei agarbasierten Futtersorten z. B. „Kontrolle“ und „Caul. Intakt“ gegeben. Anschließend wurde für 90 min im Abstand von 5 min der Aufenthaltsort der Flohkrebse (Futter A, Futter B oder keines von beiden) dokumentiert. Alle Experimente wurden mit beiden Flohkrebsarten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben.^[126]

6.4.3 Durchgeführte Choice Assays

Ex Nr.	Futter A	Futter B	Anzahl der Versuchstiere	
			<i>Ampithoe longimana</i>	<i>Paracereis caudata</i>
1	„Kontrolle“ mit Methanol	„Cyn.“	14	14
2	„Kontrolle“	„Caul. intakt“	14	14
3	„Caul. intakt“	„Caul. verw.“	28	14
4	„Caul. verw. + BSA“	„Caul. verw.“	14	28
5	„Kontrolle“	„Kontrolle + BSA“	14	14
6	„Caul. intakt“	„Caul. verw. + BSA“	14	14
7	„Caul. verw. + Lys + Cys“	„Caul. verw.“	14	14
8	„Kontrolle“	„Kontrolle + BSA“	14	14

Tabelle 6.4.1: durchgeführte Choice-Assays

6.5 *In-vivo*-Experimente mit DYTM-490-Bisenoylacetat (131)

6.5.1 *In-vivo*-Reaktion von DYTM-490-Propargylamid 130 und DYTM-490-Bisenoylacetat (131) in Gegenwart verwundeter *C. taxifolia*

1,3 g frische *C. taxifolia* wurde mit Zellstoff abgetupft und in einen Mörser ($\varnothing = 5$ cm) gegeben. Nach Zugabe von 1 ml einer wässrigen Lösung von DYTM-490-Bisenoylacetat (131) (0,1 mg/ml) wurde die Alge für 15 s intensiv gemörsert. Unmittelbar danach wurden 100 μ l entnommen, in 500 μ l Methanol suspendiert, zentrifugiert und per UPLC/ESI-MS analysiert

(entspricht 0 min nach Verwundung). Weitere Proben wurden nach 1, 2 und 4 Minuten entnommen und analog für die Analyse präpariert.

In einem separaten Mörser wurden 1,1 g *C. taxifolia* in Gegenwart von 900 μ l DYTM-490-Propargylamid (130) (0,1 mg/ml) für 15 s gemörsert. Die Probenahme und Aufarbeitung erfolgte in Analogie zum ersten Versuch.

6.5.2 Proteinanalyse von *C. taxifolia* und DYTM-490-Bisenoylacetat (131) mittels SDS-PAGE

6.5.2.1 Proteinextraktion aus intakter Alge

Etwa 200 mg frische *C. taxifolia* wurden für 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 5 min gemörsert. Nach Abtrennen des festen Algenmaterials durch Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und ausgewogen. Pro Milligramm Algenüberstand wurden 1 μ l Ladepuffer, 0,3 μ l einer 0,2 molaren Lösung DTT sowie 0,7 μ l Wasser zugefügt, geschüttelt (Vortexer) und für 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt.

6.5.2.2 Proteinextraktion aus intakter Alge in Gegenwart von DYTM-490-Bisenoylacetat (131)

Es wurde analog zu der Vorbereitung der Proteinextrakte aus intakter Alge verfahren (siehe Abschnitt 6.5.2.1) allerdings wurde vor dem Mörsern eine 1 mg/ml wässrige Lösung des DYTM-490-Bisenoylacetats (131) zugesetzt (0,1 μ l pro mg frische Alge).

6.5.2.3 Proteinextraktion aus verwundeter Alge

Es wurde genauso verfahren wie, bei der Vorbereitung der Proteinextrakte aus intakter Alge (siehe Abschnitt 6.5.2.1) allerdings wurde die Alge vor dem Mörsern nicht im siedenden Wasserbad erhitzt.

6.5.2.4 Proteinextraktion aus verwundeter Alge in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat (131)

Es wurde analog zu der Vorbereitung der Proteinextrakte aus intakter Alge verfahren (siehe Abschnitt 6.5.2.1), allerdings wurde die Alge nicht im siedenden Wasserbad erhitzt und es wurde vor dem Mörsern eine 1 mg/ml wässrige Lösung von DY™-490-Bisenoylacetat **131** zugesetzt (0,1 µl pro mg frische Alge), so dass die Verwundung in Gegenwart von **131** stattfinden konnte.

Von jedem Extrakt wurden je 15 µl in die Ladetaschen des Gels aufgetragen sowie in eine Ladetasche 15 µl des Proteinstandards. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V durchgeführt, anschließend bei 120 V.

6.5.3 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat (131) und DY™-481XL-markierten Histon

6.5.3.1 Markieren von Histon (H1) mit DY™-481XL

1 mg ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mmol) Histon (H1, 21,23 kDa) aus Kalbsthymus wurde in 200 µl Hydrogencarbonatpuffer (siehe Abschnitt 6.1.3.1). gelöst und mit 12 µl ($2,9 \cdot 10^{-5}$ mmol) einer Lösung des fluoreszenten Markers (1,25 mg DY™-481XL (Dyomics) in 72 µl DMF) versetzt und für 2 h geschüttelt (Vortexer). Anschließend wurde das Protein mittels Gelfiltration gereinigt (1,8 g Sephadex-G25 medium + 9 ml Elutionspuffer/Phosphatpuffer (6.1.3.2)) und mithilfe einer Speed Vac-Apparatur von ca. 700 µl auf 500 µL eingeeengt. Von einer 10-fach in Elutionspuffer verdünnten Lösung wurde die Absorbanz bei 280 nm und 515 nm gemessen (gegen den reinen Puffer), um die Konzentration sowie den Grad der Markierung zu bestimmen. Für Histon H1 wurde der molare Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 280$ nm nach der Vorschrift von Gill und von Hippel^[139] ermittelt und betrug $\epsilon_{280} = 1280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Histon H1 enthält kein Cystein und Tryptophan und lediglich einen Tyrosinrest). Der Extinktionskoeffizient von DY™-481XL bei $\lambda = 515$ nm betrug $\epsilon_{515} = 50000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Angabe von Dyomics GmbH). Es wurde eine Küvette mit 0,5 cm Schichtdicke verwendet.

Histon:	totale Absorbanz bei 280 nm:	0,031
	davon Absorbanz von DY™-481XL:	0,026 (ermittelt in Relation zur Absorbanz bei 515 nm)
	Absorbanz des Histons:	0,005
	Konzentration des Histons in der verdünnten Lösung :	7,8 µmol/l
DY-481XL:	Absorbanz bei 515 nm:	0,199
	Konzentration von DY™-481XL:	7,96 µmol/l

Daraus ergibt sich ein Markierungsgrad von etwa 1. Die mittlere Molmasse des markierten Histons beträgt nun etwa 22 kDa. Die gesamte Menge des markierten Histons beträgt 0,85 mg (1,7 mg/ml). Ausbeute: 85 %

6.5.3.2 SDS-PAGE der in Gegenwart der fluoreszenten Verbindungen extrahierten Algenproteine

Proteinextraktion aus intakter/verwundeter Alge (in Gegenwart von DY™-490-Bisenoylacetat **131** und DY™-481XL-markierten Histons):

Es wurde analog zu der Vorbereitung der Proteinextrakte aus intakter Alge (siehe Abschnitt 6.5.2.1) und verwundeter Alge (siehe Abschnitt 6.5.2.3) verfahren allerdings wurde vor dem Mörsern eine 0,1 mg/ml wässrige Lösung von DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,125 µl pro mg frische Alge) sowie eine 1,6 mg/ml wässrige Lösung des DY™-481XL-markierten Histons (0,125 µl pro mg frische Alge) zugefügt, so dass die Verwundung in Gegenwart von **131** und Histon stattfinden konnte. Nach Abtrennen des festen Algenmaterials durch Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und ausgewogen. Pro Milligramm Algenüberstand wurden 1 µl Ladepuffer, 0,3 µl einer 0,2 molaren Lösung DTT sowie 0,7 µl Wasser zugefügt, geschüttelt (Vortexer) und für 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Von diesem Extrakt wurden 15 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V durchgeführt, anschließend bei 120 V.

6.5.4 Untersuchungen des Wundverschlusses von *C. taxifolia* mit Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Frische, gesunde Exemplare von *C. taxifolia* wurde mit einem Skalpell am Stolon durchtrennt und beide Teilstücke in Seewasser, bzw. in Lösungen der fluoreszenten Verbindungen überführt und dort für 14 h gehalten. Anschließend wurden sie mit frischem Seewasser gewaschen, in frisches Seewasser überführt und dort für weitere 24 gehalten, bevor sie per LSM vermessen wurden. Folgende Lösungen wurden verwendet. Für das Kontrollexperiment mit **130,131** und Histon wurde ein Individuum verwendet dessen Teilstücke in jeweils eine der beiden Lösungen gehalten wurden.

Nr.:	für die Behandlung verwendete Lösung (14 h)
1	reines Seewasser
2	0,02 mg/ml 131 in Seewasser
3	0,17 mg/ml fluoreszentes Histon in Seewasser
4	131 (0,02 mg/ml) und fluoreszentes Histon (0,17 mg/ml) in Seewasser
5a	131 (0,02 mg/ml) und fluoreszentes Histon (0,17 mg/ml) in Seewasser
5b	130 (0,02 mg/ml) und fluoreszentes Histon (0,17 mg/ml) in Seewasser

Tabelle 6.5.1: Verwendete Lösungen für die Algenpreparation für die LSM-Untersuchungen

6.6 *In-vitro*-Experimente mit DYTM-490-Bisenoylacetat (131)

6.6.1 Deacetylierung von DYTM-490-Bisenoylacetat (131)

6.6.1.1 Enzymatische Deacetylierung

In einem 1,5 ml Eppendorf-Vial wurden 30 μ l einer wässrigen Lösung von DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,1 mg/ml) mit 1 μ l einer der unten aufgeführten Enzymlösungen versetzt und für 10 min geschüttelt (Vortexer). Anschließend wurde mit 30 μ l Methanol verdünnt und zentrifugiert (3 min 10000g), bevor 10 μ l des Überstandes Lösung per UPLC/ESI-MS analysiert wurden.

Enzymlösungen:

6 mg/ml in Hydrogencarbonatpuffer (siehe Abschnitt 6.1.3.1) von folgenden Enzymen:

- 1) Schweineleberesterase (Sigma-Aldrich, 165 U/mg)
- 2) Esterase aus *Candida lipolytica* (Fluka, 0,0983 U/mg)
- 3) Esterase aus *Bazillus stearothermophilus* (Sigma-Aldrich, 0,47 U/mg)
- 4) Lipase aus *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich, 1,16 U/mg)
- 5) Lipase aus *Rhizopus niveus* (Fluka, 2,6 U/mg)
- 6) Schweinepankreaslipase (Sigma-Aldrich, 22,7 U/mg)
- 7) Lipase aus *Aspergillus niger* (Fluka, 4,0 U/mg)

6.6.1.2 Deacetylierung bei pH = 12

In einem 1,5 Eppendorf-Vial wurden 30 μ l einer wässrigen Lösung von DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,1 mg/ml) mit 1 μ l 0,5 M NaOH versetzt und für 1 min geschüttelt (Vortexer). Anschließend wurde mit 1 μ l 0,5 M HCl neutralisiert und mit 30 μ l Methanol verdünnt, bevor 10 μ l dieser Lösung per UPLC/ESI-MS analysiert wurden.

6.6.1.4 Deacetylierung bei pH = 2

In einem Eppendorf-Vial wurden 30 μ l einer wässrigen Lösung von DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,1 mg/ml) mit 1 μ l 0,5 M HCl versetzt und für 4 min bei 80°C erhitzt. Anschließend wurde mit 1 μ l 0,5 M NaOH neutralisiert und mit 30 μ l Methanol verdünnt, bevor 10 μ l dieser Lösung per UPLC/ESI-MS analysiert wurden.

6.6.2 Proteinquervernetzung mit Caulerpenin (5) und Ovalbumin

Stammlösungen:

A) Ovalbumin: 50 mg/ml Albumin aus Hühnereiweiß (Sigma-Aldrich) in Hydrogencarbonatpuffer (siehe 6.1.3.1)

B) Schweineleberesterase: 4 mg/ml Schweineleberesterase (165 U/mg, Sigma-Aldrich) in Hydrogencarbonatpuffer (siehe 6.1.3.1)

C) Caulerpenin (5): 10 mg/ml in dest. Wasser/Methanol (10 µl einer methanolischen Lösung (100 mg/ml) suspendiert in 90 µl dest. Wasser)

D) DY™-490-Bisenoylacetat (131): 0,2 mg/ml in dest. Wasser

Die Reaktionsgemische wurden in Eppendorf-Vials nach folgender Tabelle hergestellt, dabei wurde die Schweineleberesterase stets als letzte Komponente hinzugefügt.

Nr.	Ovalbumin	Schweineleber- esterase	Caulerpenin (5)	DY™-490- Bisenoylacetat (131)	Wasser
1	15 µl	-	-	-	35 µl
2	-	-	10 µl	5 µl	35 µl
3	-	10 µl	10 µl	5 µl	25 µl
4	15 µl	-	10 µl	5 µl	20 µl
5	15 µl	10 µl	-	-	25 µl
6	15 µl	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl

Tabelle 6.6.1: Eingesetzte Mengenverhältnisse bei der simulierten Proteinquervernetzung

Die Gemische wurden für 1 h leicht geschüttelt (Vortexer). Die Proben 2 und 3 wurden mit jeweils 25 µl Ladepuffer und 7,5 µl einer 0,2 M DTT-Lösung versetzt. Die restlichen Proben wurden mit 50 µl dest. Wasser verdünnt, bevor jeweils 50 µl Ladepuffer und 15 µl einer 0,2 M DTT-Lösung hinzugefügt wurden. Nach Erhitzen der Proben im Wasserbad (für 3 min) wurden 15 µl jeder Probe sowie 15 µl des Proteinstandards in jeweils eine Tasche des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V, anschließend bei 120 V durchgeführt.

6.6.3 Reaktion von DYTM-490-Bisenoylacetat (131) mit immobilisierter Schweineleberesterase

In drei 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurden je 30 mg auf Eupergit[®] immobilisierte Schweineleberesterase (Sigma Aldrich) gegeben. In das erste Gefäß wurde 1 ml dest. Wasser gegeben (Kontrolle). In das zweite Gefäß wurde eine Lösung von DYTM-490-Propargylamid (**130**) (0,05 mg/ml in Wasser) gegeben, in das dritte Gefäß eine Lösung von DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,05 mg/ml in Wasser). Alle Gefäße wurden für eine Stunde geschüttelt (Vortexer), anschließend kurz zentrifugiert und die überstehende Lösung entfernt. Danach wurde die Esterase in allen Gefäßen gewaschen, indem 1 ml dest. Wasser zugegeben, 5 min geschüttelt (Vortexer), zentrifugiert und erneut die überstehende Lösung abgenommen wurde. Dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt, bevor erneut 1 ml dest. Wasser zugegeben wurde und alle drei Eppendorfgefäße bei normaler Beleuchtung bzw. bei Belichtung mit 480 nm fotografiert wurden.

6.6.4 Reaktion von DYTM-490-Bisenoylacetat (131) mit DYTM-481XL-Histon (H1) in Gegenwart von Esterase und Analyse mittels SDS-PAGE

In sechs 1,5 ml Eppendorf-Vials (1,5 ml) wurden die folgenden Gemische hergestellt, wobei die Esterase als letzte Komponente zugegeben wurde.

	DY TM 490 - Bisenoylacetat (0,1 mg/ml in dest. Wasser)	DY TM -481-XL-Histon (1,6 mg/ml in Phosphatpuffer)	Esterase aus <i>Candida lipolytica</i> (0,0983 U/mg, Fluka) (2 mg/ml)	dest. Wasser
1	-	-	20 µl	30 µl
2	10 µl	-	-	40 µl
3	-	20 µl	-	30 µl
4	10 µl	-	20 µl	20 µl
5	10 µl	20 µl	-	20 µl
6	10 µl	20 µl	20 µl	-

Tabelle 6.6.2: eingesetzte Mengenverhältnisse bei der Reaktion von **131** mit DYTM-481XL-Histon (H1) in Gegenwart von Esterase

Anschließend wurden diese Gemische für 1 h leicht geschüttelt (Vortexer) und mit je 25 μ l Ladepuffer und 7,5 μ l einer DTT-Lösung (0,2 M in dest. Wasser) versetzt. Nach Erhitzen der Proben im Wasserbad (3 min) wurden 15 μ l jeder Probe sowie 15 μ l des Proteinstandards auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V, anschließend bei 120 V durchgeführt.

6.6.5 Reaktion von DYTM490-NHS Ester, DYTM-490-Propargylamid (130) und DYTM490-Bisenoylacetat (131) mit Ovalbumin in Gegenwart von Esterase und Analyse mittels SDS-PAGE

Ovalbuminlösung: 1 mg Ovalbumin (Sigma Aldrich) in 200 μ l dest. Wasser

CLE-Lösung: 1 mg Esterase aus *Candida lipolytica* (0,0983 U/mg, Fluka) in 100 μ l dest. Wasser

PLE-Lösung: 1 mg Esterase aus Schweineleber (165 U/mg, Sigma-Aldrich) in 100 μ l dest. Wasser

DYTM-490-NHS-Ester: 5 mg DYTM-490-NHS-Ester (Dyomics GmbH) in 100 μ l DMF

DYTM-490-Propargylamin (**130**): 0,5 mg/ml in dest. Wasser

DYTM-490-Bisenoylacetat (**131**): 0,05 mg/ml in dest. Wasser

Die Proben wurden gemäß der folgenden Tabelle hergestellt.

	Ovalbumin	CLE	PLE	DY-490- NHS-Ester	DY™-490- Propargylamin	DY™-490- Bisenoylacetat
1	10 µl	-	-	1 µl	-	-
2	10 µl	-	-	-	10 µl	-
3	10 µl	-	-	-	-	10 µl
4	10 µl	10 µl	-	1 µl	-	-
5	10 µl	10 µl	-	-	10 µl	-
6	10 µl	10 µl	-	-	-	10 µl
7	10 µl	-	10 µl	1 µl	-	-
8	10 µl	-	10 µl	-	10 µl	-
9	10 µl	-	10 µl	-	-	10 µl

Tabelle 6.6.3: Eingesetzte Mengenverhältnisse bei den Reaktion von **128**, **130** und **131** mit Ovalbumin in Gegenwart von Esterase

Anschließend wurden alle Proben mit dest. Wasser auf 50 µl aufgefüllt, für 1 h leicht geschüttelt (Vortexer), mit 25 µl Ladepuffer sowie 7,5 µl DTT (0,2 M in dest. Wasser) versetzt und für 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Von jeder Probe sowie von dem Proteinstandard wurden 15 µl auf das Gel transferiert. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V, danach bei 120 V durchgeführt.

6.6.6 Reaktion von DY™-490-Bisenoylacetat (131) mit nativen und denaturierten Esterasen und Analyse mittels SDS-PAGE

In sechs 1,5 ml Eppendorf-Vials wurden jeweils 20 µl einer wässrigen Lösung von DY™-490-Bisenoylacetat (**131**) (0,1 mg/ml) mit 20 µl folgender Enzymlösungen (in Hydrogencarbonatpuffer (siehe Abschnitt 6.1.3.1)) versetzt.

- A) Esterase aus *Candida lipolytica* (Fluka, 0,0983 U/mg, 2 mg/ml)
- B) Esterase aus *Candida lipolytica* (Fluka, 0,0983 U/mg, 2 mg/ml)
zuvor für 3 min im Wasserbad gekocht
- C) Esterase aus *Thermoanaerobium brockii* (Fluka, 4,9 U/g, 50 mg/ml)
- D) Esterase aus *Thermoanaerobium brockii* (Fluka, 4,9 U/g, 50 mg/ml)
zuvor für 3 min im Wasserbad gekocht
- E) Schweineleberesterase (Sigma-Aldrich, 165 U/mg, 4 mg/ml)
- F) Schweineleberesterase (Sigma-Aldrich, 165 U/mg, 4 mg/ml)
zuvor für 3 min Wasserbad gekocht

Alle Vials wurden für 1 h leicht geschüttelt (Vortexer) und mit dest. Wasser auf 50 μ l aufgefüllt, bevor 25 μ l Ladepuffer und 7,5 μ l DTT (0,2 M in dest. Wasser) zugefügt wurden. Nach Erhitzen der Proben für 3 min im siedenden Wasserbad wurden jeweils 15 μ l auf das Gel transferiert. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V, danach bei 120 V durchgeführt.

6.6.7 Reaktion von DYTM490-Bisenoylacetat (131) mit Lipasen und Esterasen

In sieben 1,5 ml Eppendorf-Vials wurden jeweils 20 μ l einer wässrigen Lösung von DYTM490-Bisenoylacetat (131) (0,1mg/ml) mit 20 μ l folgender Enzymlösungen in versetzt.

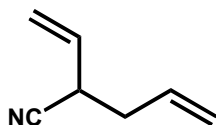
- A) Schweinepankreaslipase (Sigma-Aldrich, 22,7 U/mg, 50 mg/ml)
- B) Lipase aus *Aspergillus niger* (Fluka, 4,0 U/mg, 90 mg/ml)
- C) Lipase aus *Rhizopus niveus*(Fluka, 2,6 U/mg 120 mg/ml)
- D) Lipase aus *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich, 1,16 U/mg, 50 mg/ml)
- E) Esterase aus *Candida lipolytica* (Fluka, 0,0983 U/mg, 2 mg/ml)
- F) Schweineleberesterase (Sigma-Aldrich, 165 U/mg, 4 mg/ml)
- G) Esterase aus *Thermoanaerobium brockii* (Fluka, 4,9 U/g, 50 mg/ml)

Alle Vials wurden für 1h leicht geschüttelt (Vortexer) und mit dest. Wasser auf 50 μ l aufgefüllt, bevor 25 μ l Ladepuffer und 7,5 μ l DTT (0,2 M in dest. Wasser) zugefügt wurden. Nach Erhitzen der Proben für 3 min im siedenden Wasserbad, wurden jeweils 15 μ l auf das Gel transferiert. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V, danach bei 120 V durchgeführt.

6.6 Chemische Synthesen

6.6.1 Synthese über Ozonolyse

6.6.1.1 Synthese von 2-Vinyl-pent-4-enitrile (36)



Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Kieczkowski *et al.*^[51]

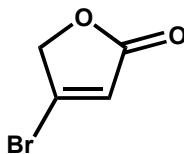
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 2,46 (t; $J = 6,68, 6,68$ Hz; 2H), 3,36 (dd; $J = 12,57, 7,02$ Hz; 1H), 5,23 (m; 2H), 5,33 (d; $J = 10,09$ Hz; 1H), 5,47 (d; $J = 16,99$ Hz; 1H), 5,77 (m; 2H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.2 Syntheseroute über 5H-2-Furanone

6.6.2.1 Synthese von 4-Brom-5H-2-furanon (63)



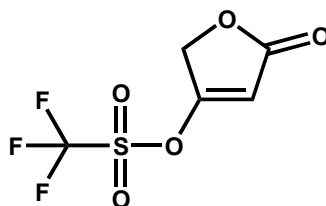
Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Le Vezouet.^[63]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 4,85 (d; $J = 1,86$ Hz; 2H), 6,34 (t; $J = 1,86, 1,86$ Hz; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.2.2 Synthese von 5-Oxo-2,5-dihydro-3-furanyltriflat (64)



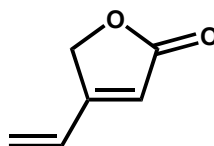
Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Grigg *et al.*^[62]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ ppm: 4,91 (s; 2H), 6,08 (s; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.2.3 Synthese von 4-Vinyl-5H-2-furanon (66)



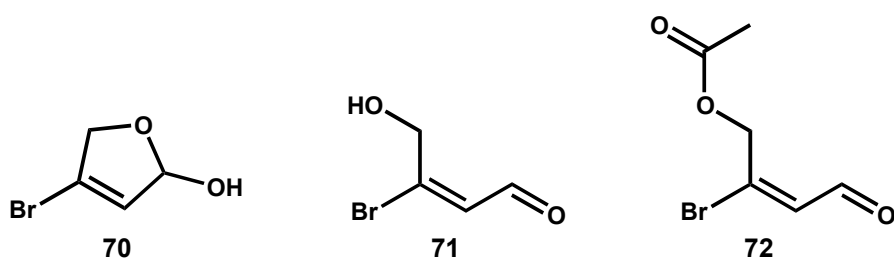
Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Lattmann und Hoffmann.^[61]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ ppm: 5,01 (s, 2H), 5,64 (dd; $J = 14,33, 3,41$ Hz; 2H), 6,00 (s, 1H), 6,72 (dd; $J = 17,83, 10,84$ Hz; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.2.4 Syntheseveruche von 2-Brom-4-oxo-2-butenylacetat (72)



Schritt 1:

Unter Argon wurden 673 mg (6,1 mmol) **63** in 50 ml trockenem Toluol gelöst und mittels Trockeneis/Aceton-Bad auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Anschließend wurden 6,1 ml einer 1 molaren Lösung von DIBAL in THF langsam tropfenweise zugefügt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Es wurden danach 1,2 ml Methanol zugegeben und das Reaktionsgemisch unter starkem Rühren langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe von 5 ml Wasser wurden die entstandenen gelben Flocken abfiltriert und verworfen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 20 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel der vereinten organischen Phasen am Rotationsverdampfer entfernt und das so erhaltene gelbliche Öl ausgewogen und direkt weiterverwendet.

