

**Chemie, Biochemie und ökologische Bedeutung
der verletzungsaktivierten Transformation von
Sekundärmetaboliten in der Grünalge *Caulerpa
taxifolia***

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Diplom-Chemiker (Umweltchemie) Sven Adolph
geboren am 1. August 1974 in Herford

1	Einleitung.....	4
1.1	Mechanische Verteidigungsstrategien	4
1.2	Chemische Verteidigungsstrategien	6
1.2.1	Konstitutive chemische Verteidigung	6
1.2.2	Dynamische chemische Verteidigung	8
1.2.2.1	Induzierte chemische Verteidigung	8
1.2.2.2	Aktivierte chemische Verteidigung	9
1.3	Maskierte Aldehyde als Verteidigungsmetabolite in marinen Makroalgen.....	11
1.4	<i>Caulerpa taxifolia</i>	16
1.4.1	Ökologische Relevanz von <i>C. taxifolia</i>	18
1.5	Wundverschlussreaktionen bei siphonalen Algen	20
2	Aufgabenstellung.....	23
3	Ergebnisse und Diskussion	25
3.1	<i>Caulerpa taxifolia</i>	25
3.1.1	Verwundungsaktivierte Reaktionen.....	25
3.1.2	Wundverschlussreaktion	29
3.1.2.1	Morphologische Untersuchungen.....	29
3.1.2.2	Untersuchungen mittels HPLC/MS.....	30
3.1.2.3	Gelelektrophoretische Studien	37
3.1.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	41
3.1.3	Verwundung in Gegenwart von freien Aminosäuren.....	46
3.1.4	Modellreaktionen zur Untersuchung des Wundverschlusses	51
3.1.5	Einfluss der Verwundung auf die Aminosäurezusammensetzung	70
3.1.6	Einfluss der Verwundung auf den pH-Wert.....	76
3.1.7	Bioassays.....	77
3.2	Aktivierte chemische Verteidigung von Diatomeen.....	82
3.2.1	$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Aldehyde als Verteidigungsmetabolite	82
3.2.2	Synthese von 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure	84
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
5	Abkürzungsverzeichnis.....	93
6	Experimenteller Teil.....	96
6.1	Materialien und Geräte	96
6.1.1	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	96
6.1.2	pH-Wertbestimmung	96
6.1.3	Hochauflösende Massenspektrometrie.....	96
6.1.4	Mikroskopie	96
6.1.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	96

6.1.4.2	Auflichtmikroskopie	97
6.1.5	Chromatographische Trennmethode n	97
6.1.5.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	97
6.1.5.2	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS).....	97
6.1.5.3	Präparative HPLC	98
6.1.5.4	HPLC mit Fluoreszenzdetektion.....	98
6.1.5.5	Analytische Dünnschichtchromatographie (DC).....	99
6.1.5.6	Säulenchromatographie	99
6.1.5.7	Gelelektrophorese	99
6.2	Kulturbedingungen der Versuchsorganismen.....	102
6.2.1	Herstellung von künstlichem Seewasser	102
6.2.1.1	Herstellung von künstlichem Seewasser mit Instant Ocean	102
6.2.1.2	Herstellung von künstlichem Seewasser nach Maier und Calenberg ..	102
6.2.2	Kultivierung von <i>C. taxifolia</i>	103
6.2.2.1	In Aquarienkulturen	103
6.2.2.2	In unialgalen Kulturen	104
6.2.3	Haltung der Flohkrebse.....	104
6.3	Isolierung von Caulerpenin aus <i>C. taxifolia</i>	104
6.4	Verletzungsaktivierte Prozesse bei <i>C. taxifolia</i>	105
6.4.1	Mikroskopische Experimente	105
6.4.1.1	Stereomikroskopie	105
6.4.1.2	Fluoreszenzmikroskopie	105
6.4.2	pH-Wertbestimmung in <i>C. taxifolia</i>	105
6.4.3	Gelelektrophorese.....	106
6.4.4	Untersuchungen zur Caulerpeninumwandlung	106
6.4.4.1	Caulerpeninumwandlung in Gegenwart von Lysin / Cystein	106
6.4.4.2	Quantifizierung von Caulerpenin und Oxytoxin 2	107
6.4.4.3	Verwundung von <i>C. taxifolia</i> in Gegenwart von Lysin / Cystein.....	108
6.5	Modellreaktionen.....	108
6.5.1	Reaktion von Caulerpenin mit Aminosäuren in Gegenwart einer Esterase .	108
6.5.2	Reaktion von Caulerpenin mit einem Oligopeptid in Gegenwart einer..... Esterase	109
6.5.3	Reaktion von Caulerpenin mit Myoglobin in Gegenwart einer Esterase	110
6.5.4	Synthese und Aufreinigung von 62	111
6.5.5	Synthese und Aufreinigung von 66	112
6.6	Aminosäureanalytik.....	114
6.6.1	Aminosäureanalytik nach Hydrolyse mit HCl	114