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 , 200 MHz

Lactol (**70**):

δ ppm: 4,39 (s; 2H), 5,65 (dd; $J = 5,67, 1,64$ Hz; 1H), 6,02 (d; $J = 1,32$ Hz; 1H)

Aldehyd (**71**):

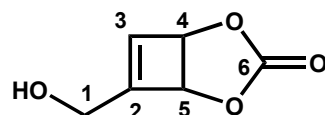
δ ppm: 5,06 (d; $J = 2,26$ Hz; 2H), 6,51 (d; $J = 0,99$ Hz; 1H), 9,84 (s; 1H)

Schritt 2:

Der zweite Syntheseschritt erfolgte in Analogie zur Vorschrift von Villo.^[67] 100 mg des Zwischenproduktes wurden in 4,4 ml eines Gemisches aus Chloroform und Vinylacetat (3:1, v/v) gelöst und mit 50 mg Novozym versetzt. In regelmäßigen Abständen (2 h) wurde per DC bzw. GC/MS der Umsatz überprüft. Es konnte kein Umsatz nachgewiesen werden.

6.6.3 Syntheseroute über Cyclobutene

6.6.3.1 Synthese von 6-Hydroxymethyl-2,4-dioxabicyclo-[3.2.0]-6-hepten-3-on (50)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Alibes.^[54]

10 g (0,12 mol) **45** und 36,6 g (0,65 mol) Propargylalkohol (**47**) wurden in 120 ml Aceton gelöst und unter Rühren bei 0 °C 8 Stunden mit einem TQ150 Quecksilber-Mitteldruckstrahler belichtet. Anschließend wurde das Dimer des Vinylencarbonats (**45**) abfiltriert und das Filtrat eingengt, erneut filtriert und das Lösungsmittel vollständig Rotationsverdampfer entfernt. Nach Säulenchromatographie (Kieselgel, 1:1 Diethylether/Ethylacetat (v/v)) konnten 4 g Vinylencarbonat (**45**) zurückgewonnen werden, sowie **50** als farbloses Öl.

Ausbeute: 2,5 g (0,0176 mol); 14,7 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 2,82 (s; 1H; H-O), 4,25 (d; *J* = 4,15 Hz; 2H; H-C1), 5,31 (td; *J* = 3,68, 1,07 Hz; 1H; H-C5), 5,38 (t; *J* = 3,64 Hz; 1H; H-C4), 6,53 (td; *J* = 3,61, 1,84 Hz; 1H; H-C3)

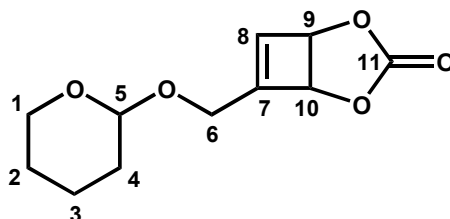
¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): 58,0 (C1), 75,5 (C4), 77,1 (C5), 136,7 (C3), 156,3 (C2), 159,1 (C6)

GC/EI-MS [*m/z* (relative Intensität)]:

52 (93), 53 (100), 55 (68), 69 (99), 81 (98), 96 (53), 98 (27), 142 [M⁺] (82)

6.6.3.2 Synthese von 6-(2-Tetrahydropyranoxymethyl)-2,4-dioxabicyclo-[3.2.0]-6-hepten-3-on (52)



Es wurden 500 mg **50** (3,52 mmol) in 15 ml Dichlormethan gelöst und mit ca. 3 mg *p*-Toluensulfonsäure versetzt. Anschließend wurden unter Rühren 1,6 ml (17 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran langsam tropfenweise zugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von weiteren 15 ml Dichlormethan, wurde das Gemisch mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Durch Säulenchromatographie (Kieselgel, 1:1 Petrolether/Ethylacetat (v/v)) konnte ein farbloses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 780 mg (3,45 mmol); 97,7 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

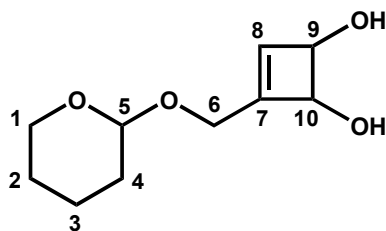
δ (ppm): 1,60 (m; 6H; H-C2, H-C3, H-C4), 3,62 (ddd; *J* = 16,64, 13,91, 7,33 Hz; 2H; H-C1), 4,20 (ddd; *J* = 21,31, 15,36, 8,04 Hz; 2H; H-C6), 4,60 (s; 1H; H-C5), 5,29 (d; *J* = 3,67; 1 H; H-C10), 5,36 (t; *J* = 3,62 Hz; 1H; H-C9), 6,51 (dt; *J* = 3,70, 1,92 Hz; 1H; H-C8)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): 19,1 (C3), 25,2 (C2), 30,2 (C4), 61,6 (C1), 62,2 (C6), 75,5 (C9), 77,3 (C10), 98,5 (C5), 137,7 (C8), 155,9 (C7), 156,9 (C11)

GC/EI-MS [m/z (relative Intensität)]:

53 (17), 81 (15), 85 (100), 170 (7), 226 [M⁺] (13)

6.6.3.3 Synthese von 3-(2-Tetrahydropyran-5-yloxy)-3-cyclobuten-1,2-diol (53)

520 mg **52** (2,3 mmol) wurden in 10 ml einer 0,5 molaren NaOH-Lösung in Dioxan/Wasser (1/1, v/v) gelöst. Diese Mischung wurde für 4 Stunden gerührt, anschließend mit 5 %-iger HCl neutralisiert und mit Dichlormethan (3 x 50 ml) und Ethylacetat (3 x 50ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Durch Säulenchromatographie (Kieselgel, 1/1 Petrolether/Ethylacetat (v/v)) konnte ein farbloses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 260 mg (1,3 mmol); 56,5 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,70 (m; 6H; H-C2, H-C3, H-C4), 3,66 (ddd, *J* = 16,28, 9,52, 5,05 Hz; 2H; H-C1), 4,14 (ddd; *J* = 49,28, 30,84, 15,00 Hz; 2H; H-C6), 4,60 (m; 2H; H-C5 + H-C9), 4,69 (d; *J* = 2,30 Hz; 1H; H-C10), 6,20 (d; *J* = 1,99 Hz; 1H; H-C8)

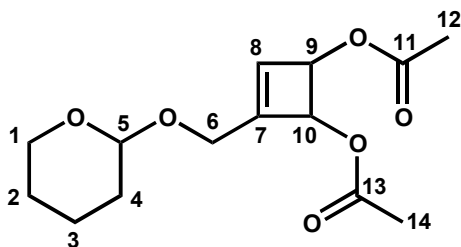
¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): 19,3 (C3), 25,2 (C2), 30,5 (C4), 62,5 (C1), 63,0 (C6), 70,5 (C9), 72,6 (C10), 98,9 (C5), 136,7 (C8), 154,0 (C7)

GC/EI-MS [m/z (relative Intensität)]:

52 (6), 66 (5), 80 (8), 85 (100), 98 (10), 100 (9), 183 (12), 200 [M⁺] (16)

6.6.3.4 Synthese von 1,2-Diacetoxy-3-(2-tetrahydropyranyloxymethyl)-3-cyclobuten (54)



In 9 ml Dichlormethan wurden 200 mg **53** (1,07 mmol) gelöst und bei Raumtemperatur mit 0,6 ml (4,3 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wurden 0,4 ml (4,3 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 15 h gerührt, wodurch sich die Lösung gelb verfärbte. Nach der Zugabe von 10 ml Wasser wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 10 ml), mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Filtration und Einengen am Rotationsverdampfer wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, 1:1 Petrolether/Ethylacetat (v/v)) das Produkt aufgereinigt. Es konnten 260 mg eines gelben Öls erhalten werden.

Ausbeute: 260 mg (0.92 mmol); 85,4 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,70 (m; 6H, H-C2, H-C3, H-C4), 2,04 (s; 3H; H-C12), 2,18 (s; 3H; H-C14), 3,47 + 3,77 (2 m; 2H; H-C1), 4,14 (dt; *J* = 89,80, 27,14, 15,67 Hz; 2H; H-C6), 4,60 (td; *J* = 10,19, 3,38 Hz; 2H; H-C5), 5,53 (s; 1H; H-C10), 5,62 (d; *J* = 2,33 Hz; 1H; H-C9), 6,24 (d, *J* = 1,62 Hz, 1C)

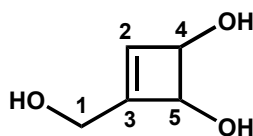
¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): 19,1 (C3), 20,77 (C14), 20,83 (C12), 25,3 (C2), 30,4 (C4), 62,0 (C1), 62,6 (C6), 72,1 (C9), 73,5 (C10), 98,2 (C5), 133,7 (C8), 152,3 (C7), 170,4 (C11, C13)

GC-EI-MS [m/z (relative Intensität)]:

81 (8), 85 (44), 97 (10), 98 (8), 98 (10), 122 (8), 140 (17), 142 (100), 166 (27), 183 (85), 201 (10), 225 (63), 284 [M⁺] (5)

6.6.3.5 Synthese von 3-Hydroxymethyl-3-cyclobuten-1,2-diol (**51**)



In 10 ml einer 0,5 molaren NaOH-Lösung in Dioxan/Wasser (1:1, v/v) wurden 330 mg **50** (2,3 mmol) gelöst und für 5 h gerührt. Nach dem Neutralisieren mit 5 %-iger HCl wurde Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt, das Gemisch mittels Gefriertrocknung bis zur Trockne eingeengt und in 5 ml Methanol aufgenommen. Nach Filtration wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Das entstandene gelbe, hoch viskose Öl zeigte ausreichende Reinheit und wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 140 mg (0,92 mmol); 61,0 %

¹H-NMR in d₄-Methanol, 200 MHz

δ (ppm): 4,11 (q; $J = 16,01, 16,00, 16,00$ Hz; 2H; H-C1), 4,57 (m; 1H; H-C5), 4,63 (dd; $J = 3,19; 2,51$ Hz; 1H; H-C4), 6,15 (dd; $J = 3,59, 1,76$ Hz; 1H; H-C2)

¹³C-NMR in d₄-Methanol, 50 MHz

δ (ppm): 58,8 (C1), 71,8 (C4), 73,5 (C5), 135,2 (C2), 158,1 (C6)

GC/EI-MS [m/z (relative Intensität)]:

52 (4), 54 (21), 55 (37), 56 (9), 66 (6), 84 (100), 100 (25)

6.6.4 Synthese von C4-Synthons und Kupplungspartnern

6.6.4.1 Synthese von 4-Acetoxybut-2-inol (78)



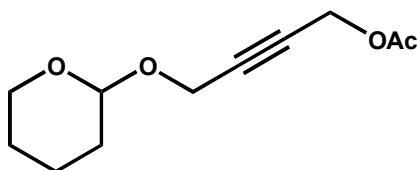
Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Thorimbert *et al.*^[73]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 2,12 (s; 3H), 4,31 (s; 2H), 4,73 (s; 2H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.4.2 Synthese von Essigsäure-4-(tetrahydropyran-2-yloxy)-but-2-inylester (79)



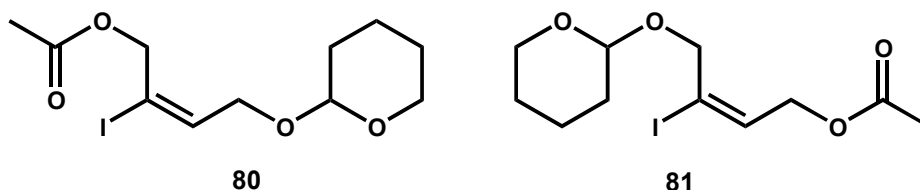
Zu einer Lösung von 1,38 g **78** (12,3 mmol) in 50 ml Dichlormethan wurden 15 mg *p*-Toluensulfonsäure gegeben. Über einen Zeitraum von 30 min wurden 5,6 ml DHP tropfenweisen zugefügt und für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 x 50 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel sowie nicht umgesetztes DHP entfernt und das so erhaltene farblose Öl ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 2,2 g (11,4 mmol); 92,7 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,50 – 1,70 (m; 6H), 2,04 (s; 3H), 3,50 (m; 1H), 3,70 (m; 1H), 4,20 (dt; *J* = 5,25, 1,81 Hz; 1H; 2H), 4,66 (t; *J* = 1,80 Hz; 1H); 4,74 (t; *J* = 3,03 Hz; 1H)

6.6.4.3 Synthese von (*E*)-Essigsäure-4-(tetrahydropyran-2-yloxy)-2-iodbut-2-enylester (**80**) und (*E*)-Essigsäure-4-(tetrahydropyran-2-yloxy)-3-iodbut-2-enylester (**81**)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Sauer und Barriault,^[72] wobei 1,5 g von **79** (7,1 mmol) verwendet wurden.

Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 3:1), wobei beide Verbindungen als nicht trennbares Gemisch erhalten wurden. Das Verhältnis beider Verbindungen wurde aufgrund des ¹H-NMR-Spektrums ermittelt und beträgt 3 (**80**) : 2 (**81**).

Ausbeute: 1,61 g (4,27 mmol); 60,1 %

80:

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

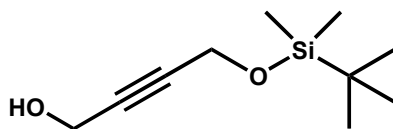
δ (ppm): 1,50 – 1,70 (m; 6H), 2,03 (s; 3H), 3,50 (m; 1H), 3,75 (m; 1H), 4,15 (m; 1H), 4,57 (m; 2H), 4,72 (s; 2H), 6,54 (t; *J* = 6,4 Hz; 1H)

81:

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,50 – 1,70 (m; 6H), 2,00 (s; 3H), 3,50 (m; 1H), 3,75 (m; 1H), 4,15 (m; 1H), 4,24 (s; 2H), 4,57 (m; 2H), 6,46 (t; *J* = 6,4 Hz; 1H)

6.6.4.4 Synthese von 4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-but-2-inol (**70**)



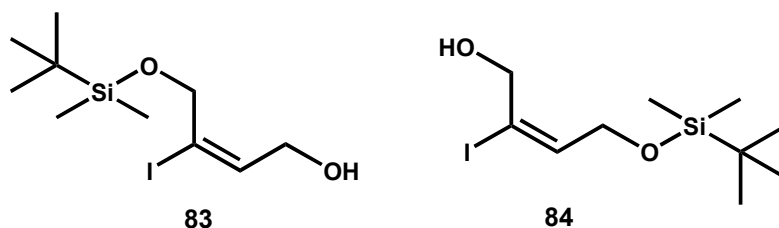
Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Cai *et al.*^[75]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,03 (s; 6H), 0,82 (s; 9H), 3,00 (s; 1H), 4,19 (s; 2H), 4,26 (s; 2H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.4.5 Synthese von (*E*)-4-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-3-iodbut-2-enol (**83**) und (*E*)-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-2-iodbut-2-enol (**84**)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Sauer und Barriault,^[72] wobei 1 g von **82** (5 mmol) verwendet wurde.

Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Diethylether 3:1), wobei beide Verbindungen getrennt erhalten wurden. Verbindung **84** konnte auch selektiv durch die Umsetzung von 2 g **23** (4 mmol) mit Iod nach der Vorschrift von Pollex und Hiersemann^[77] erhalten werden.

83:

Ausbeute: 910 mg (2,47 mmol); 49,4 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,09 (s; 6H), 0,88 (s; 9H), 4,13 (d; *J* = 6,6 Hz; 2H), 4,3 (m; 2H), 6,48 (t; *J* = 6,67, 6,67 Hz; 1H)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): -5,3, 25,8, 60,5, 67,3, 104,7, 141,2, 183,1

84:

Ausbeute: aus **82**: 220 mg (0,67 mmol); 13,4 %

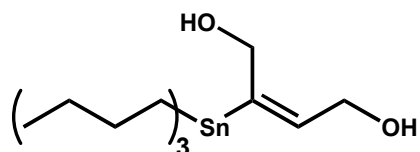
aus **23**: 1,25 g (3,83 mmol); 94 %

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,05 (s; 6H), 0,86 (s; 9H), 2,56 (t; *J* = 6,69 Hz; 1H), 4,17 (d; *J* = 6,17 Hz; 2H), 4,23 (d; *J* = 6,71 Hz; 2H), 6,41 (t; *J* = 6,15 Hz; 1H)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): -5,3, 18,3, 25,8, 61,2, 66,7, 104,7, 141,5

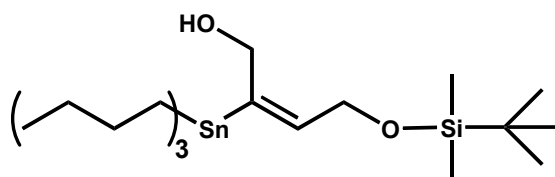
6.6.4.6 Synthese von (*E*)-2-Tributylstannyl-2-buten-1,4-diol (85)

Die Synthese erfolgte gemäß der Vorschrift von Zhang.^[76]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,83 – 0,94 (m; 15H), 1,23 – 1,34 (m; 6H), 1,40 – 1,52 (m; 6H), 2,06 (bs; 2H), 4,14 (d; *J* = 5,51 Hz; 2H), 4,34 (m; 2), 5,77 (m; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.4.7 Synthese von (*E*)-4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-2-tributylstannyl-2-butenol (23)

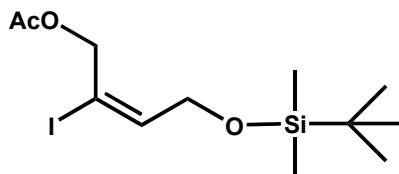
Die Synthese erfolgte gemäß der Vorschrift von Steinig.^[74]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,04 (s; 6H), 0,84 - 0,92 (m; 15H), 0,87 (s; 9H), 1,28-1,53 (m; 12H), 1,81 (t; *J* = 5,39; 5,39 Hz; 1H), 4,19 (d; *J* = 5,42 Hz; 2H), 4,30 (d; *J* = 5,39 Hz; 2H), 5,67 (m; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus der angegebenen Literatur überein.

6.6.4.8 Synthese von (*E*)-Essigsäure-4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-2-iod-2-butenylester (86)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Thorimbert *et al.*,^[73] wobei 620 mg von **84** (1,9 mmol) als Edukt verwendet wurden. Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat 6:1 (v/v)).

Ausbeute: 660 mg (1,8 mmol); 93,2 %

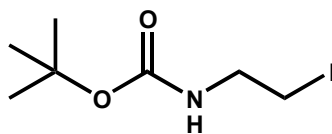
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,07 (s; 6H), 0,89 (s; 9H), 2,11 (s; 3H) 4,25 (d; *J* = 6,09 Hz; 2H), 4,76 (s; 2H), 6,53 (t; *J* = 6,10 Hz; 1H)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): -5,3, 20,9, 25,8, 61,2, 66,1, 94,8, 141,5

6.6.4.9 Synthese von *N*-Boc-2-iodethylamin (103)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Rew *et al.*^[140]

Zu einer Lösung aus 4,4 g Triphenylphosphin (16,8 mmol), 1,15 g Imidazol (16,8 mmol) und 2 g *N*-Boc-2-ethanolamin (12,4 mmol) in 60 ml Acetonitril/Diethylether (2:1) wurden bei 0 °C portionsweise 4,25 g Iod (16,8 mmol) zugegeben. Das Gemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in 200 ml Wasser aufgenommen. Es wurde dreimal mit jeweils 150 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt an Kieselgel mit einem Gemisch aus Petrolether/Diethylether (4:1) als Laufmittel säulenchromatographisch aufgereinigt, wodurch ein schwach gelber Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 2,42 g (8,93 mmol); 72 %

IR (Film, zwischen KBr-Platten)

3354, 2977, 2932, 1679, 1521, 1429, 1364, 1300, 1273, 1174, 1046, 933, 862, 785, 589, 499 cm⁻¹

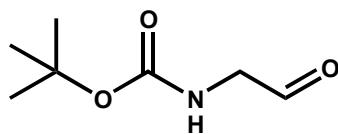
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,45 (s; 9H), 2,24 (t; *J* = 6,3 Hz; 2H), 3,47 (m; 2H),

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): 5,9 (C2), 28,3 (C5), 43,0 (C1), 79,8 (C4), 155,4 (C3)

6.6.4.10 Synthese von *N*-Boc-2-aminoethanal (87)



Die Synthese erfolgte gemäß der Vorschrift von White und Hansen.^[141]

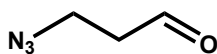
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,46 (s; 9H), 4,09 (d; *J* = 4,6 Hz; 2H), 9,66 (s; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten der angegebenen Literatur überein.

6.6.5 Syntheseroute via „Click-Reaktion“

6.6.5.1 Synthese von 3-Azidopropanal (120)



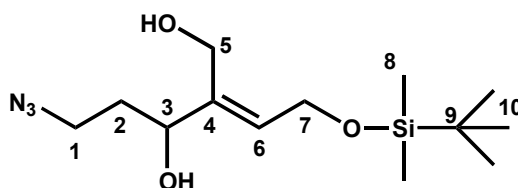
Die Synthese erfolgte gemäß der Vorschrift von Davies *et al.*^[99]

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 2,61 (t; *J* = 6,29 Hz; 2H), 3,48 (t; *J* = 6,27 Hz; 2H), 9,65 (s; 1H)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten der angegebenen Literatur überein.