6.6.2	Aminosäureanalytik nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender Hydrolyse mit HCl.....	116
6.7	Bioassays.....	118
6.7.1	Herstellung des künstlichen Futters.....	118
6.7.2	Untersuchung der Präferenz der Versuchsorganismen für mit <i>C. taxifolia</i> bzw. mit <i>Ulva</i> spp. zubereitetem Futter.....	118
6.7.3	Bevorzugung von intakter oder verwundeter <i>C. taxifolia</i> durch <i>E. levis</i>	120
6.7.4	Einfluss von Caulerpenin auf <i>E. levis</i>	120
6.8	Chemische Synthesen.....	121
6.8.1	Herstellung von [3,4- ² H ₂]-(<i>Z</i>)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-hex-3-en-6-ol.....	121
6.8.2	Herstellung von [3,4- ² H ₂]-(<i>Z</i>)-Hex-3-enyl-1,6-bis-[triphenylphosphoniumbromid].....	122
6.8.3	Herstellung von Ethyl-6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15-hexadecatetraenoat.....	123
6.8.4	Herstellung von 6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15-Hexadecatetraensäure.....	124
7	Literaturverzeichnis.....	126
8	Anhänge.....	131

1 Einleitung

Sowohl Algen als auch Pflanzen müssen sich den Bedingungen ihres Lebensraums anpassen, da beide nicht die Möglichkeit haben, diesen durch aktive Migration zu verlassen. Sie müssen sich auf die vorherrschenden und teilweise saisonal stark schwankenden abiotischen Faktoren ihres Lebensraums wie Licht, Nährstoffe, Klima und mechanischen Belastungen einstellen. Darüber hinaus aber auch in der Lage sein, mit biotischen Stressfaktoren wie zum Beispiel Fraßdruck durch Herbivoren oder konkurrierenden Arten umzugehen. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Verteidigungssysteme gegen Fraßfeinde oder Pathogene entwickelt. Dabei ist es im Allgemeinen von großer Bedeutung, dass der Verteidigungsmechanismus greift, bevor ein nicht mehr zu kompensierender Verlust an Biomasse eintritt. Generell sind zwei unterschiedliche Verteidigungsarten zu finden:

- Die mechanische Verteidigung, bei der Dornen oder speziell verstärktes Gewebe ausgebildet werden. Durch diese physischen Barrieren kann der Organismus den auf ihn wirkenden Fraßdruck herabsetzen.
- Die chemische Verteidigung, bei der Substanzen produziert werden, die toxisch oder abschreckend auf Fraßfeinde wirken. Diese Verbindungen gehen häufig nicht aus dem Primärstoffwechsel hervor, der für die Produktion von Verbindungen verantwortlich ist, die für das Wachstum und die Entwicklung eines Lebewesens essentiell sind, sondern aus dem so genannten Sekundärstoffwechsel.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass eine Verteidigung immer mit ökologischen Kosten verbunden ist. Die Ausbildung von schützenden Geweben oder chemischen Verteidigungsstoffen verbraucht Ressourcen, die dem Primärstoffwechsel des Organismus daraufhin nicht mehr für Wachstum und Fortpflanzung zur Verfügung stehen, was sich negativ auf dessen Fitness auswirken kann.^[1]

1.1 Mechanische Verteidigungsstrategien

Im marinen Bereich ist die mechanische Verteidigung unter anderem bei der Algenklasse der Diatomeen (Kieselalgen) zu finden. Ein Vertreter dieser Klasse, die Diatomeenart *Thalassiosira rotula*, ist in Abb.1-1 dargestellt.

Diese einzelligen Mikroalgen gehören zum Phytoplankton, also zu den in der Freiwasserzone autotroph lebenden Organismen, welche zu den wichtigsten Primärproduzenten organischer Biomasse überhaupt zählen und einen wichtigen Teil der Nahrungsgrundlage für das Zooplankton bilden.^[2]

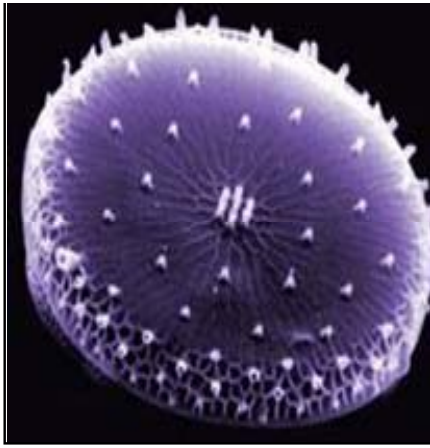


Abbildung 1-1:
Diatomee *Thalassiosira rotula*.
Mit freundlicher Genehmigung
von S. Poulet, Roscoff

Diatomeen, die einen Durchmesser von 4 bis zu 100 μm aufweisen können, verfügen über eine Zellwand, welche zu einem hohen Grad aus Silica ($\text{SiO}_2 \times n \text{H}_2\text{O}$) besteht. Dieser harte Panzer, welcher bis zu 60 % des gesamten Zellgewichts ausmachen kann,^[3] stellt einen mechanischen Schutz vor Fraßfeinden dar. Potentielle Feinde müssen extrem hohe Kräfte von bis zu 700 t/m^2 aufwenden, um mit geeigneten Fresswerkzeugen diese Zellwand aufzubrechen (Abb. 1-2). Durch diesen Schutzmechanismus wird die Zahl der potentiellen Herbivoren eingeschränkt.