6.6.5.2 Synthese von (*E*)-5-Azido-2-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-ethyliden]-pentan-1,3-diol (**121**)



Unter Schutzgas wurden 1,52 g **23** (3,09 mmol) in 50 ml THF gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Anschließend wurden 4,26 ml *n*-Butyllithium (1,6 M in Hexan, 6,81 mmol) tropfenweise zugefügt und für einen Zeitraum von 2 h auf -35 °C erwärmt. Während dieser Zeit wurde per DC mehrmals überprüft, ob sich der Ausgangsstoff komplett umgesetzt hat. Nach erneutem Abkühlen auf -78 °C wurden 306 mg (3,09 mmol) frisch hergestelltes 3-Azidopropanal (**121**) tropfenweise zugefügt und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 ml gesättigter NH₄Cl-Lösung und Erwärmen auf Raumtemperatur wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (4 x 50 ml). Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration und Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt per Säulenchromatographie (Kieselgel, 1:1 bis 1:3 Petrolether/Ethylacetat (v/v)) gereinigt, um ein schwach gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 610 mg (2,02 mmol); 65,3 %

IR (Film zwischen KBr-Platten)

3388, 2960, 2936, 2100, 1464, 1260, 1108, 840, 780 cm⁻¹

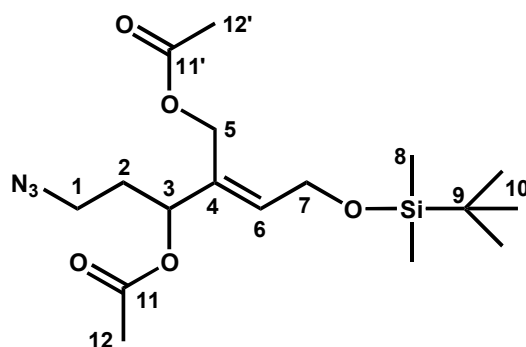
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,09 (s; 6H; H-C8), 0,90 (s; 9H; H-C10), 1,90 (m; 2H; H-C2), 3,45 (dt; *J* = 6,45, 2,68 Hz; 2H; H-C1), 4,23 (s; 2H; H-C5), 4,29 (m; 3H; H-C7 + H-C3), 5,75 (t; *J* = 5,78 Hz; 1H; H-C6)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): -5,3 (C8), 18,3 (C9), 25,9 (C10), 34,6 (C2), 48,5 (C1), 58,3 (C5), 59,4 (C7), 73,5 (C3), 129,1 (C6), 142,3 (C4)

6.6.5.3 Synthese von (*E*)-5-Azido-2-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-ethyliden]-1,3-diacetoxypentan (122)



450 mg (1,5 mmol) des Diols **121** sowie 14 mg DMAP wurden in 6,5 ml Pyridin gelöst und mit 0,56 ml (0,6 mmol) Acetanhydrid versetzt und für 14 h gerührt. Danach wurden 5 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung zugefügt und das trübe Gemisch mit Diethylether extrahiert (3 x 30 ml). Die organischen Phasen wurden mit gesättigter CuSO₄-Lösung (5 x 20 ml) und Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, um das Produkt als leicht gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 548 mg (1,42 mmol), 95 %

IR (Film zwischen KBr-Platten)

2952, 2872, 2104, 1744, 1456, 1376, 1232, 1096, 1032, 840, 784 cm⁻¹

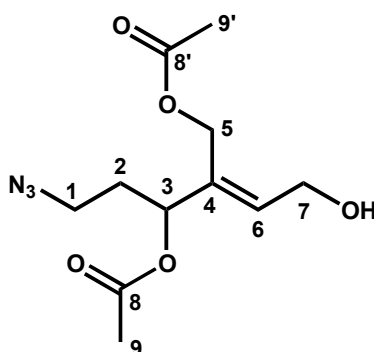
¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 0,04 (s; 6H; H-C8), 0,87 (s; 9H; H-C10), 1,93 (td; *J* = 9,72, 3,26; 2H; H-C2), 2,04 (s; 6H; H-C12 + H-C12') 3,30 (t; *J* = 6,87 Hz; 2H; H-C1), 4,29 (d; *J* = 5,84 Hz; 2H; H-C7), 4,61 (s; 2H; H-C5) 5,31 (dd; *J* = 7,20, 6,21; 1H; H-C3), 5,84 (t; *J* = 5,77 Hz; 1H; H-C6)

¹³C-NMR in CDCl₃, 50 MHz

δ (ppm): -5,3 (C8), 18,2 (C9), 20,8 (C12), 21,0 (C12') 25,8 (C10), 32,8 (C2), 47,8 (C1), 59,4 (C7), 73,0 (C3), 77,2 (C5), 132,2 (C6), 134,9 (C4), 169,9 (C11), 170,6 (C11')

6.6.5.4 Synthese von (*E*)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enol (**123**)



In 10 ml THF wurden 260 mg (0,67 mmol) **122** gelöst und mit 0,31 ml (1 mmol) HF•Pyridin versetzt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nach dem kompletten Umsatz des Ausgangsstoffes (3 h) wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer eingengt und per Säulenchromatographie aufgetrennt (Kieselgel, 3:2 Petrolether/Ethylacetat (v/v)), um ein leicht gelbes Öl zu erhalten. Als Nebenprodukt konnte das isomere (*E*)-5-Azido-4-hydroxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enylacetat (**124**) erhalten werden.

Ausbeute: 141 mg (0,61 mmol), 78 %

IR (Film zwischen KBr-Platten)

3464, 2944, 2888, 2104, 1744, 1448, 1376, 1232, 1024 cm⁻¹

¹H-NMR in CDCl₃, 400 MHz

δ (ppm): 1,95 (m; 2H; H-C2), 2,06 (s; 6H; H-C9, H-C9'), 3,33 (dt; *J* = 7,25, 1,65 Hz; 2H; H-C1), 4,27 (d; *J* = 6,62 Hz; 2H; H-C7), 4,68 (dd; *J* = 34,21, 12,26; 2H; H-C5) 5,31 (dd; *J* = 8,25, 5,12; 1H; H-C3), 5,95 (t; *J* = 6,64 Hz; 1H; H-C6)

¹³C-NMR in CDCl₃, 100 MHz

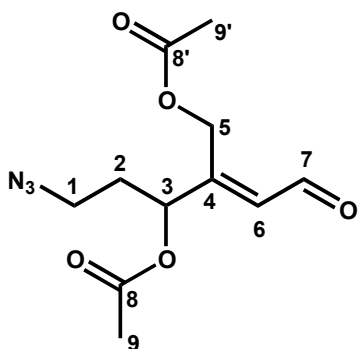
δ (ppm): 20,9 (C9), 21,0 (C9') 32,9 (C2), 47,7 (C1), 58,3 (C5), 59,4 (C7), 72,8 (C3), 133,1 (C6), 134,2 (C4), 169,9 (C8), 170,9 (C8')

Isomeres Nebenprodukt:

¹H-NMR in CDCl₃, 200 MHz

δ (ppm): 1,95 (m; 2H), 2,00 (s; 3H), 2,02 (s; 3H), 3,33 (t; *J* = 7,00 Hz; 2H), 4,15 (d; *J* = 5,01 Hz; 2H), 4,65 (dd; *J* = 6,6, 2,05; 2H) 5,28 (t; *J* = 6,72 Hz; 1H), 5,64 (t; *J* = 7,04 Hz; 1H; H-C6)

6.6.5.5 Synthese von (*E*)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enal (**125**)



Zu einer Lösung von 100 mg **123** (0,37 mmol) in 20 ml Dichlormethan wurden bei 0 °C 237 mg (0,56 mmol) Dess-Martin-Periodinan zugegeben. Die Suspension wurde anschließend bei RT unter Argon gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC verfolgt. Nach dem vollständigen Umsatz des Ausgangsstoffes (4h) wurde das Gemisch in einen Scheidetrichter mit gesättigter Na₂S₂O₃/NaHCO₃-Lösung (20 ml, 1/1) überführt und für 5 min kräftig geschüttelt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (2 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Dieses Rohprodukt erwies sich als sehr instabil, weshalb auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde und es stattdessen direkt im folgenden Schritt eingesetzt wurde.

Ausbeute: 92 mg (0,34 mmol, Rohprodukt), 92 %

Die Spektroskopischen Daten beziehen sich auf das Rohprodukt.

IR (Film zwischen KBr-Platten)

2944, 2872, 2104, 1744, 1680, 1448, 1376, 1232, 1040 cm⁻¹

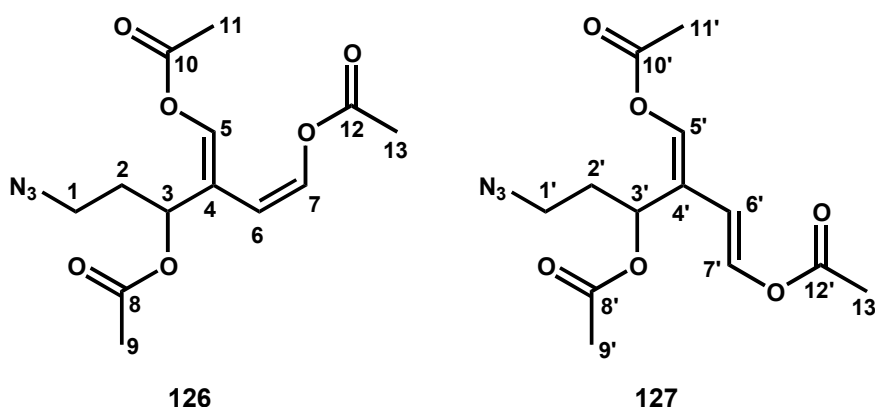
¹H-NMR in CDCl₃, 400 MHz

δ (ppm): 1,95 (m; ~2H; H-C2), 2,08 + 2,09 (s+s; 6H; H-C9, H-C9'), 3,35 (m; 2H überlagert; H-C1), 5,05 (d; *J* = 4,27 Hz; 2H; H-C5), 5,31 (dd; *J* = 7,52, 4,78; 1H; H-C3), 6,09 (d; *J* = 7,20 Hz; 1H; H-C6), 10,07 (d; *J* = 7,21 Hz; 1H; H-C7)

¹³C-NMR in CDCl₃, 100 MHz

δ (ppm): 20,4 (C9 + C9'), 32,5 (C2), 47,0 (C1), 58,9 (C5), 70,8 (C3), 128,3 (C6), 153,9 (C4), 169,3 (C8 + C8'), 189,7 (C7)

6.6.5.6 Synthese von (1*E*/*Z*, 3*Z*) Essigsäure-4-acetoxy-2-(1-acetoxy-3-azidopropyl)-buta-1,3-dienylester (126 + 127)



In einem Schlenkgefäß wurden 92 mg (ca. 0,34 mmol) des Rohaldehyds **125** und 42 mg (0,4 mmol) DMAP eingewogen. Anschließend wurden unter Argon 112 μ l (1,2 mmol) Acetanhydrid und 11 ml Triethylamin zugegeben und das Gemisch auf 80 °C erwärmt. Mittels DC wurde die Reaktion verfolgt. Nach dem vollständigen Umsatz des Ausgangsstoffes (6h) wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt und per Säulenchromatographie (Kieselgel, 4/1 Petrolether/Ethylacetat, (v/v)) aufgetrennt, um ein schwach braunes Öl zu erhalten. Es wurde ein 7:3 Gemisch der 1*Z* und der 1*E*-Verbindung erhalten, welches nicht getrennt werden konnte.

Ausbeute: 70 mg (0,22 mmol), 66 %

(1*Z*, 3*Z*) Essigsäure-4-acetoxy-2-(1-acetoxy-3-azidopropyl)-buta-1,3-dienylester (126)

¹H-NMR in CDCl₃, 400 MHz

δ (ppm): 1,80 (m; 2H; H-C2), 2,03 (s; 3H; H-C9), 2,19 + 2,21(s+s; 6H; H-C11, H-C13), 3,30 (m; 2H; H-C1), 5,12 (d; $J = 7,29$ Hz; 2H; H-C7), 5,96 (t; $J = 7,13$ Hz; 1H; H-C3), 7,22 (d; $J = 7,30$ Hz; 1H; H-C6), 7,82 (s; 1H; H-C5)

¹³C-NMR in CDCl₃, 100 MHz

δ (ppm): 20,6 + 20,9 (C9, C11, C13), 32,3 (C2), 47,5 (C1), 66,9 (C3), 103,2 (C6), 116,4 (C4), 135,4 (C5), 137,9 (C7), 167,1+ 167,2 + 169,8 (C8, C10, C12)

(1E, 3Z) Essigsäure-4-acetoxy-2-(1-acetoxy-3-azidopropyl)-buta-1,3-dienylester (127)**¹H-NMR in CDCl₃, 400 MHz**

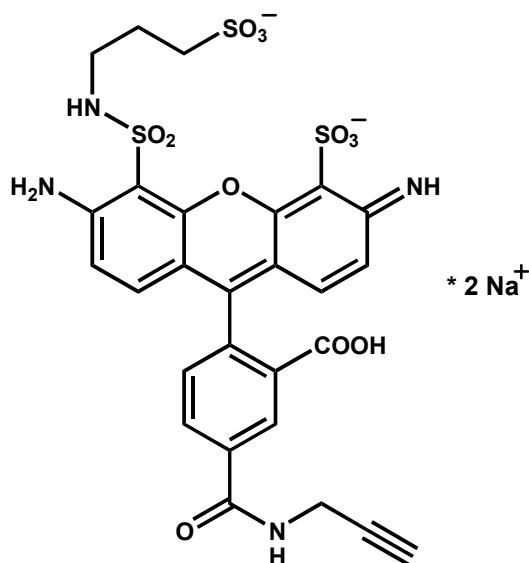
δ (ppm): 1,83 (m; 2H; H-C2'), 2,05 (s; 3H; H-C9'), 2,13 + 2,19 (s+s; 6H; H-C11', H-C13'), 3,30 (m; 2H; H-C1'), 5,78 (d; *J* = 12,69 Hz; 2H; H-C7'), 5,95 (t; *J* = 7,54 Hz; 1H; H-C3'), 7,24 (s; 1H; H-C5'), 7,58 (d; *J* = 12,81 Hz; 1H; H-C6')

¹³C-NMR in CDCl₃, 100 MHz

δ (ppm): 20,6 + 20,9 (C9', C11', C13'), 32,3 (C2'), 47,5 (C1'), 66,9 (C3'), 109,0 (C6'), 118,4 (C4'), 134,5 (C5'), 137,0 (C7'), 167,1+ 167,2 + 167,8 (C8', C10', C12')

UPLC/ESI-MS (pos. Modus) (126 + 127) [m/z (relative Intensität)]:

113 (37), 123 (37), 140 (47), 141 (15), 164 (17), 182 (100), 183 (29), 224 (9), 334 [M⁺ + Na] (29)

6.6.5.7 Synthese von DYTM-490-Propargylamid (130)

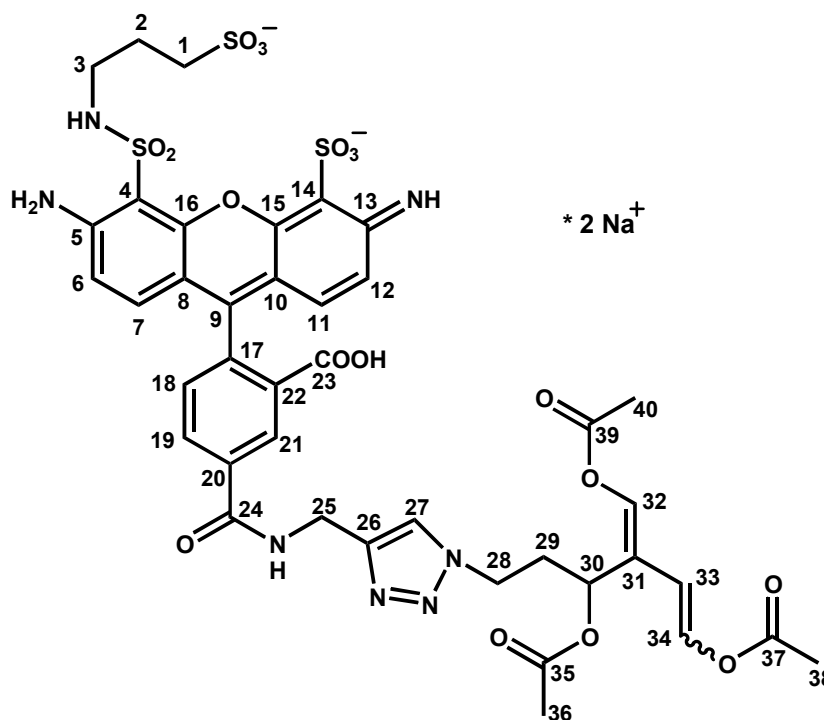
5 mg DYTM-490-NHS-Ester (Dyomics GmbH) (**128**) wurden in 0,5 ml DMF gelöst mit 1,2 µl Triethylamin und 0,5 µl (7,8 µmol) Propargylamin (**129**) versetzt und für 90 min bei RT leicht geschüttelt (Vortexer). Anschließend wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt und gefriergetrocknet. Die Strukturbestätigung erfolgte per UPLC/ESI-MS.

Ausbeute: 2,2 mg, 64 %

UPLC/ESI-MS (positiver Modus) [m/z (relative Intensität)]:

692 (100), 714 (37), 736(8)

6.6.5.8 Synthese von (1E/Z, 3Z) N-(DY™-490)-Essigsäure-4-acetoxy-2-[1-acetoxy-3-(4-aminomethyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-propyl]-buta-1,3-dienylester (DY™-490-Bisenoylacetat) (131)



In einem 0,5 ml Eppendorf-Vial wurden 2 mg des DY™-490-Propargylamids (**130**) und 6 mg des Azido-Bisenoylacetats (**126 + 127**) eingewogen und in 240 µl H₂O/*t*-Butanol (1/1, v/v) gelöst. Anschließend wurden 6 µl einer 1 M Natriumascorbat-Lösung zugegeben, sowie 2 µl einer wässrigen Kupfer(II)-sulfatlösung (75 mg/ml CuSO₄•5 H₂O), woraufhin sich die Lösung eintrübte und braun verfärbte. Während der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch leicht geschüttelt (Vortexer) und der Reaktionsverlauf über UPLC/MS verfolgt. Nach vollständigem Umsatz von **130** wurde das Gemisch per präparativer HPLC aufgetrennt. Die Fraktionen wurden per UPLC/ESI-MS auf die Reinheit überprüft, die entsprechenden Fraktionen vereint und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1,5 mg, ca. 50 %

¹H-NMR in D₂O, 400 MHz

δ (ppm): 1,85 (m; 2H; H-C2), 1,91 (s; 3H; H-C40), 2,03 (s; 3H; H-C38), 2,19 (s; 3H; H-C36), 2,26 + 2,46 (2m; 2H; H-C29), 2,81 (t; *J* = 7,35 Hz; 2H; H-C3), 3,06 (m; 2H; H-C1), 4,46 (m; 2H; H-C28), 5,12 (d; *J* = 7,14 Hz; 1H; H-C34), 5,53 (t; *J* = 6,90 Hz; 1H; H-C30), 6,87 (d; *J* = 6,87 Hz; 1H; H-C7), 6,89 (d; *J* = 6,52 Hz; 1H; H-C11), 6,97 (d; *J* = 7,23 Hz; 1H; H-C33), 7,17 (2d (überlagert); 2H; H-C6 + H-C12), 7,34 (s, 1H; H-C32) 7,39 (d (überlagert mit H-C32); 1H; H-C18), 7,93 (d; *J* = 7,72 Hz; 1H; H-C19) 7,98 (s; 1H; H-C27), 8,24 (s; 1H; H-C21)

HSQC in D₂O, 100 MHz

δ (ppm): 20,3 (C36, C38, C40), 24,5 (C2), 35,1 (C25), 41,6 (C1), 47,2 (C28), 48,4 (C3), 68,1 (C30), 104,6 (C34), 120,4 (C7 + C11), 128,2 (C21), 128,9 (C19), 130,6 (C18), 132,9 (C6 + C12), 136,1 (C33), 138,0 (C32)

Im HSQC-NMR-Spektrum lässt sich das Protonensignal von H-C25 bei 4,62 ppm erkennen, welches von dem Protonensignal des Wassers überlagert wurde.

UPLC/ESI-MS (positiver Modus) [m/z (relative Intensität)]:

430 (6), 735 (6), 859 (4), 901 (66), 923 (8), 1003 [M+H⁺] (100), 1025 [M+Na⁺] (22)

7 Literatur

- [1] R. N. Bennett, R. M. Wallsgrave, *New Phytologist* **1994**, 127, 617.
- [2] M. S. Chen, *Insect Science* **2008**, 15, 101.
- [3] M. Welling, G. Pohnert, F. C. Kupper, C. Ross, *Journal of Adhesion* **2009**, 85, 825.
- [4] G. I. McFadden, P. R. Gilson, D. R. A. Hill, *European Journal of Phycology* **1994**, 29, 29.
- [5] V. Jung, Dissertation, Max Planck Institut für Chemische Ökologie (Jena), **2003**.
- [6] W. P. Jacobs, *Scientific American* **1994**, 271, 100.
- [7] NIMPIS, Vol. 2010 (Ed.: C. Agardh), NIMPIS web publication, **2010**.
- [8] D. BellanSantini, P. M. Arnaud, G. Bellan, M. Verlaque, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1996**, 76, 235.
- [9] O. Jousson, J. Pawlowski, L. Zaninetti, A. Meinesz, C. F. Boudouresque, *Marine Ecology-Progress Series* **1998**, 172, 275.
- [10] J. Wiedenmann, A. Baumstark, T. L. Pillen, A. Meinesz, W. Vogel, *Marine Biology* **2001**, 138, 229.
- [11] I. Meusnier, J. L. Olsen, W. T. Stam, C. Destombe, M. Valero, *Molecular Ecology* **2001**, 10, 931.
- [12] T. Komatsu, A. Meinesz, D. Buckles, in *First international workshop on Caulerpa taxifolia*, GIS Posidonie, **1994**.
- [13] X. Devillele, M. Verlaque, *Botanica Marina* **1995**, 38, 79.
- [14] M. Verlaque, P. Fritayre, *Oceanologica Acta* **1994**, 17, 659.
- [15] A. Zuljevic, B. Antolic, *Phycologia* **2000**, 39, 157.
- [16] C. M. Smith, L. J. Walters, *Marine Ecology* **1999**, 20, 307.
- [17] N. Sant, O. Delgado, C. RodriguezPrieto, E. Ballesteros, *Botanica Marina* **1996**, 39, 427.
- [18] A. Zuljevic, T. Thibaut, H. Elloukal, A. Meinesz, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2001**, 81, 343.
- [19] D. Menzel, *Protoplasma* **1988**, 144, 73.
- [20] T. W. Dreher, B. R. Grant, R. Wetherbee, *Protoplasma* **1978**, 96, 189.
- [21] W. Zhang, L. Piculell, S. Nilsson, S. H. Knutsen, *Carbohydrate Polymers* **1994**, 23, 105.
- [22] I. M. Yermak, Y. H. Kim, E. A. Titlynov, V. V. Isakov, T. F. Solov'eva, *Journal of Applied Phycology* **1999**, 11, 41.
- [23] G. H. Kim, T. A. Klochkova, K. S. Yoon, Y. S. Song, K. P. Lee, *Journal of Phycology* **2006**, 42, 86.
- [24] T. W. Dreher, D. B. Hawthorne, B. R. Grant, *Protoplasma* **1982**, 110, 129.
- [25] S. Adolph, Dissertation, Friedrich-Schiller Universität Jena, **2008**.
- [26] Karnovsk.Mj, *Journal of Cell Biology* **1965**, 27, A137.
- [27] S. Adolph, V. Jung, J. Rattke, G. Pohnert, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 2806.
- [28] C. Ross, F. C. Kupper, V. Vreeland, H. Waite, R. S. Jacobs, *Phycologia* **2005**, 44, 140.
- [29] C. Ross, V. Vreeland, J. H. Waite, R. S. Jacobs, *Journal of Phycology* **2005**, 41, 46.
- [30] M. Welling, Dissertation, EPFL (Lausanne), **2010**.
- [31] V. Jung, G. Pohnert, *Tetrahedron* **2001**, 57, 7169.
- [32] V. Smyrniotopoulos, D. Abatis, L. A. Tziveleka, C. Tsitsimpikou, V. Roussis, A. Loukis, C. Vagias, *Journal of Natural Products* **2003**, 66, 21.
- [33] V. Amico, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno, L. Mayol, *Tetrahedron Letters* **1978**, 3593.
- [34] O. Dumay, G. Pergent, C. Pergent-Martini, P. Amade, *J Chem Ecol* **2002**, 28, 343.
- [35] V. J. Paul, University of California (San Diego), **1985**.
- [36] P. Amade, R. Lemee, *Aquatic Toxicology* **1998**, 43, 287.
- [37] V. J. Paul, W. Fenical, *Marine Ecology-Progress Series* **1986**, 34, 157.

- [38] D. Pesando, R. Lemee, C. Ferrua, P. Amade, J. P. Girard, *Aquatic Toxicology* **1996**, *35*, 139.
- [39] P. Barbier, S. Guise, P. Huitorel, P. Amade, D. Pesando, C. Briand, V. Peyrot, *Life Sciences* **2001**, *70*, 415.
- [40] J. L. Fischel, R. Lemee, P. Formento, C. Caldani, J. L. Moll, D. Pesando, A. Meinesz, P. Grelier, F. Pietra, A. Guerriero, G. Milano, *Anticancer Research* **1995**, *15*, 2155.
- [41] A. Guerriero, D. Depentori, M. Dambrosio, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 1755.
- [42] V. Jung, T. Thibaut, A. Meinesz, G. Pohnert, *Journal of Chemical Ecology* **2002**, *28*, 2091.
- [43] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Weinheim, Wiley VCH, **1999**.
- [44] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie*, 3 ed., Wiley VCH, **2000**.
- [45] T. J. Simpson, in *Biosynthesis*, Vol. 195, Springer-Verlag Berlin, Berlin 33, **1998**, pp. 1.
- [46] Y. J. Tang, H. G. Martin, S. Myers, S. Rodriguez, E. E. K. Baidoo, J. D. Keasling, *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 362.
- [47] L. Commeiras, M. Santelli, J. L. Parrain, *Organic Letters* **2001**, *3*, 1713.
- [48] L. Commeiras, M. Santelli, J. L. Parrain, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 2311.
- [49] C. F. Boudouresque, R. Lemee, X. Mari, A. Meinesz, *Aquatic Botany* **1996**, *53*, 245.
- [50] A. Guerriero, A. Meinesz, M. Dambrosio, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1992**, *75*, 689.
- [51] G. R. Kieczkowski, R. H. Schlessinger, R. B. Sulsky, *Tetrahedron Letters* **1975**, 4647.
- [52] L. Ferrie, S. Reymond, P. Capdevielle, J. Cossy, *Organic Letters* **2006**, *8*, 3441.
- [53] R. B. Woodward, R. Hoffmann, *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 395.
- [54] R. Alibes, J. L. Bourdelande, A. Gregori, J. Font, A. Rustullet, T. Parella, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2003**, *22*, 501.
- [55] W. Hartmann, *Chemische Berichte-Recueil* **1968**, *101*, 1643.
- [56] W. J. Leigh, J. A. Postigo, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1688.
- [57] G. L. Mislin, M. Miesch, *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 433.
- [58] D. R. Anderson, T. H. Koch, *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 2726.
- [59] R. W. Aben, H. W. Scheeren, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1979**, 3132.
- [60] J. Weissflog, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2005**.
- [61] E. Lattmann, H. M. R. Hoffmann, *Synthesis-Stuttgart* **1996**, 155.
- [62] R. Grigg, V. Savic, M. ThorntonPett, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10633.
- [63] R. Le Vezouet, A. J. P. White, J. N. Burrows, A. G. M. Barrett, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12252.
- [64] L. L. Klein, C. M. Yeung, P. Kurath, J. C. Mao, P. B. Fernandes, P. A. Larthey, A. G. Pernet, *Journal of Medicinal Chemistry* **1989**, *32*, 151.
- [65] K. Lee, Y. Choi, G. Gumina, W. Zhou, R. F. Schinazi, C. K. Chu, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1313.
- [66] I. Margaros, G. Vassilikogiannakis, *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 4826.
- [67] L. Villo, A. Metsala, O. Parve, T. Pehk, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3203.
- [68] V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2006**, *40*, 111.
- [69] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 6032.
- [70] R. Kourist, P. D. de Maria, U. T. Bornscheuer, *ChemBiochem* **2008**, *9*, 491.
- [71] L. Commeiras, J. Thibonnet, J. L. Parrain, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 425.
- [72] E. L. O. Sauer, L. Barriault, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8569.

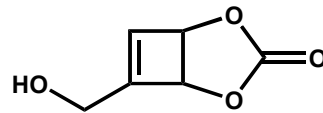
- [73] S. Thorimbert, G. Giambastiani, C. Commandeur, M. Vitale, G. Poli, M. Malacria, *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 2702.
- [74] A. G. Steinig, A. de Meijere, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 1333.
- [75] G. R. Cai, W. Zhu, D. W. Ma, *Tetrahedron* **2006**, 62, 5697.
- [76] H. X. Zhang, F. Guibe, G. Balavoine, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 1857.
- [77] A. Pollex, M. Hiersemann, *Organic Letters* **2005**, 7, 5705.
- [78] K. Yoshido, S. Horiuchi, N. Iwadate, F. Kawagoe, T. Imamoto, *Synlett* **2007**, 1561.
- [79] K. C. Nicolaou, P. M. Pihko, F. Bernal, M. O. Frederick, W. Y. Qian, N. Uesaka, N. Diedrichs, J. Hinrichs, T. V. Koftis, E. Loizidou, G. Petrovic, M. Rodriguez, D. Sarlah, N. Zou, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 2244.
- [80] D. A. Evans, T. Bach, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1993**, 32, 1326.
- [81] E. M. E. Viseux, P. J. Parsons, J. B. J. Pavey, *Synlett* **2003**, 861.
- [82] P. Šilhár, Pohl R., Votruba I., Hocek M., *ORGANIC LETTERS* **2004**, 6, 3225.
- [83] S. M. Ma, A. B. Zhang, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 2287.
- [84] M. Volkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 12749.
- [85] K. E. Drouet, E. A. Theodorakis, *Chemistry-a European Journal* **2000**, 6, 1987.
- [86] P. Dimopoulos, A. Athlan, S. Manaviazar, K. J. Hale, *Organic Letters* **2005**, 7, 5373.
- [87] P. Gamez, C. Ariento, J. Gore, B. Cazes, *Tetrahedron* **1998**, 54, 14825.
- [88] A. B. Smith, T. M. Razler, R. M. Meis, G. R. Pettitt, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, 1201.
- [89] L. Boren, K. Leijondahl, J. E. Backvall, *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 3237.
- [90] T. J. Greshock, R. L. Funk, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 4946.
- [91] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 3057.
- [92] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, 2004.
- [93] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 2210.
- [94] L. Zhang, X. G. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. C. Jia, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 15998.
- [95] J. Waser, H. Nambu, E. M. Carreira, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 8294.
- [96] B. Gaspar, J. Waser, E. M. Carreira, *Synthesis-Stuttgart* **2007**, 3839.
- [97] A. Guerriero, M. D'Ambrosio, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 1985.
- [98] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 210.
- [99] A. J. Davies, A. S. R. Donald, R. E. Marks, *Journal of the Chemical Society C-Organic* **1967**, 2109.
- [100] W. G. Frank, M. S. Wenzel, P. T. Czerney, S. Desai, G. Hermanson, Patent, **2008**. EP 1 947 095 A1
- [101] S. C. Rall, R. D. Cole, *Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246, 7175.
- [102] K. Konno, C. Hirayama, H. Yasui, M. Nakamura, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 9159.
- [103] R. J. Kazlauskas, *Trends in Biotechnology* **1994**, 12, 464.
- [104] N. Bitou, M. Ninomiya, T. Tsujita, H. Okuda, *Lipids* **1999**, 34, 441.
- [105] A. Cutignano, V. Notti, G. d'Ippolito, A. D. Coll, G. Cimino, A. Fontana, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 3167.
- [106] T. E. Creighton, *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, **1997**.
- [107] J. R. M. Chisholm, M. Marchioretta, J. M. Jaubert, *Marine Ecology-Progress Series* **2000**, 201, 189.
- [108] V. J. Paul, W. Fenical, *Phytochemistry* **1985**, 24, 2239.
- [109] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, *Nat Cell Biol* **2003**, Suppl, S1.

- [110] C. Caliezi, W. A. Wuillemin, S. Zeerleder, M. Redondo, B. Eisele, C. E. Hack, *Pharmacological Reviews* **2000**, *52*, 91.
- [111] M. Chilosi, A. Mombello, L. Montagna, A. Benedetti, M. Lestani, G. Semenzato, F. Menestrina, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1990**, *38*, 1669.
- [112] W. R. Matull, S. P. Pereira, J. W. O'Donohue, *Journal of Clinical Pathology* **2006**, *59*, 340.
- [113] N. Amara, R. Mashlach, D. Amar, P. Krief, S. A. H. Spieser, M. J. Bottomley, A. Aharoni, M. M. Meijler, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 10610.
- [114] V. Pande, S. F. Sousa, M. J. Ramos, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 4261.
- [115] B. Granvogl, M. Ploscher, L. A. Eichacker, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 991.
- [116] H. K. S. Leiros, B. O. Brandsdal, O. A. Andersen, V. Os, I. Leiros, R. Helland, J. Otlewski, N. P. Willassen, A. O. Smalas, *Protein Science* **2004**, *13*, 1056.
- [117] E. J. Finehout, J. R. Cantor, K. H. Lee, *Proteomics* **2005**, *5*, 2319.
- [118] L. W. Miller, V. W. Cornish, *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9*, 56.
- [119] M. Z. Lin, L. Wang, *Physiology* **2008**, *23*, 131.
- [120] R. Birner-Grunberger, H. Scholze, K. Faber, A. Hermetter, *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *85*, 147.
- [121] H. Susani-Etzerodt, H. Schmidinger, G. Riesenhuber, R. Birner-Gruenberger, A. Hermetter, *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *144*, 60.
- [122] H. Schmidinger, R. Birner-Gruenberger, G. Riesenhuber, R. Saf, H. Susani-Etzerodt, A. Hermetter, *Chembiochem* **2005**, *6*, 1776.
- [123] E. Cruz-Rivera, M. E. Hay, *Ecology* **2000**, *81*, 201.
- [124] E. Cruz-Rivera, M. E. Hay, *Ecological Monographs* **2003**, *73*, 483.
- [125] M. E. Hay, J. E. Duffy, V. J. Paul, P. E. Renaud, W. Fenical, *Limnology and Oceanography* **1990**, *35*, 1734.
- [126] J. D. Gibbons, S. Chakraborti, *Nonparametric Statistical Inference* **1993**, *131*.
- [127] A. A. Erickson, V. J. Paul, K. L. Van Alstyne, L. M. Kwiatkowski, *Journal of Chemical Ecology* **2006**, *32*, 1883.
- [128] O. J. McConnell, P. A. Hughes, N. M. Targett, J. Daley, *Journal of Chemical Ecology* **1982**, *8*, 1437.
- [129] N. M. Targett, T. E. Targett, N. H. Vrolijk, J. C. Ogden, *Marine Biology* **1986**, *92*, 141.
- [130] J. V. Paul, K. L. Vanalstyne, *Coral Reefs* **1988**, *6*, 263
- [131] E. Cruz-Rivera, M. E. Hay, *Marine Ecology-Progress Series* **2001**, *218*, 249.
- [132] K. Konno, C. Hirayama, H. Shinbo, *Journal of Insect Physiology* **1997**, *43*, 217.
- [133] K. Konno, C. Hirayama, H. Shinbo, M. Nakamura, *Applied Entomology and Zoology* **2009**, *44*, 595.
- [134] T. Thibaut, A. Meinesz, *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **2000**, *323*, 477.
- [135] G. Cimino, A. Crispino, V. Dimarzo, M. Gavagnin, J. D. Ros, *Experientia* **1990**, *46*, 767.
- [136] V. J. Paul, W. Fenical, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3053.
- [137] A. J. Blackman, R. J. Wells, *Tetrahedron Letters* **1978**, 3063.
- [138] I. Maier, M. Calenberg, *Botanica Acta* **1994**, *107*, 451.
- [139] S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Analytical Biochemistry* **1989**, *182*, 319.
- [140] Y. Rew, S. Malkmus, C. Svensson, T. L. Yaksh, N. N. Chung, P. W. Schiller, J. A. Cassel, R. N. DeHaven, J. P. Taulane, M. Goodman, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 5414.
- [141] J. D. White, J. D. Hansen, *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 1963.

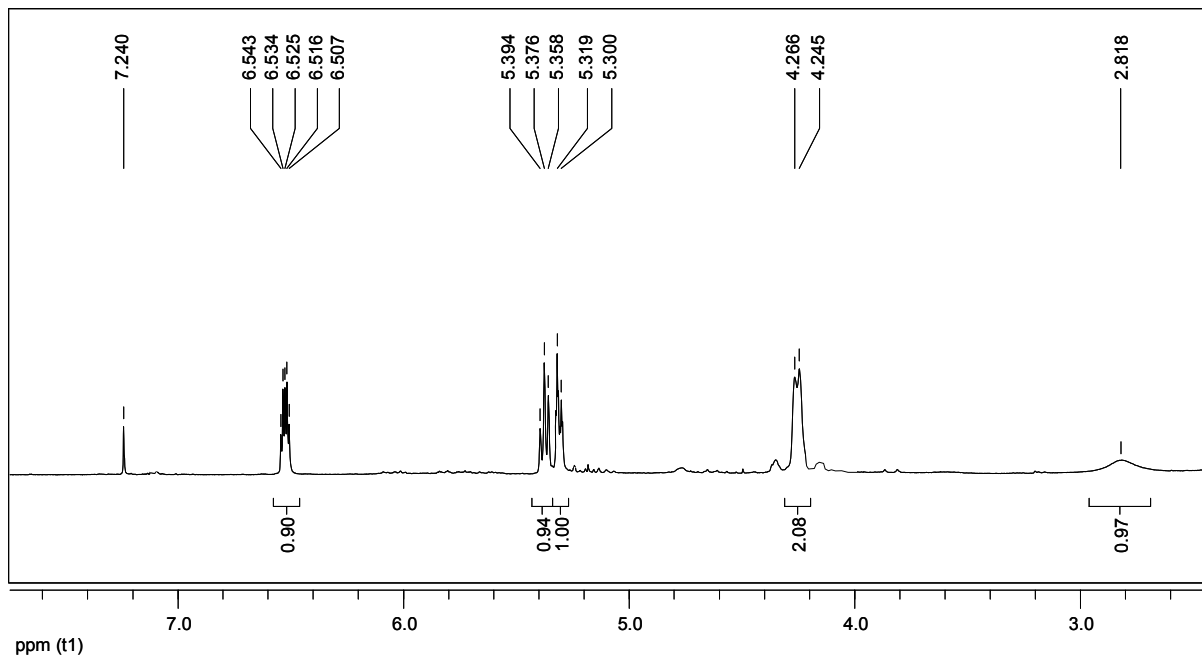
8 Anhang

8.1 Spektrenanhang

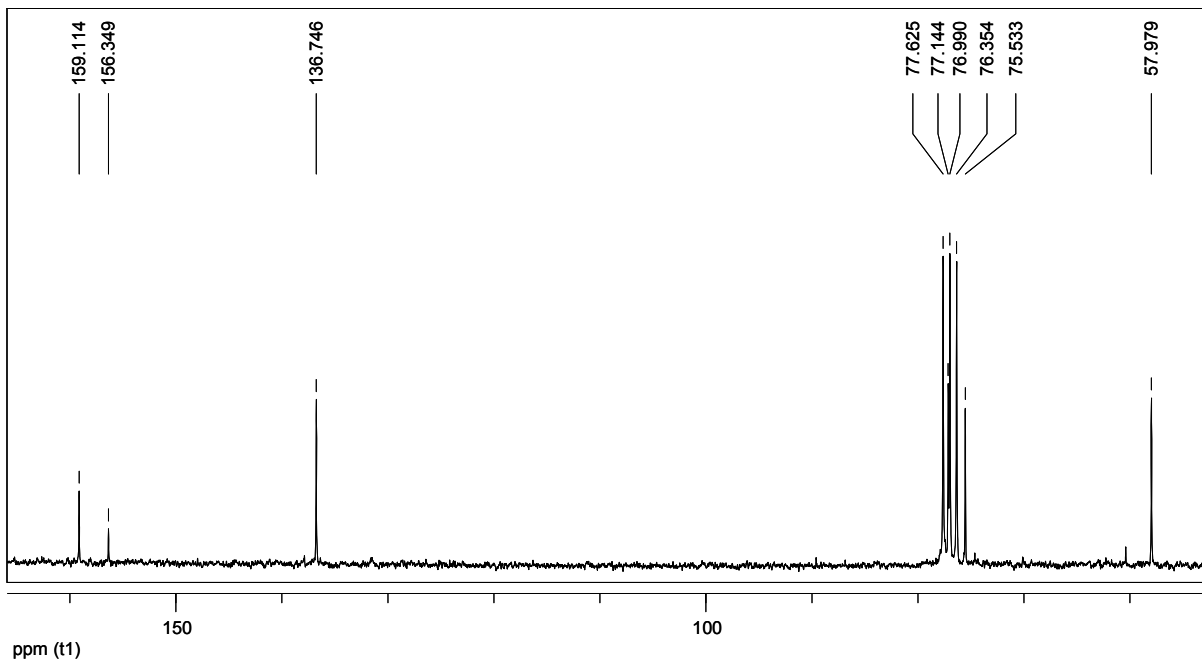
8.1.1 6-Hydroxymethyl-2,4-dioxabicyclo[3.2.0]-6-hepten-3-on (50)



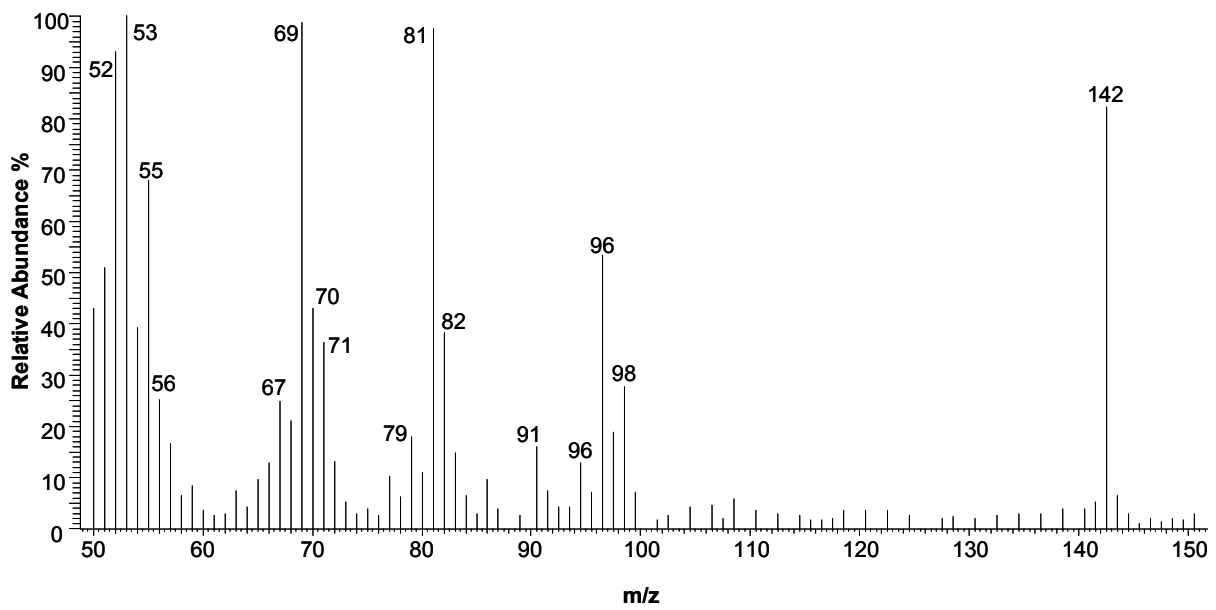
8.1.1.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 50



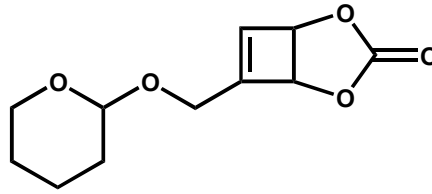
8.1.1.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 50



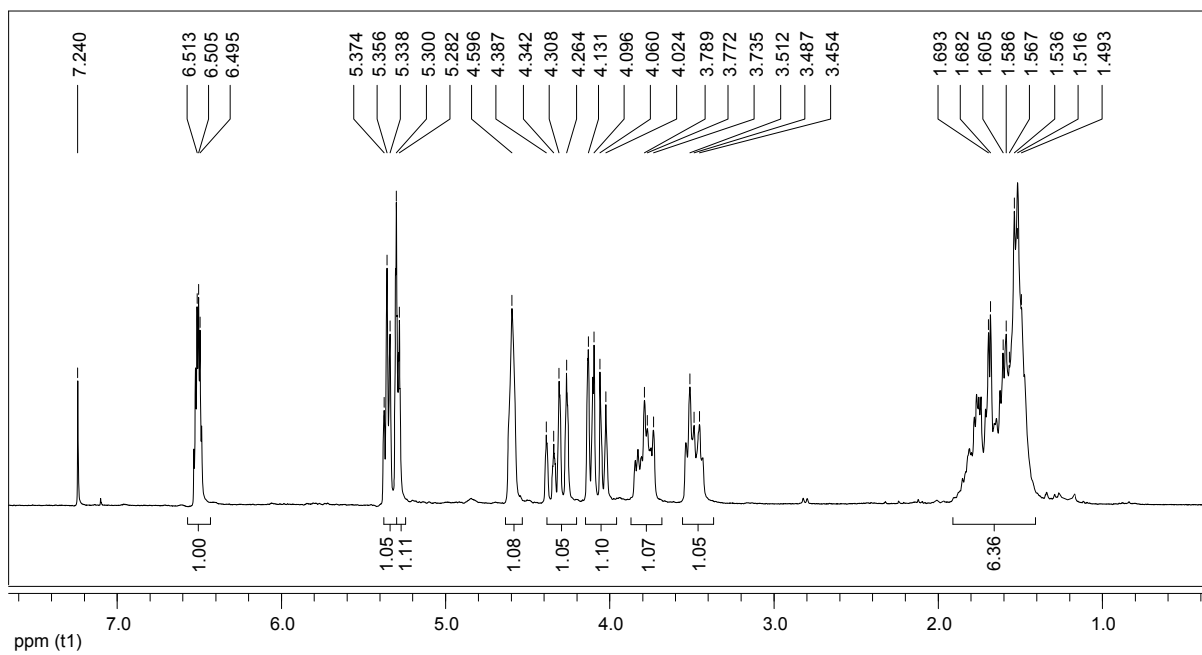
8.1.1.3 GC/EI-MS-Spektrum von 50

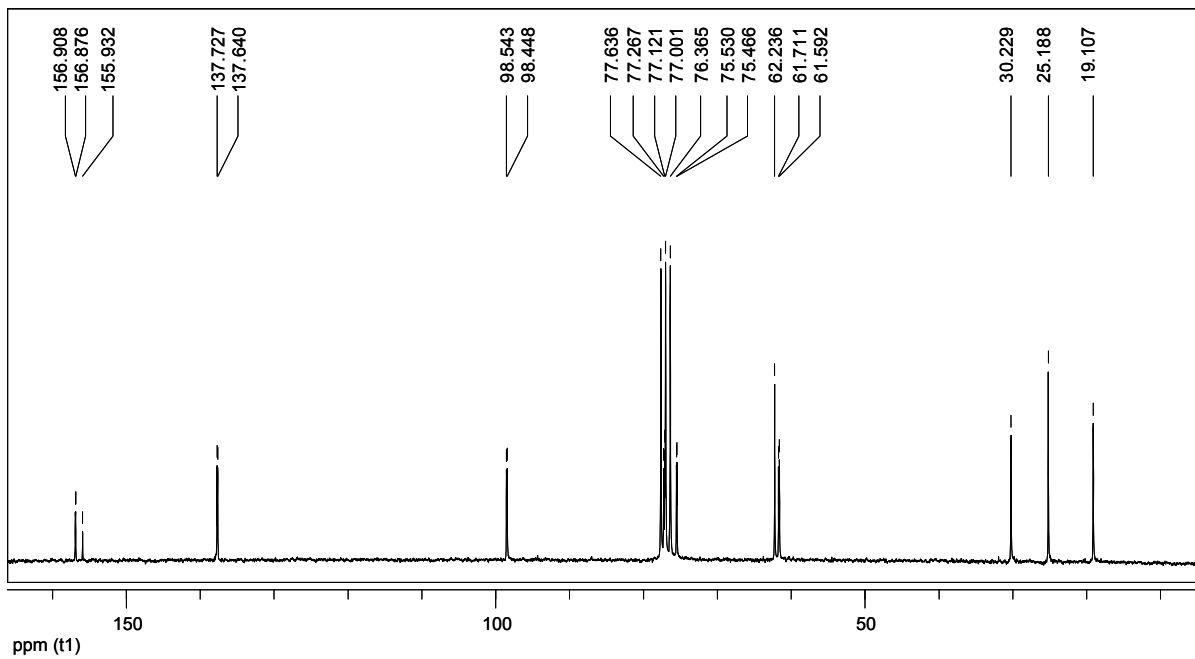


8.1.2 6-(2-Tetrahydropyranyloxymethyl)-2,4-dioxabicyclo[3.2.0]hepten-3-on (52)

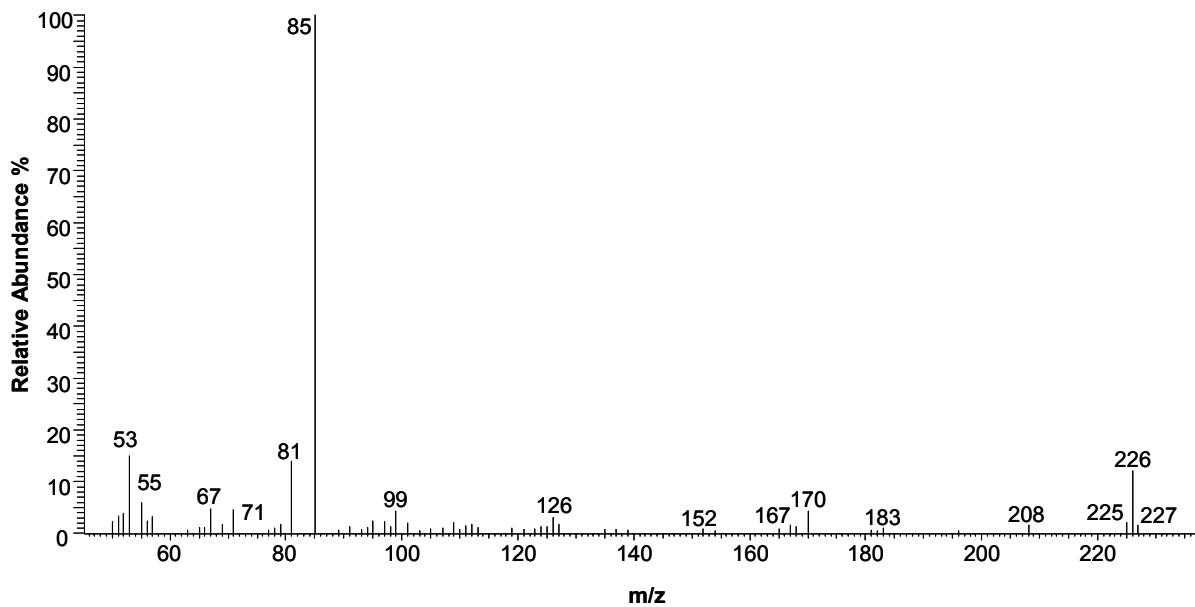


8.1.2.1 ¹H-NMR-Spektrum von 52

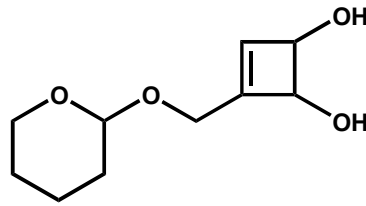
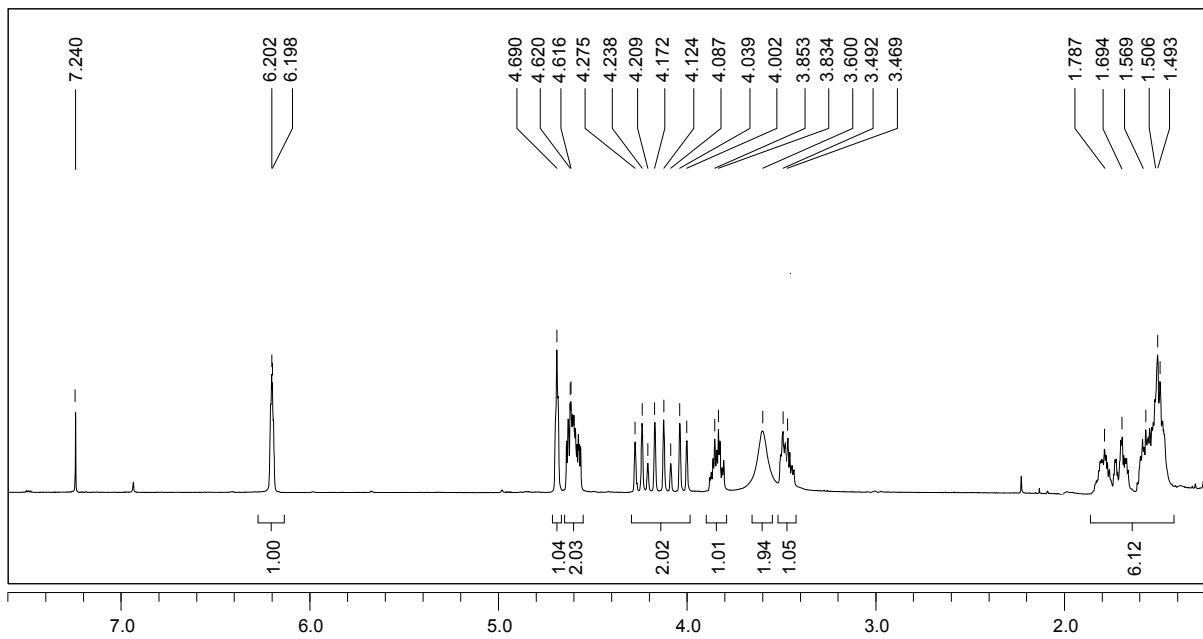


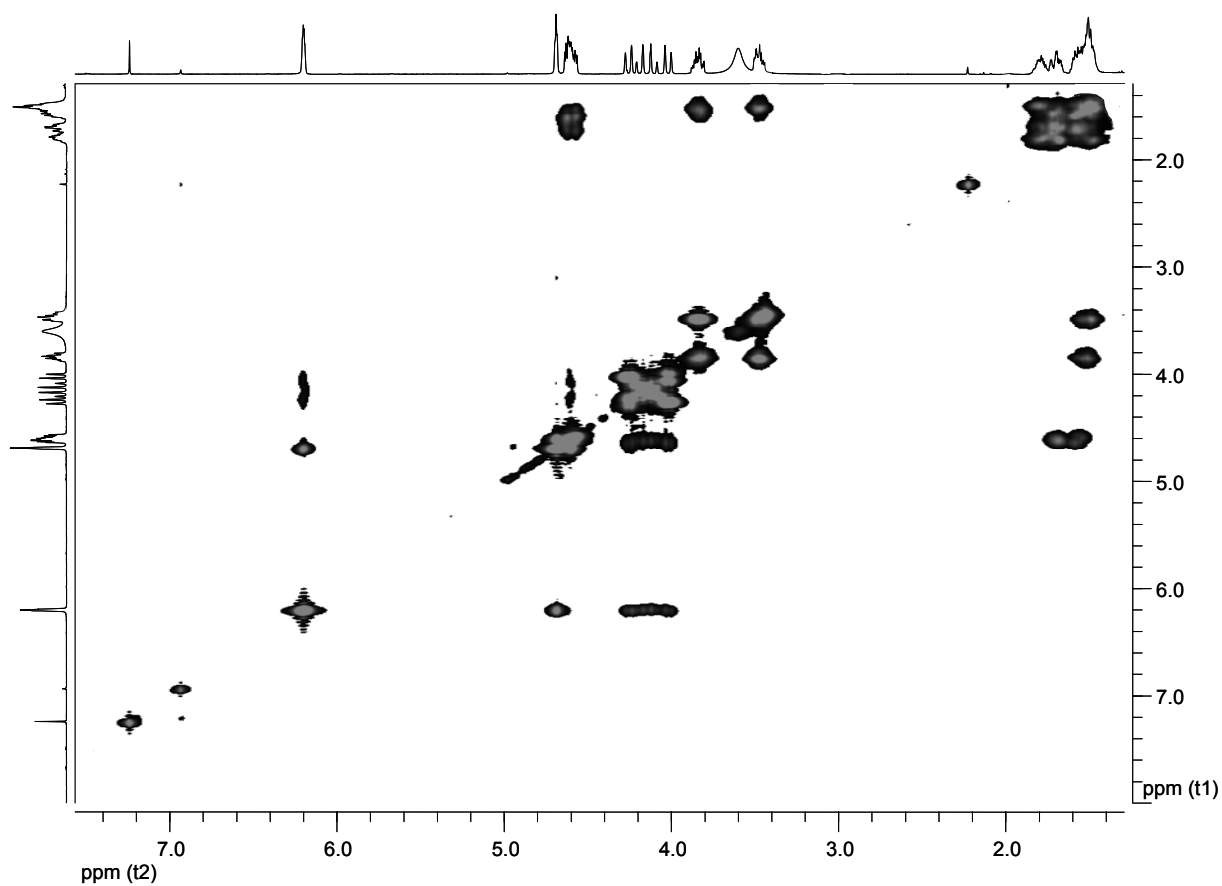
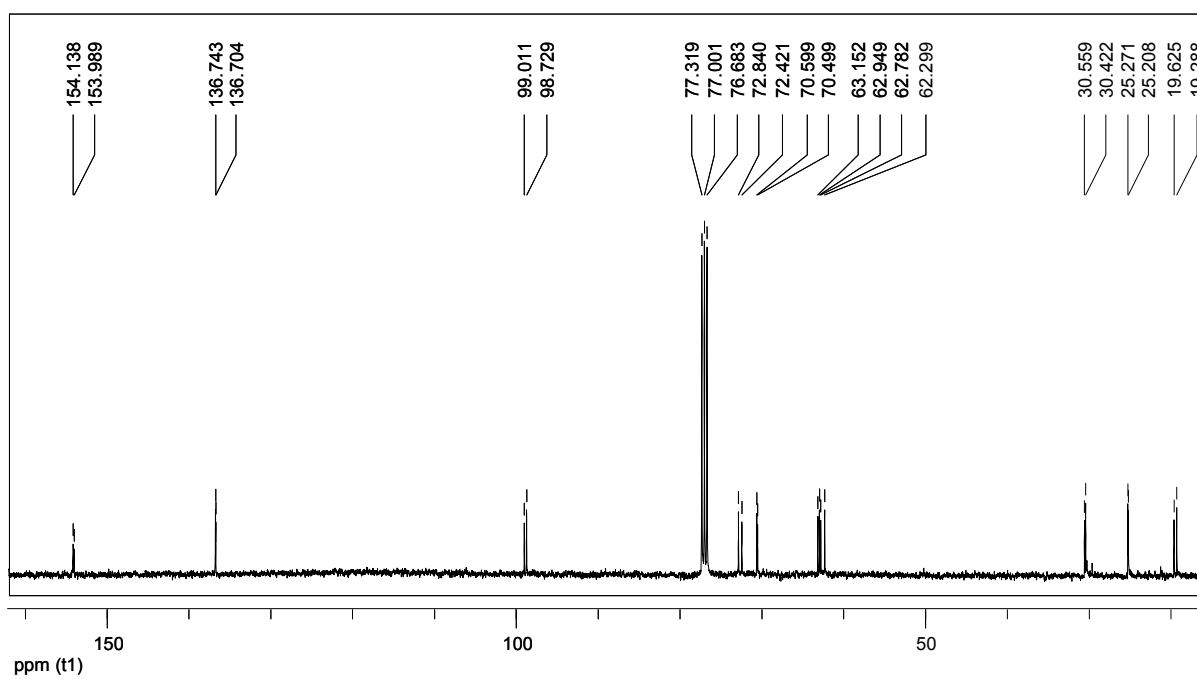
8.1.2.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 52

8.1.2.3 GC/EI-MS-Spektrum von 52

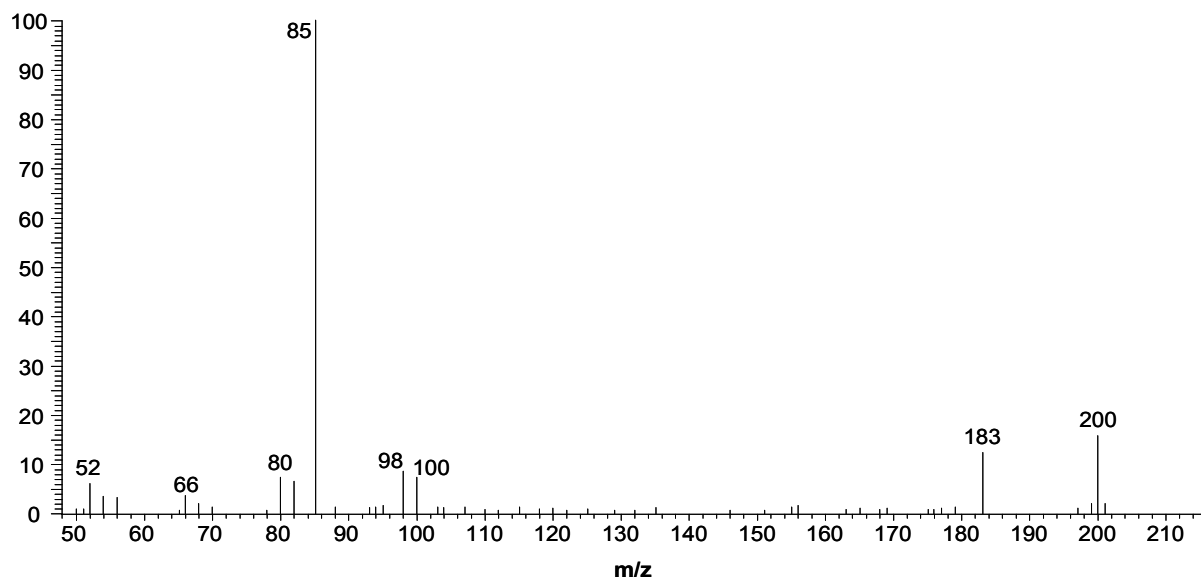


8.1.3 3-(2-Tetrahydropyranyloxymethyl)-3-cyclobuten-1,2-diol (53)

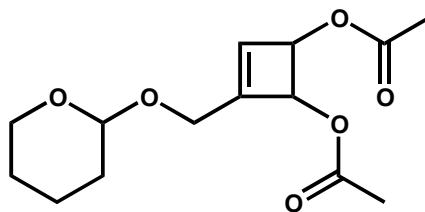
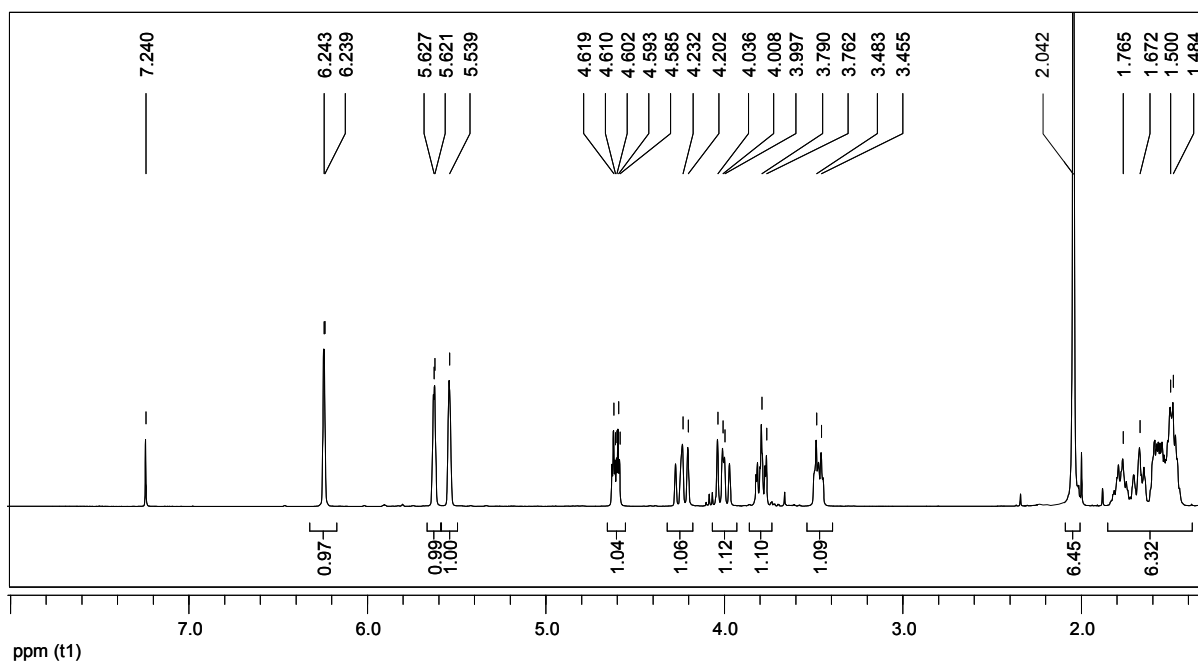
8.1.3.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 53

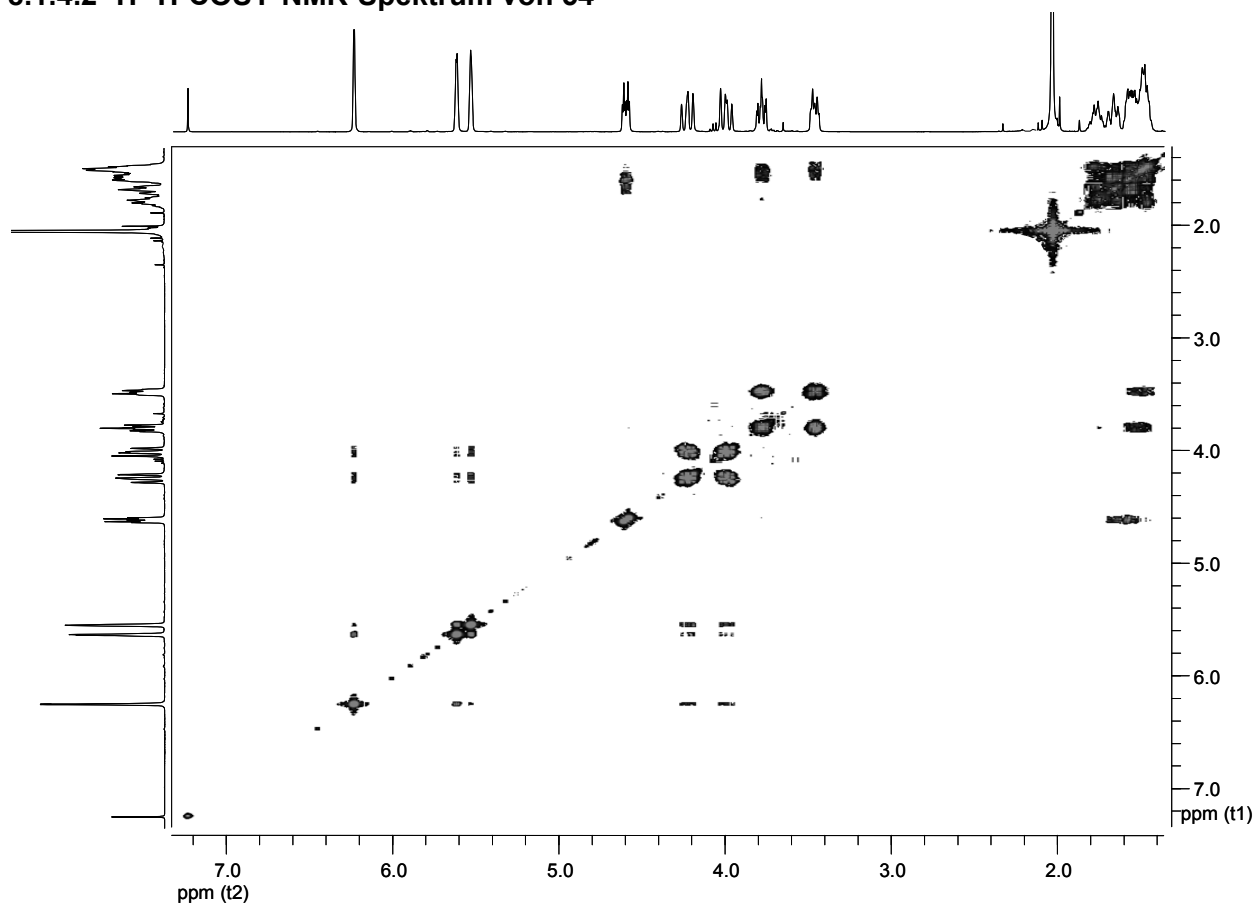
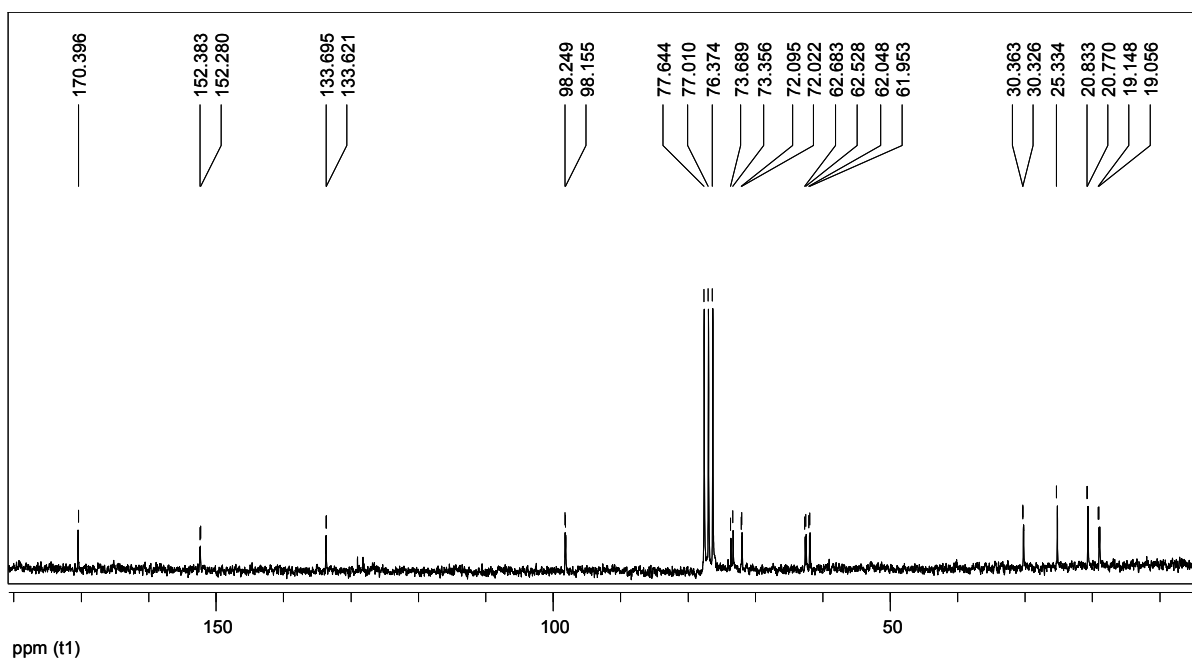
8.1.3.2 ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von 538.1.3.3 ^{13}C -NMR-Spektrum von 53

8.1.3.4 GC/EI-MS-Spektrum von 53

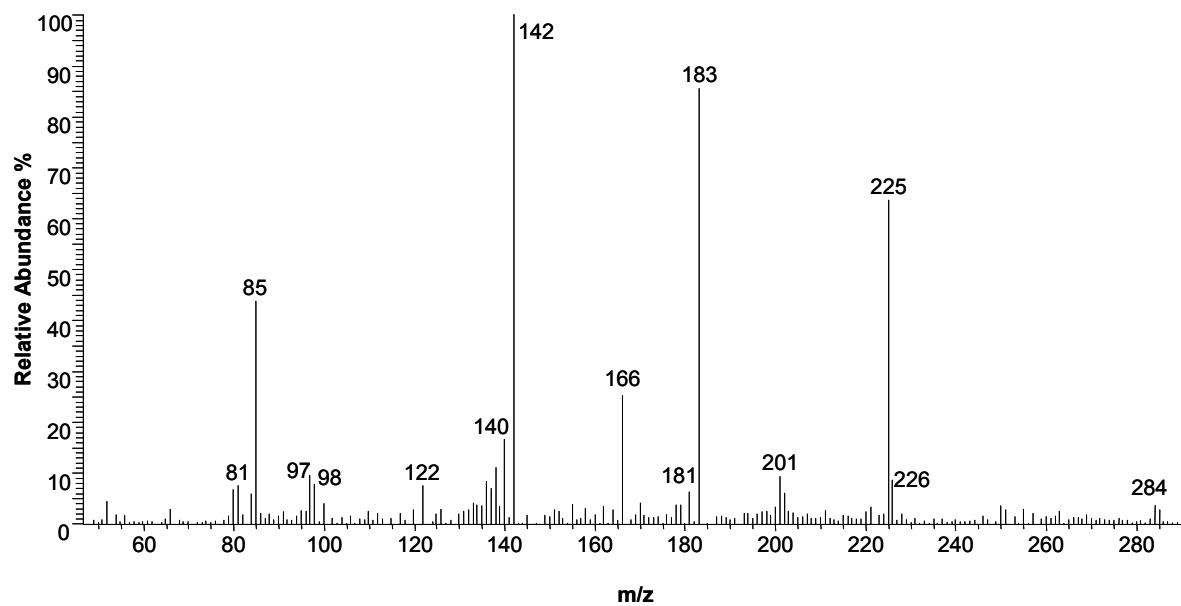


8.1.4 1,2-Diacetoxy-3-(2-tetrahydropyranoxymethyl)-3-cyclobuten (54)

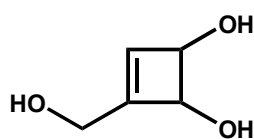
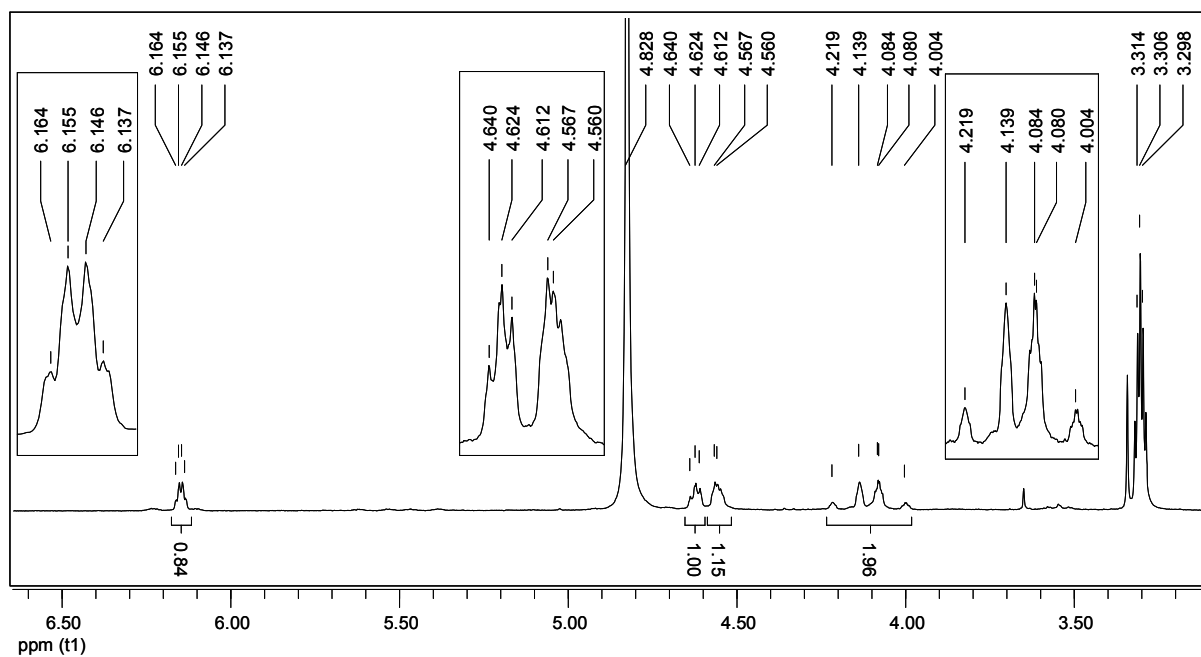
8.1.4.1 ¹H-NMR-Spektrum von 54

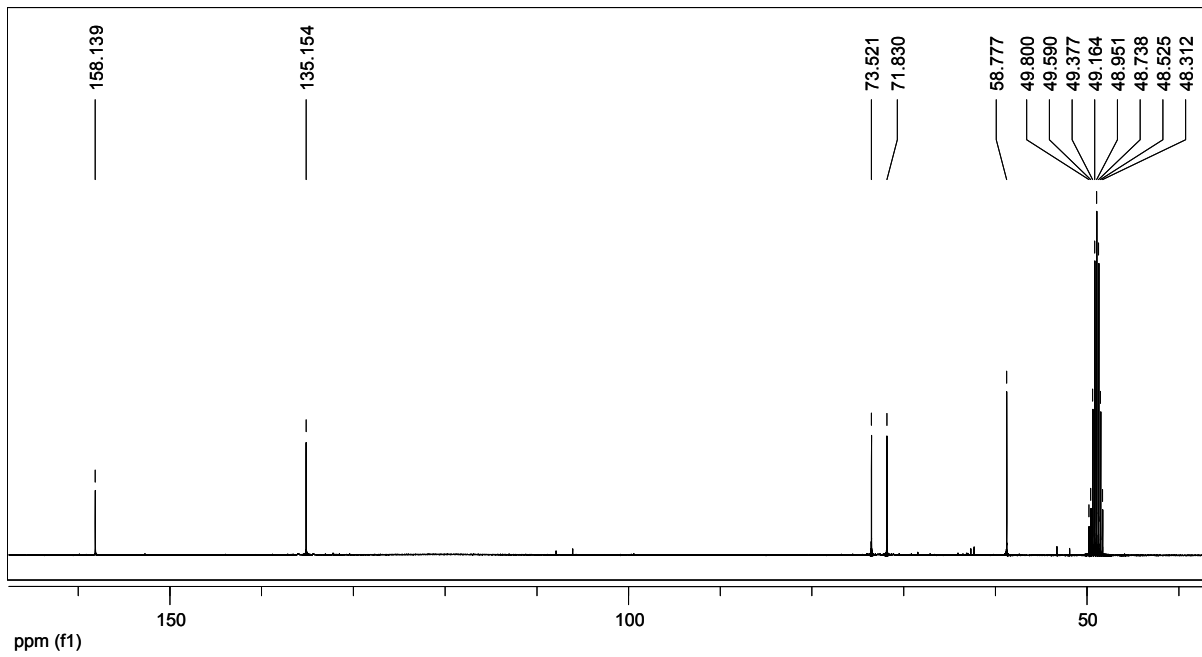
8.1.4.2 ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von 548.1.4.3 ^{13}C -NMR-Spektrum von 54

8.1.4.4 GC/EI-MS-Spektrum von 54

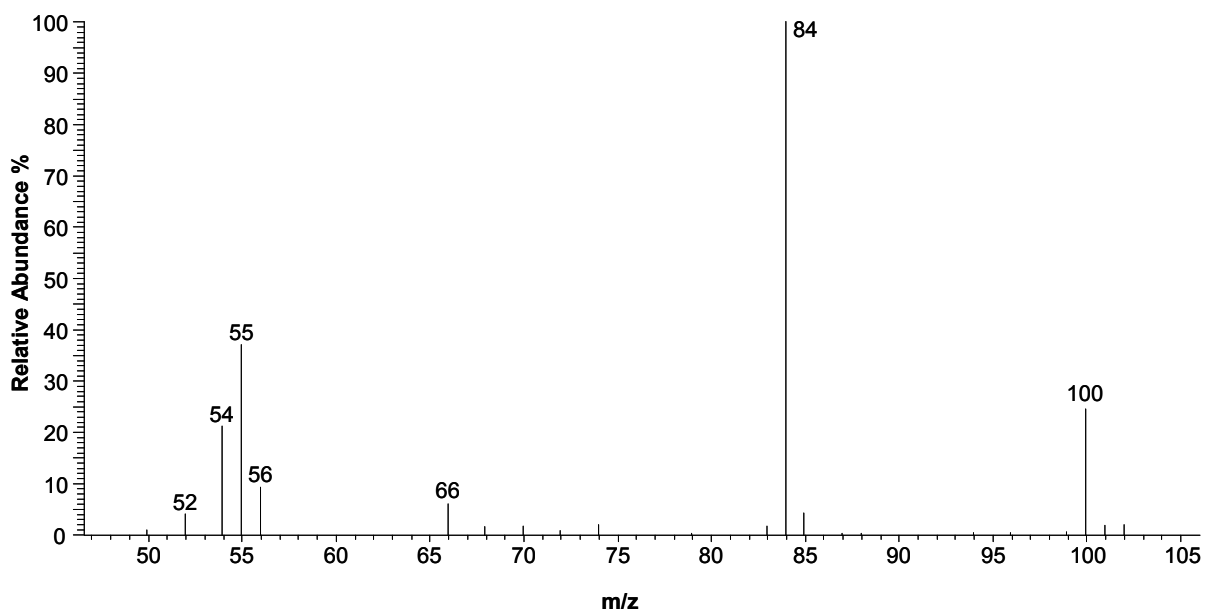


8.1.5 3-Hydroxymethyl-3-cyclobuten-1,2-diol (51)

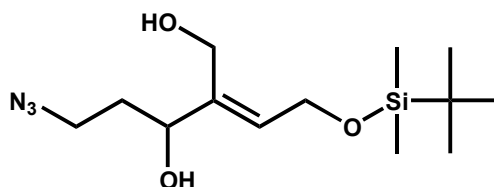
8.1.5.1 ¹H-NMR-Spektrum von 51

8.1.5.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 51

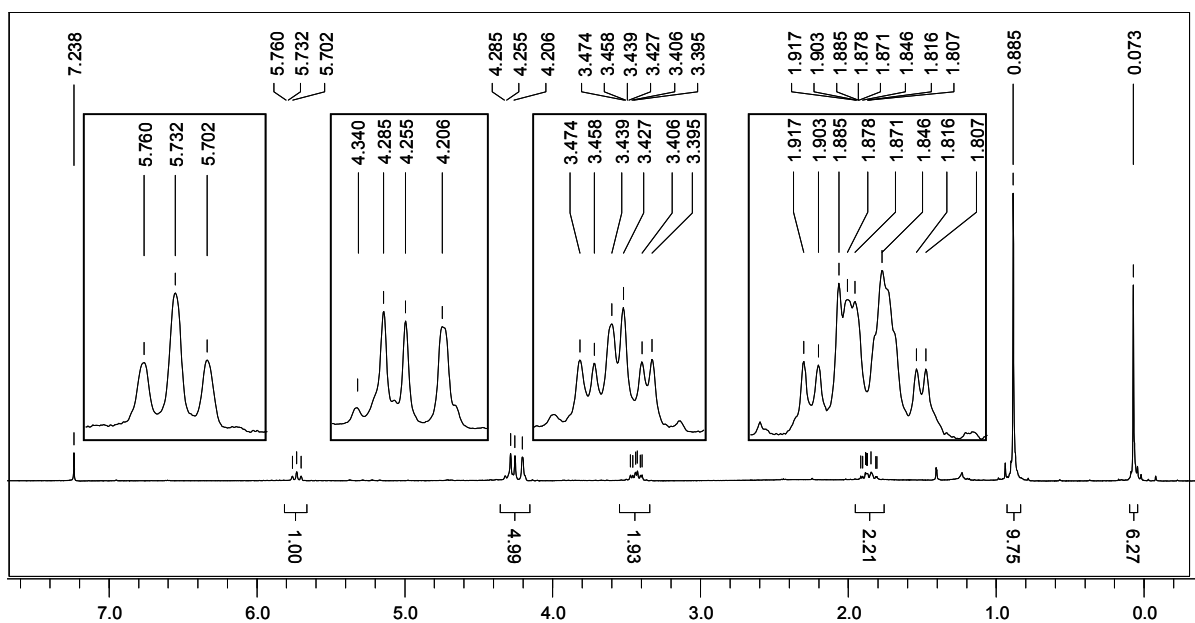
8.1.5.3 GC/EI-MS-Spektrum von 51



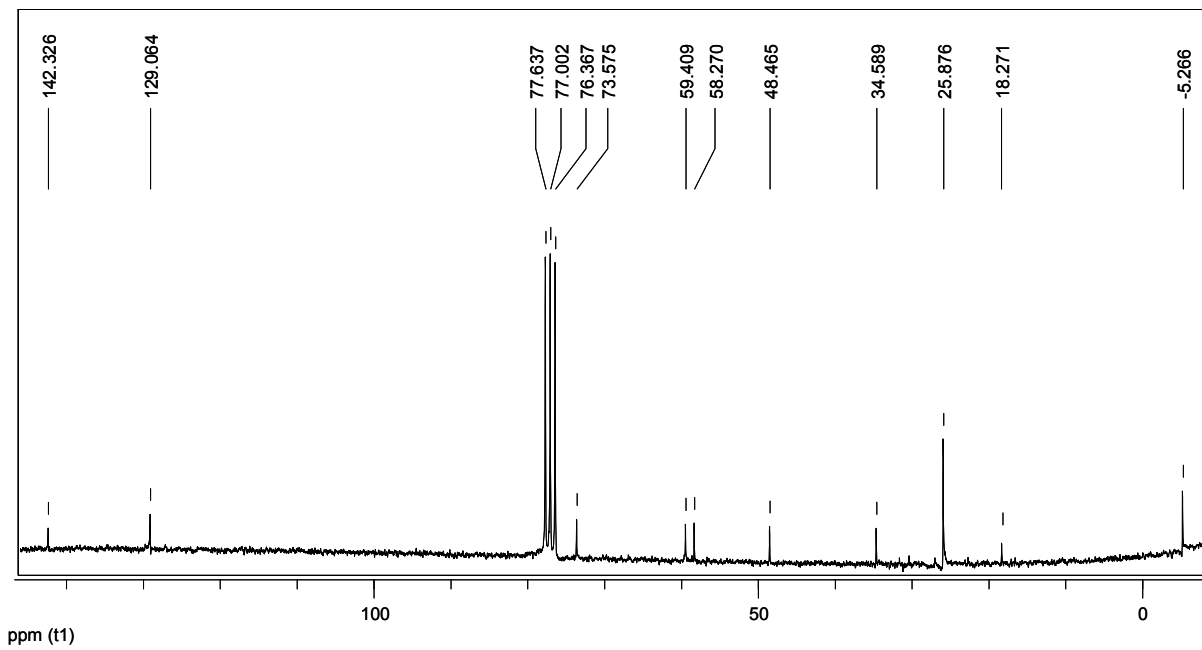
8.1.6 (E)-5-Azido-2-[2-(tert-butylidimethylsilanyloxy)-ethyliden]-pentan-1,3-diol (121)



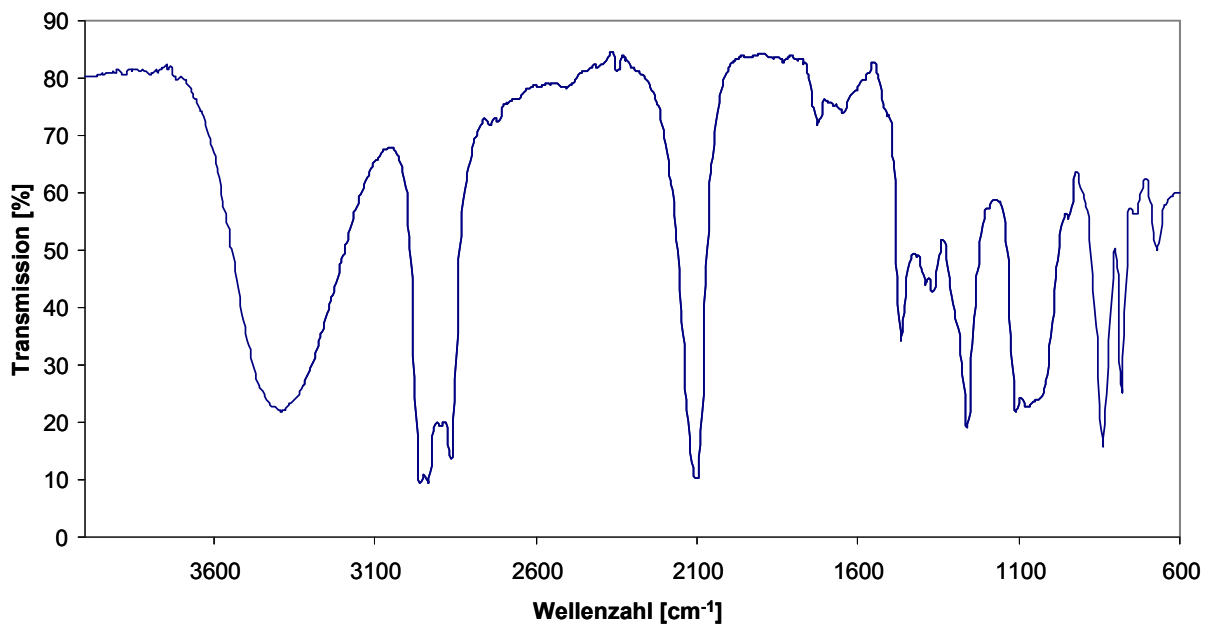
8.1.6.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 121



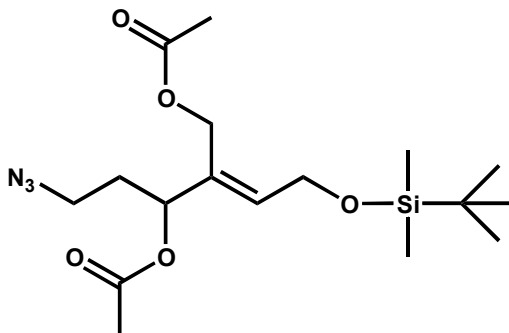
8.1.6.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 121



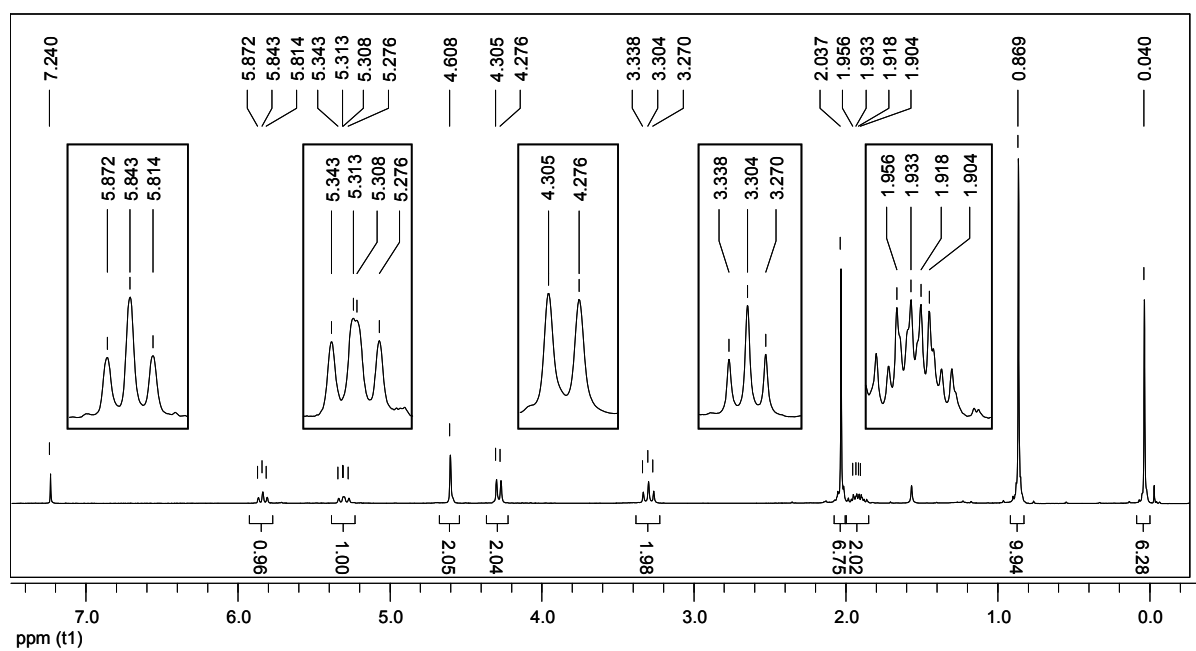
8.1.6.3 IR-Spektrum von 121



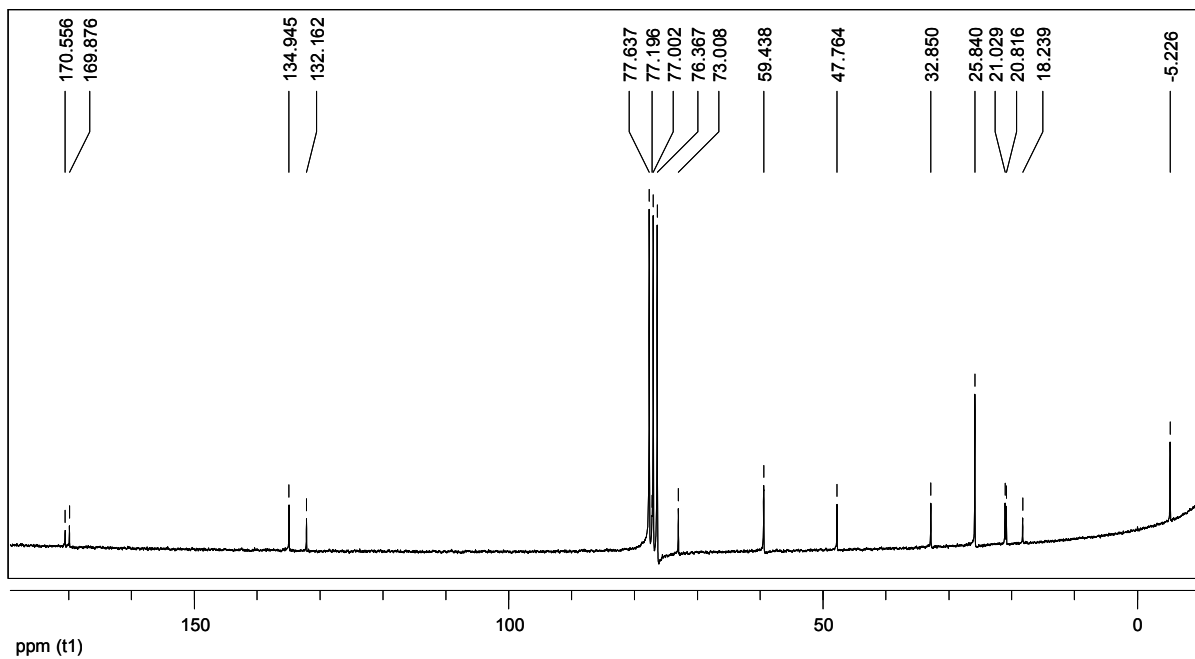
8.1.7 (E)-5-Azido-2-[2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-ethyliden]-1,3 diacetoxypentan (122)



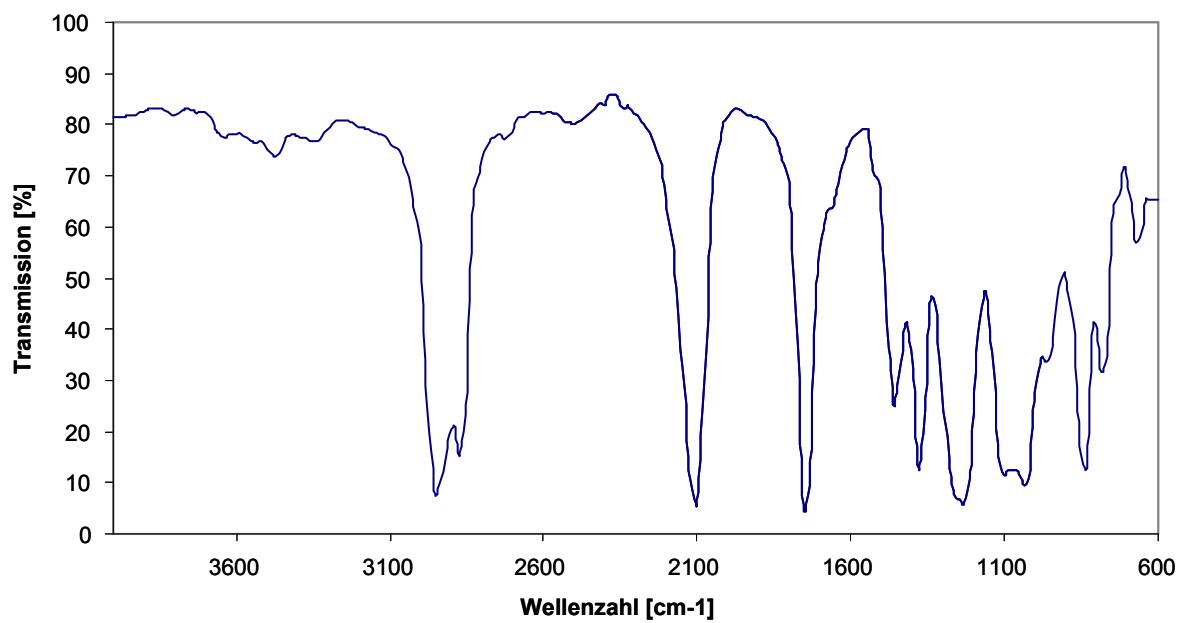
8.1.7.1 ¹H-NMR-Spektrum von 122

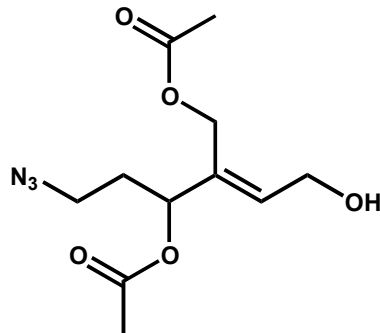
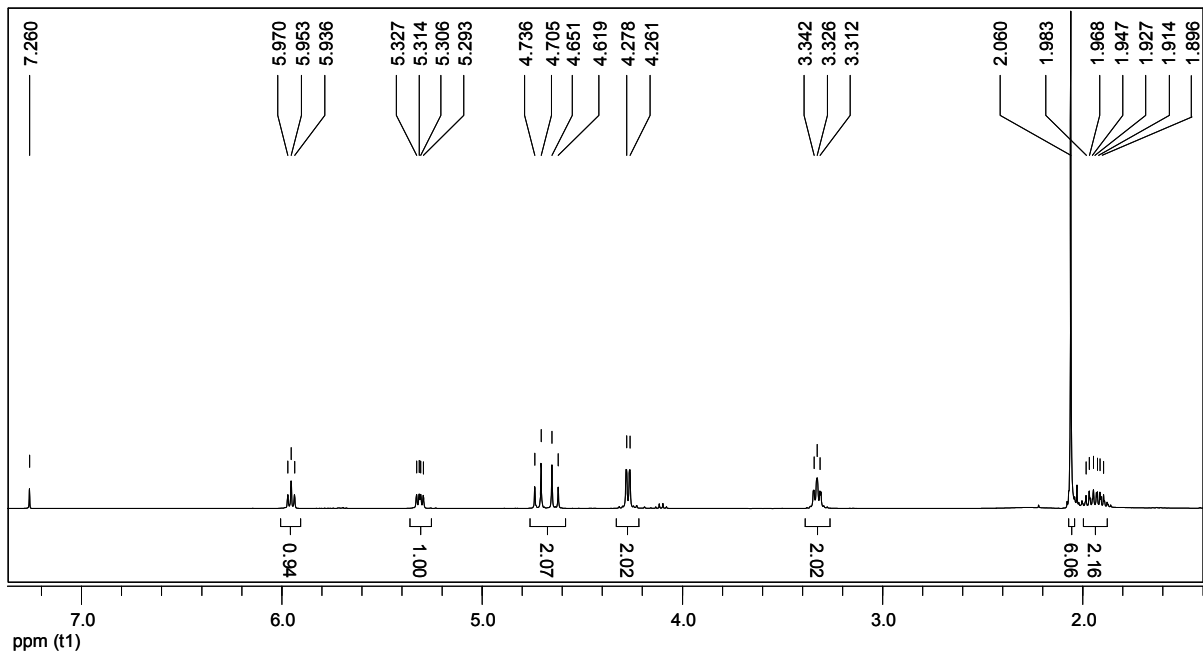


8.1.7.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 122

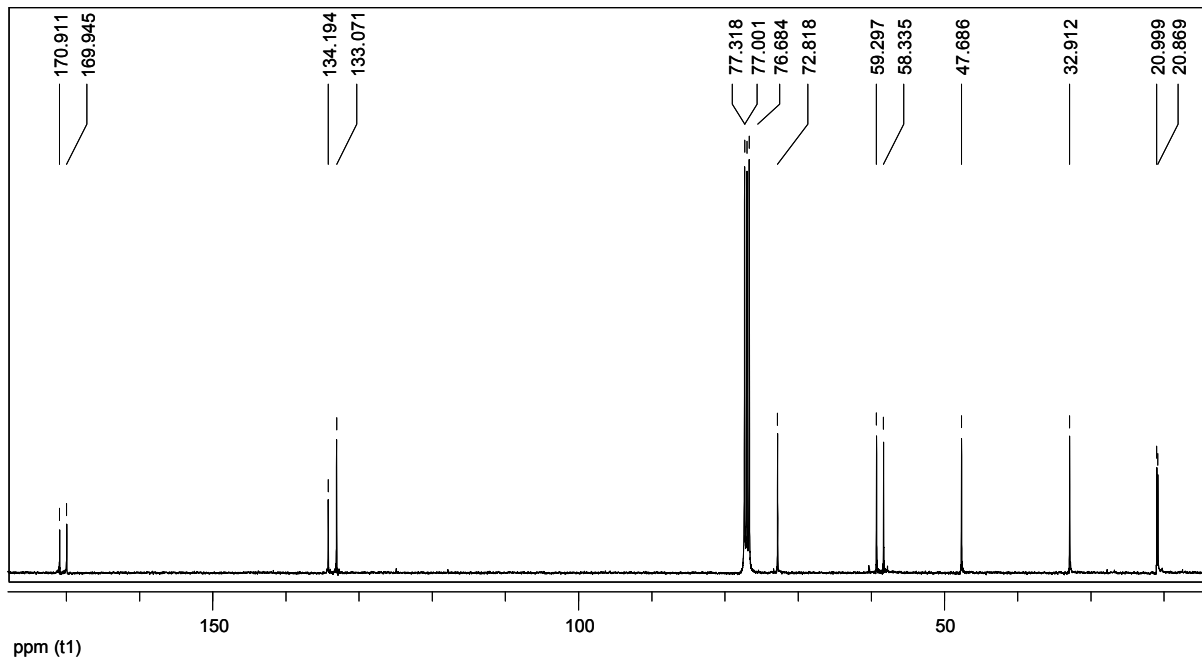


8.1.7.3 IR-Spektrum von 122

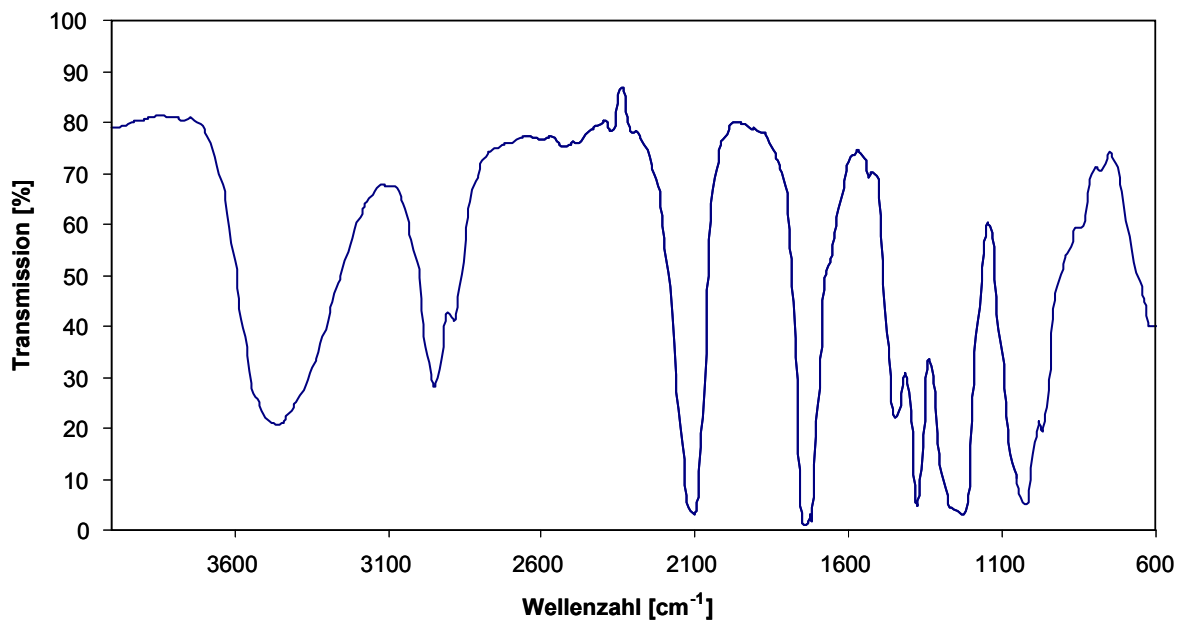


8.1.8 (*E*)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enol (123)8.1.8.1 ¹H-NMR-Spektrum von 123

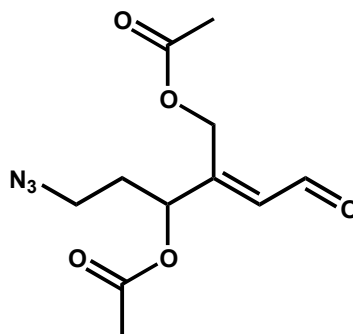
8.1.8.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 123



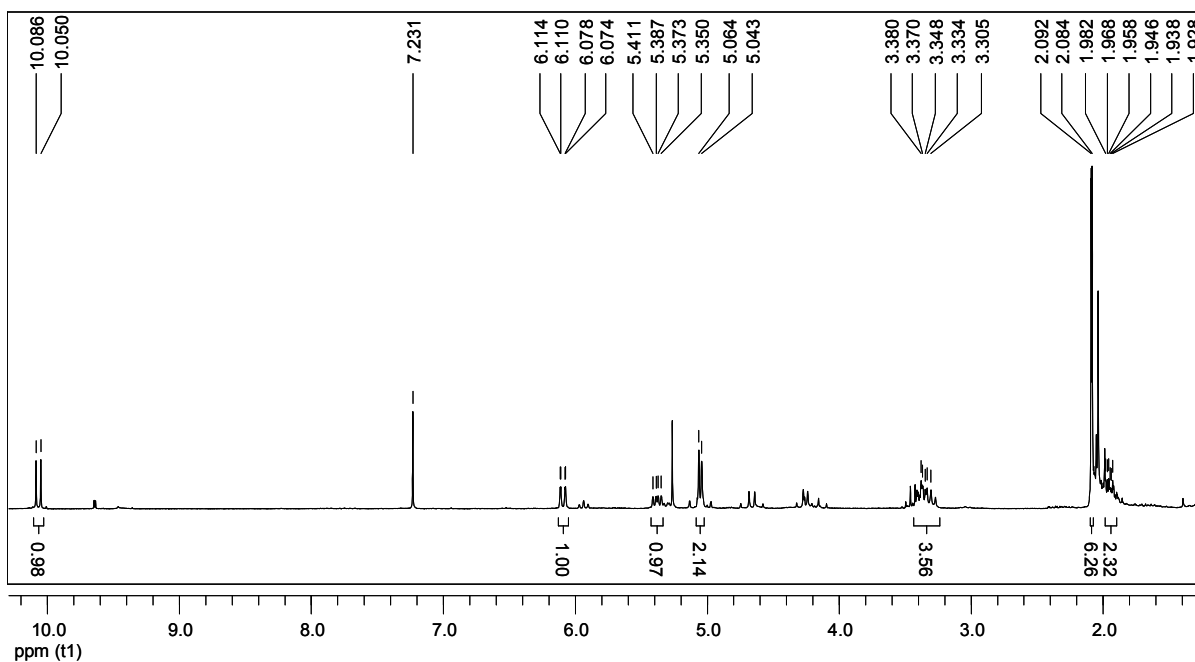
8.1.8.3 IR-Spektrum von 123



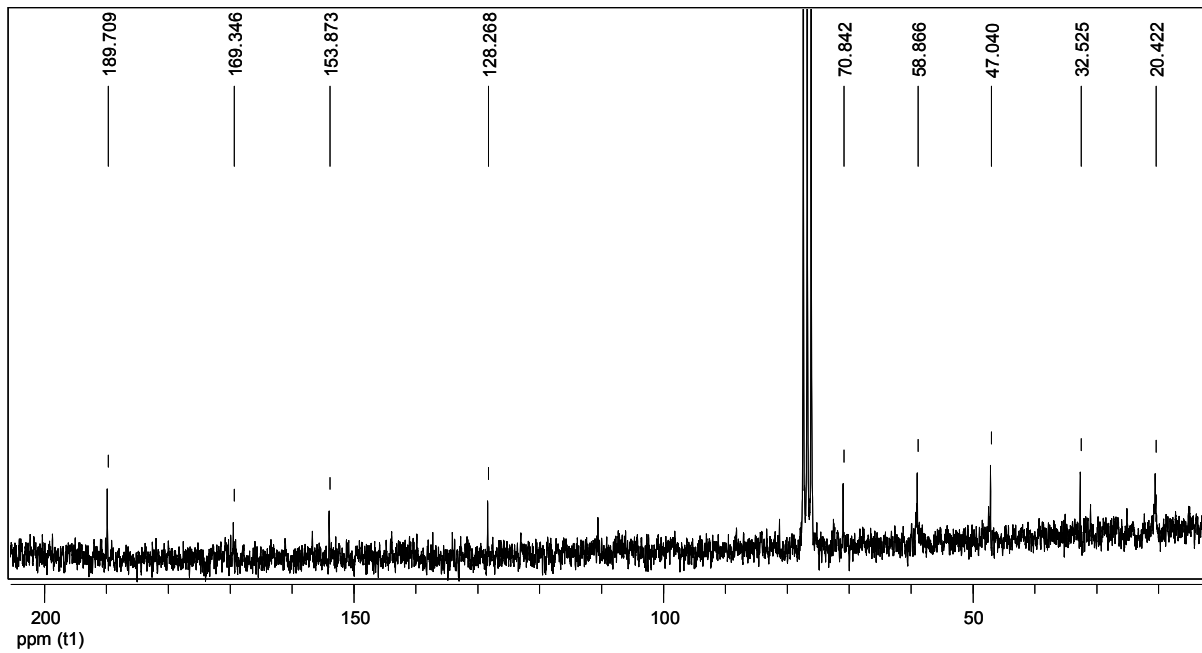
8.1.9 (E)-5-Azido-4-acetoxy-3-acetoxymethyl-hex-2-enal (125)
(Rohprodukt)



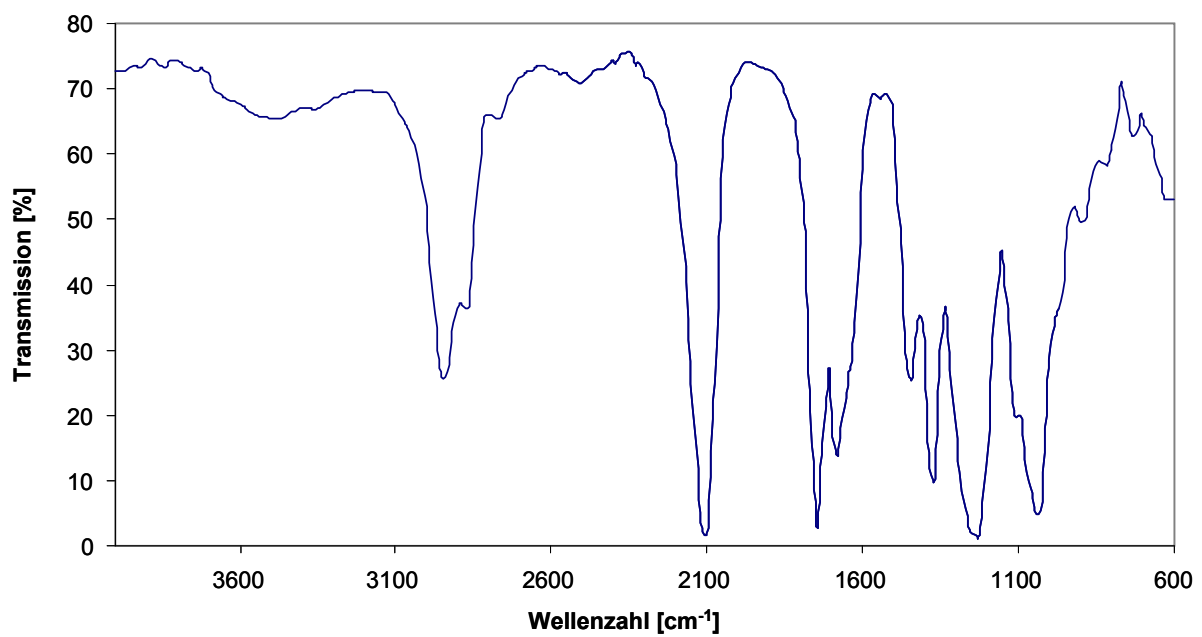
8.1.9.1 ¹H-NMR-Spektrum von 125 (Rohprodukt)



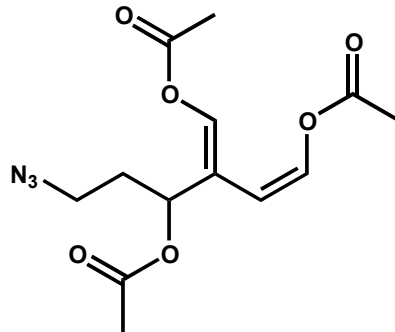
8.1.9.2 ^{13}C -NMR-Spektrum von 125 (Rohprodukt)



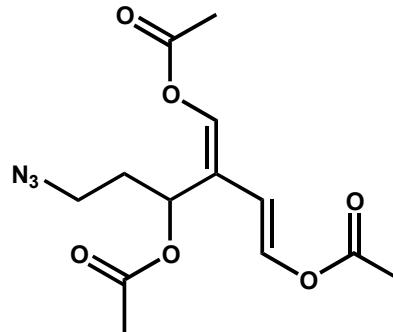
8.1.9.3 IR-Spektrum von 125 (Rohprodukt)



8.1.10 (1*E/Z*, 3*Z*) Essigsäure-4-acetoxy-2-(1-acetoxy-3-azidopropyl)-buta-1,3-dienyl ester (126 + 127)

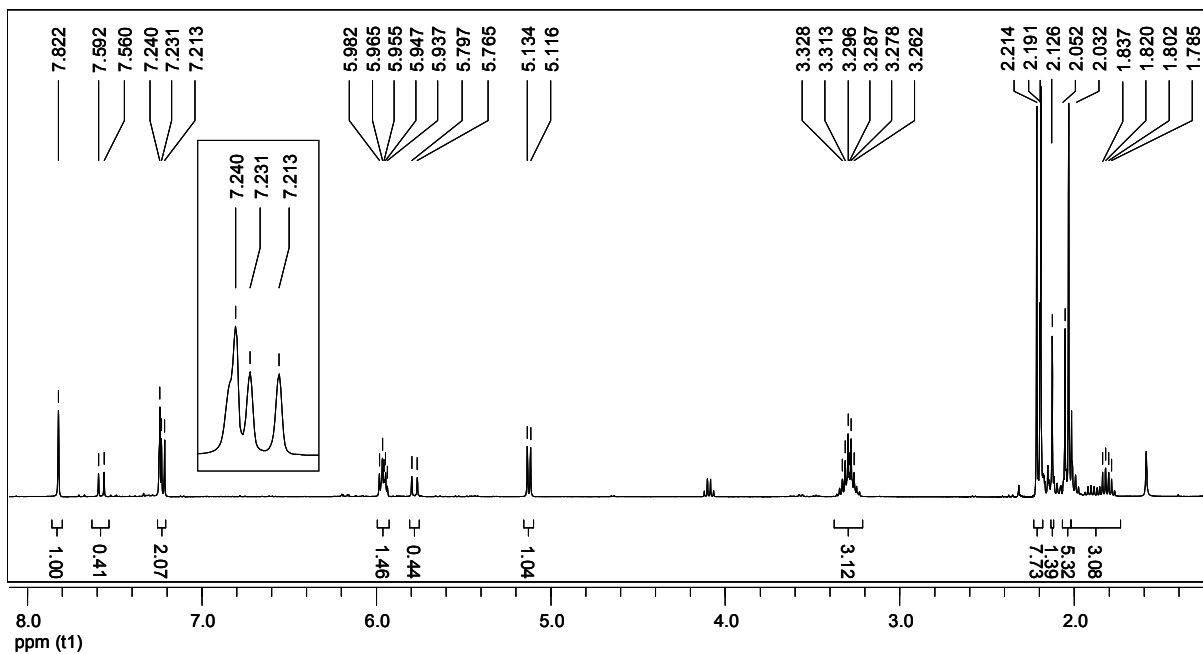


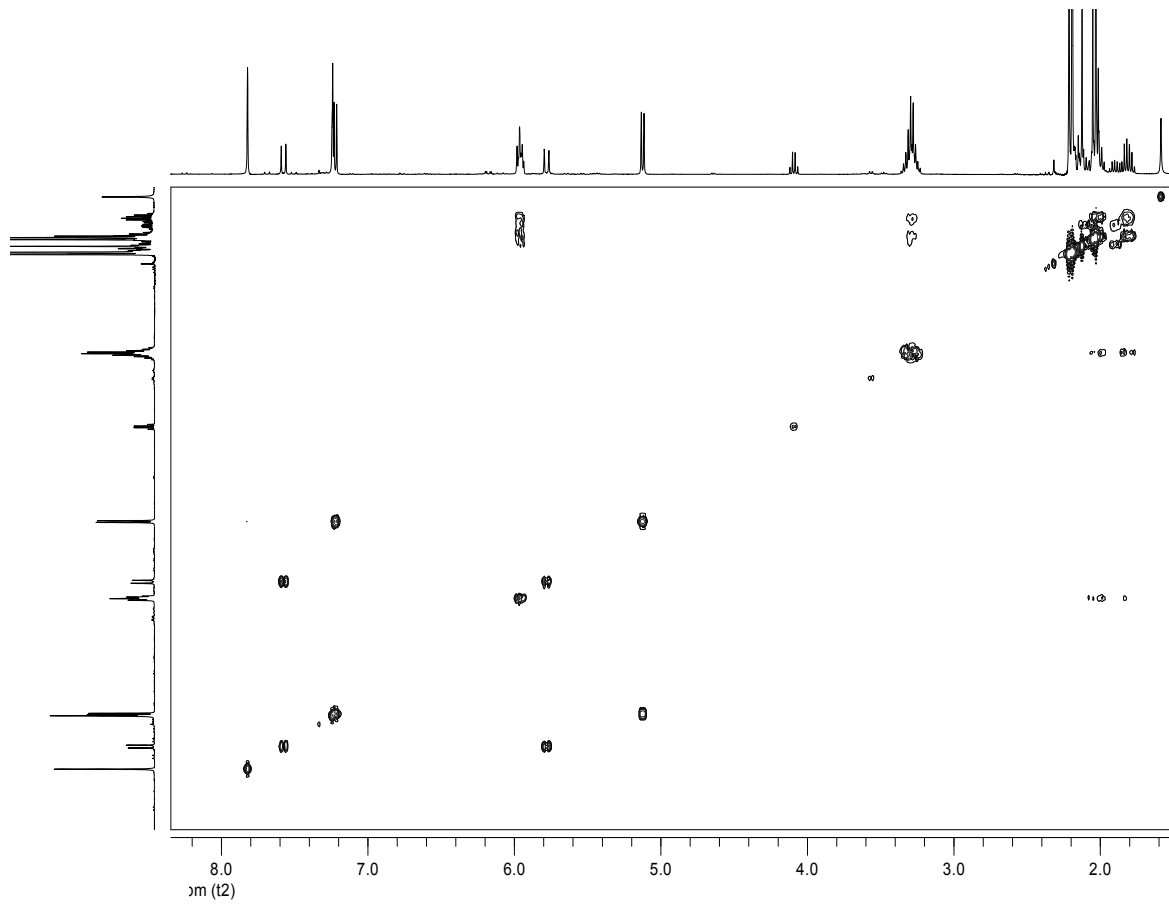
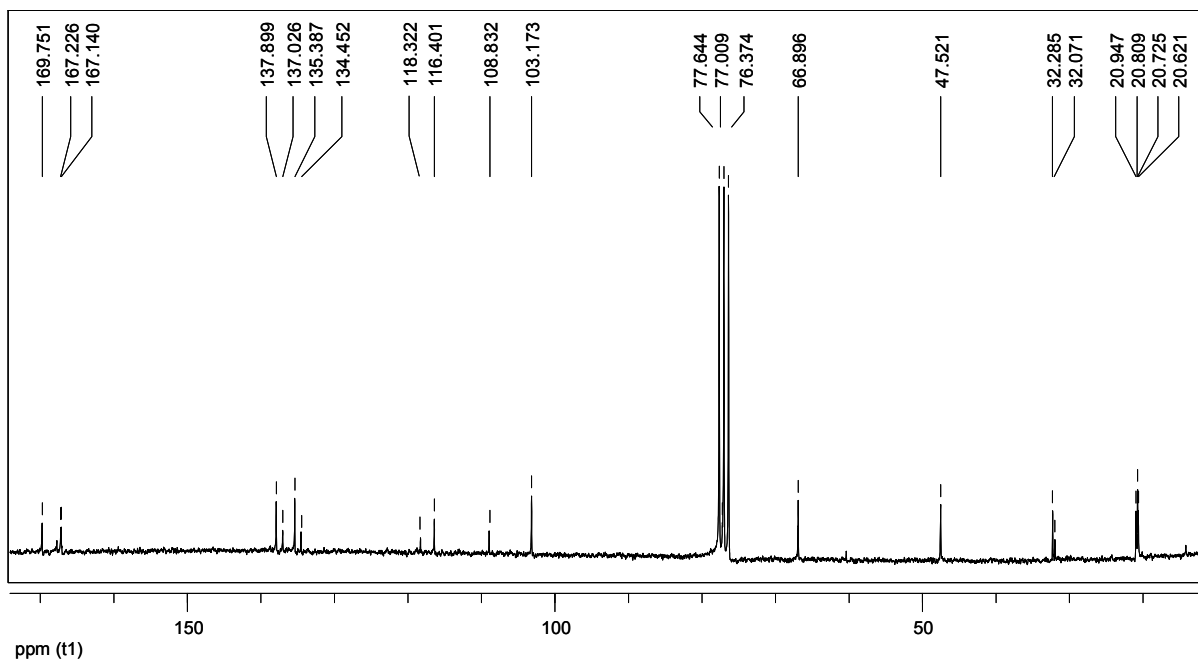
126

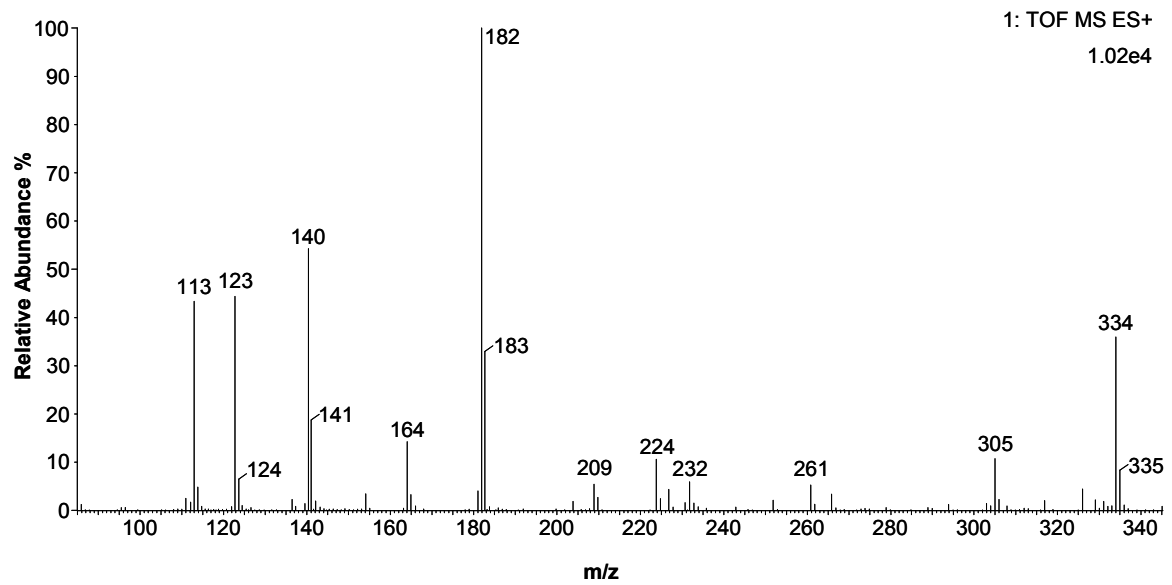
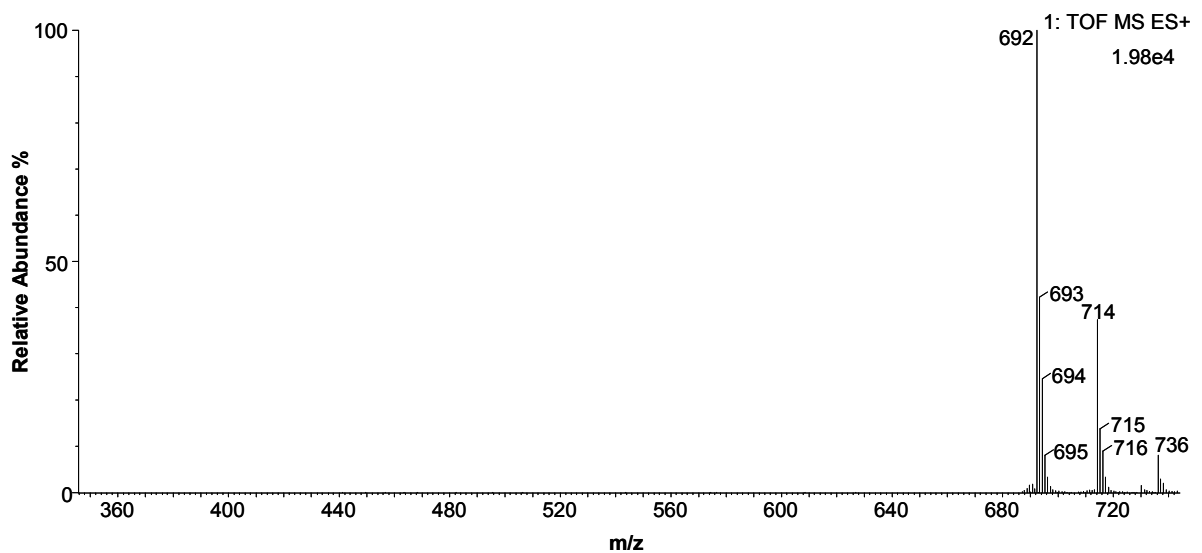


127

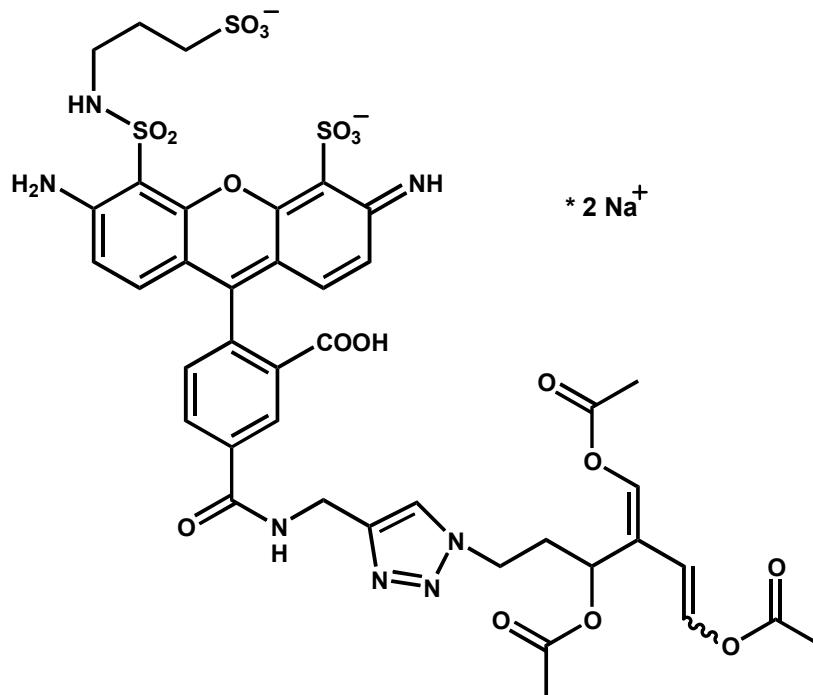
8.1.10.1 ¹H-NMR-Spektrum von 126 + 127



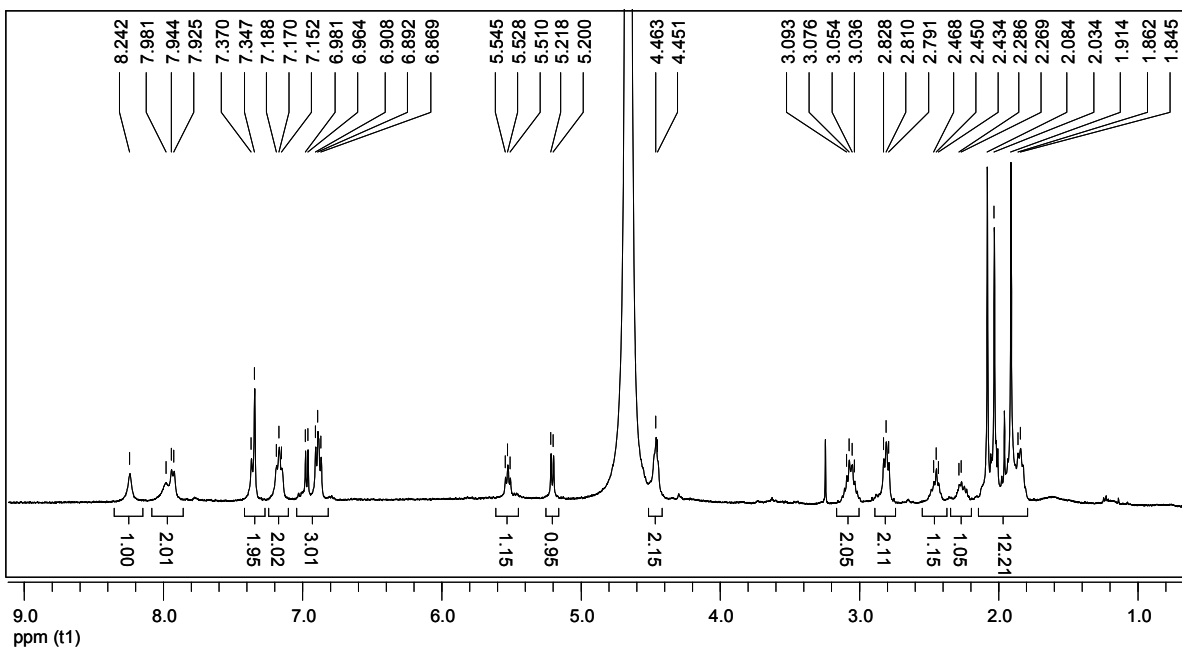
8.1.10.2 ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von 126 + 1278.1.10.3 ^{13}C -NMR-Spektrum von 126 + 127

8.1.10.4 UPLC/ESI-MS-Spektrum von 126 + 127 (positiver Modus)**8.1.11 DY™-490-Propargylamid (130)****UPLC/ESI-MS-Spektrum von 130 (positiver Modus)**

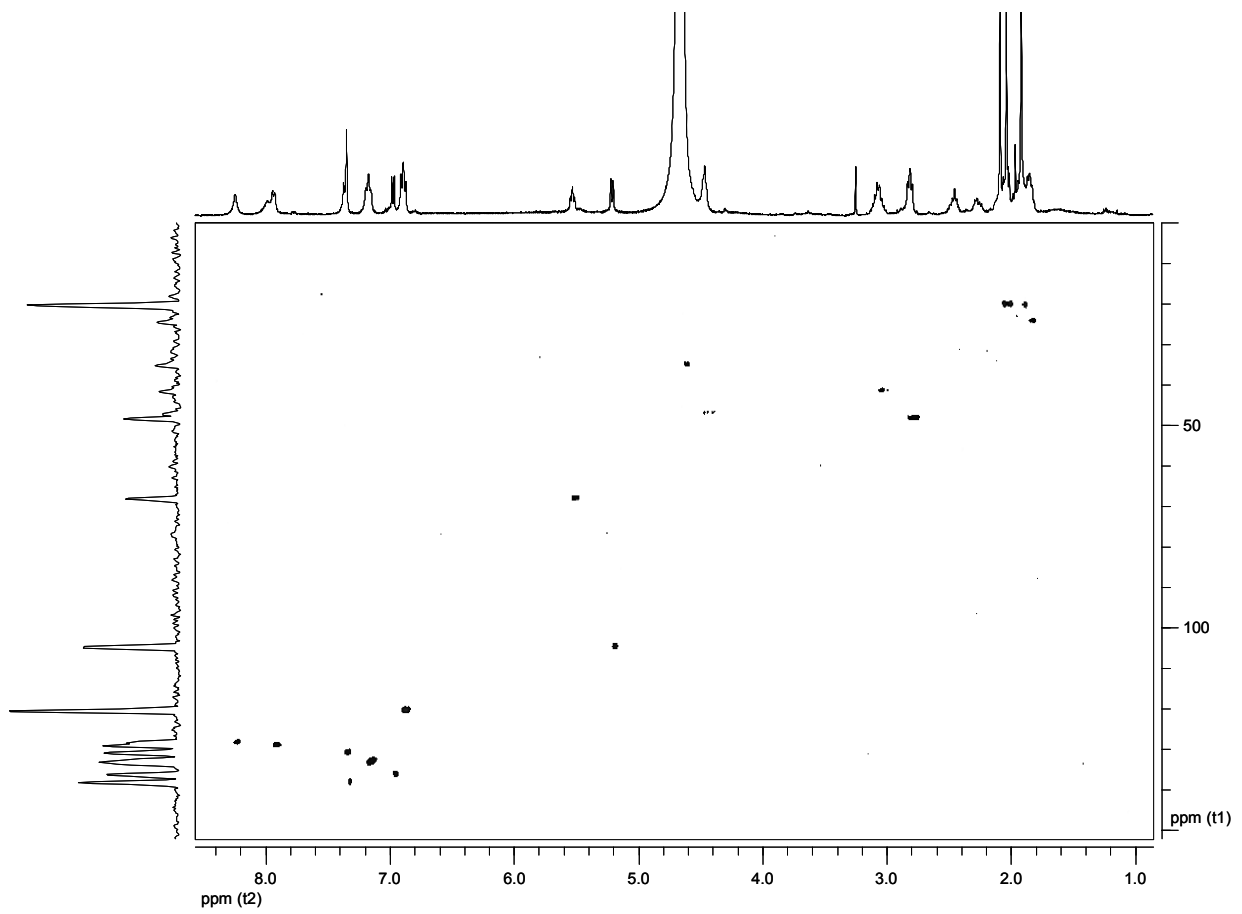
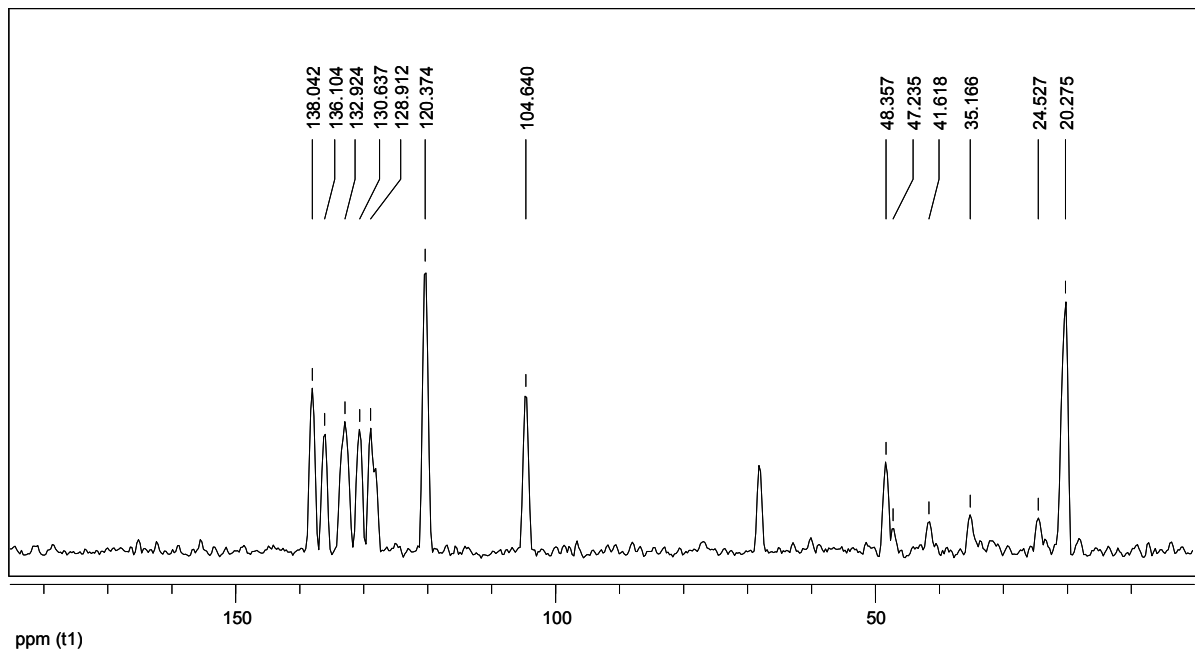
**8.1.11 (1E/Z, 3Z) N-(DY™490)-Essigsäure-4-acetoxy-2-[1-acetoxy-3-(4-aminomethyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-propyl]-buta-1,3-dienylester
DY™-490-Bisenoylacetat) (131)**



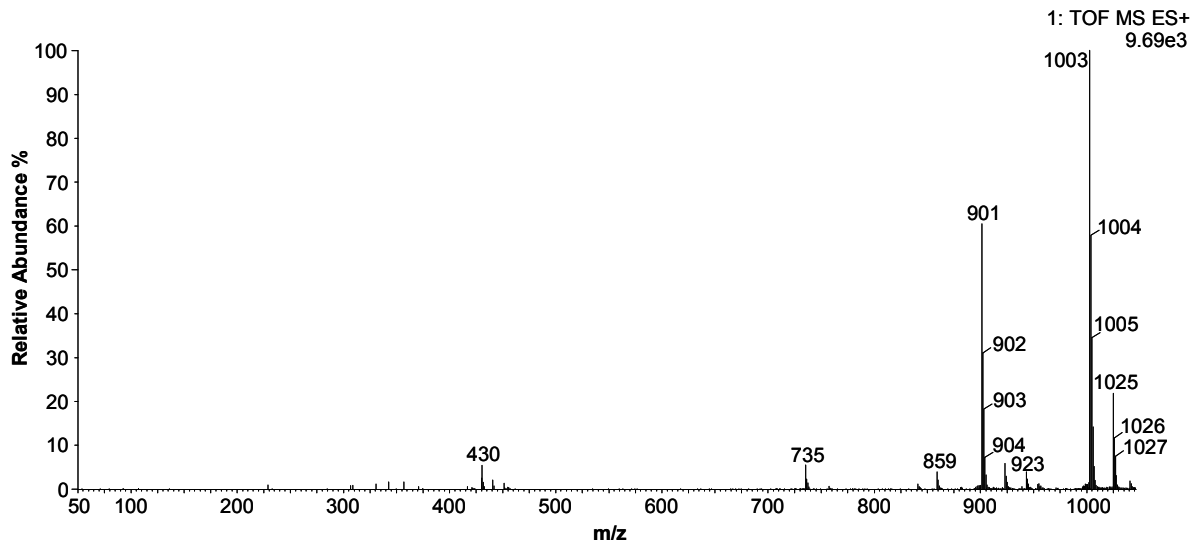
8.1.11.1 ¹H-NMR-Spektrum von 131



8.1.11.2 HSQC-NMR-Spektrum von 131

8.1.11.3 ^{13}C -Projektion des HSQC-NMR-Spektrum von 131

8.1.11.4 UPLC/ESI- MS-Spektrum von 131 (positiver Modus)



Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. Georg Pohnert bedanken, für die interessante Aufgabenstellung und die Unterstützung in Lausanne und in Jena. Ich danke für die vielen Hilfestellungen, die ständige Diskussionsbereitschaft, seine konstruktive Kritik und vor allem für seine Geduld, die es mir ermöglichten Promotion und Familie unter einen Hut bringen zu können. Danke für die großartige Zeit in Jena, Lausanne und in Florida.

Ich bedanke mich besonders bei:

Dr. Sven Adolph, der mit seiner ausgezeichneten Vorarbeit zu diesem Thema maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat und mir dabei geholfen hat, mich in Lausanne einzugewöhnen.

Theresa Wiesemeier, für die Hilfestellung bei den Bioassays und das Bereitstellen von Versuchstieren.

Matthew Welling, für die Hilfestellung mit der UPLC/MS, die verbissen ausgetragenen Kickerspiele und die vielen Diskussionen, die alle nichts mit der Laborarbeit zu tun hatten.

Charles Vidoudez für die Hilfe bei den SDS-PAGE-Analysen, für Übersetzungshilfen beim Umgang mit Schweizer Bürokratie und den Austausch von DVDs.

Andrea Bauer und Katharina Grosser für die moralische Unterstützung, das Korrekturlesen der Dissertation die musikalische Untermalung im Labor und das Anbieten von „Knoppers“.

Martin Rempt für die Hilfe bei Reparaturen am Magnum, die interessanten Diskussionen und die gelegentlichen Kommentare.

Astrid Spielmeyer für die Hilfe mit dem mitunter etwas störrischen UV/IR-Spektrometer, das Korrekturlesen der Dissertation und die täglichen Besuche in meinem Labor, auch wenn es nur zum Benutzen der Feinwaage war.

Ich bedanke mich ausserdem bei Thomas Wichard, Carsten Paul, Jan Grüneberg, Alexandra Barofsky, Jennifer Sneed, Emily Prince, Phillipp Richter, Caroline Kurth, Hannes Richter und Svetlana Lehmann für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und auch außerhalb.

Von der EPFL in Lausanne danke ich Marjorie Cretenoud für die Hilfen im Labor und für diverse Ikea-Shopping-Touren, Luc Henry für die Synthesebemühung trotz geringer

Aussichten auf Erfolg, Giovanni Petrucci und Gladys Pache aus dem magasin für die Geduld im Umgang mit meinem gebrochenen Französisch, Dr. Martial Rey für die Einführung in die NMR-Spektrometer, Luc Patiny für die Möglichkeit des Sammeln von Credits, die ich dann doch nicht brauchte und Christina Zamanos-Epreman, für die Überwindung von sprachbedingten bürokratischen Hindernissen.

Von der Friedrich-Schiller-Universität bedanke ich mich bei Frau Blayer und Frau Rambach aus der NMR-Abteilung für das Einräumen von mitunter sehr langen Meßzeiten, Dr. Wolfgang Poppitz für die MS-Analysen und bei Madlen Kühn für die Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten.

Außerdem bedanke ich mich bei:

Dr. Frank Lehmann und Dr. Wilhelm Frank von der Dyomics GmbH für die fluoreszenten Farbstoffe und deren Spektren, sowie die wertvollen Tips.

Dr. Benjamin Dietzek des IPHT Jena für die Möglichkeit der Laser-Scanning-Mikroskopie.

Bei Dr. Alexander Muck und Dr. Aleš Svatoš vom Max-Planck Institut für Chemische Ökologie Jena für die Messungen des markierten Enzyms mittels MALDI-ToF.

Bei Dr. Gang Wei und Prof. Dr. Klaus D. Jandt des Instituts für Materialwissenschaft und Werkstofftechnologie in Jena für die Versuche die Bildung des Protein-Biopolymers mittels atomic-force-microscopy zu untersuchen.

Ich danke ganz herzlich meinen Eltern die mich stets unterstützten und mir all dies ermöglichten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Frau Ina Weißflog die mir stets Kraft gegeben hat, mir während dieser Zeit den Rücken freihielt und bereit war, mir überallhin zu folgen.

Danke!

Lebenslauf

Name: Jerrit Weißflog
geboren am: 6. Oktober 1980 in Karl-Marx-Stadt

Schulabschluss

Juli 1999 Allgemeine Hochschulreife am Gottfried-Leibniz-Gymnasium, Chemnitz, Deutschland

Zivildienst

September 1999 - September 2000 Klinikum Chemnitz gGmbH, Deutschland

Studium

Oktober 2000 - September 2005 Studium Chemie-Diplom an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland
Abschluss: Diplom-Chemiker

Promotion

September 2005 - Februar 2007 École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)
Schweiz

März 2007 - März 2010 Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland

Jena, 8. April 2010

Selbstständigkeitserklärung

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

Jena, 8. April 2010