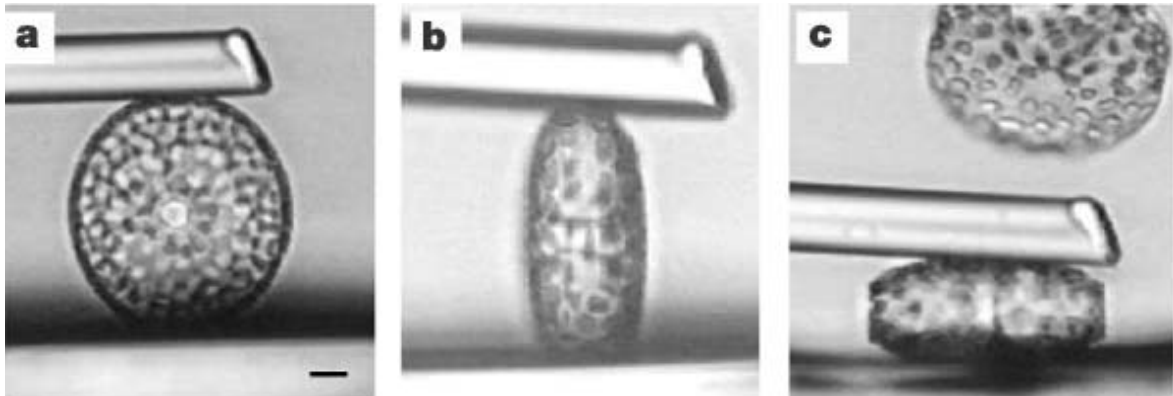


Abbildung 1-2: Eine Diatomee der Art *Thalassiosira punctigera* wird mit Hilfe einer Glasmikronadel zerstört (Skalierung = 10 μm), Hamm et al.^[4], Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature, Copyright 2003

So sind nur große Copepodenarten (Ruderfußkrebse, Abb. 1-3) in der Lage, diesen Panzer zu durchbrechen; kleinere Arten müssen auf andere Beute ausweichen.^[4, 5]



Abbildung 1-3: Copepoden *Calanus helgolandicus*. Mit freundlicher Genehmigung von S. Poulet, Roscoff

Durch diesen Schutzmechanismus verschaffen sich Diatomeen somit einen Vorteil gegenüber anderen Vertretern des Phytoplanktons, die nicht über einen solchen Panzer verfügen.

1.2 Chemische Verteidigungsstrategien

1.2.1 Konstitutive chemische Verteidigung

Bei Diatomeen ist nicht nur die mechanische Verteidigung durch die Ausbildung harter Außenpanzer zu beobachten, es wurden auch chemische Verteidigungsstrategien nachgewiesen. *Pseudo-nitzschia* spp. verfügt zum Beispiel über eine konstitutive chemische Verteidigung. Diese Verteidigungsart zeichnet sich dadurch aus, dass im Sekundärstoffwechsel ein Verteidigungsmetabolit ständig produziert und in der Zelle gespeichert wird. Bei verschiedenen *Pseudo-nitzschia* spp. wurde das für Säugetiere neurotoxisch wirkende Alkaloid Domoinsäure (1) nachgewiesen.^[6] Bei Algenblüten dieser Spezies, die durch das massenhafte Auftreten dieser Art charakterisiert sind, kann sich die Domoinsäure (1) in der Nahrungskette von Zooplankton, Fischen oder besonders auch Filtrierern wie Muscheln anreichern und so ebenfalls zu Vergiftungserscheinungen bei Säugetieren wie Seelöwen führen.^[7]

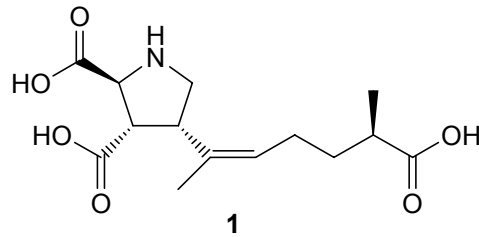


Abbildung 1-4: Domoinsäure (1)

Bei der konstitutiven Verteidigung ergeben sich für den Organismus, der diese einsetzt, allerdings auch Nachteile, so besteht zum Beispiel die Gefahr der Selbstvergiftung. Bei *Pseudo-nitzschia* spp. stellt sich dieses Problem allerdings nicht, da die als Wirkort von **1** dienenden N-Methyl-D-asparat-Rezeptoren in dieser Diatomeenart fehlen.^[8] Nur so ist die Speicherung eines Abwehrstoffes in diesem einzelligen Organismus überhaupt möglich. Ungünstig ist die ständige Produktion eines Abwehrstoffes für den Organismus aber auch aus Sicht des Energiehaushaltes, da die hierfür verwendeten Ressourcen nicht für die Entwicklung und Fortpflanzung eingesetzt werden können.

Eine weitere Gefahr dieser Verteidigungsstrategie liegt in der möglichen Resistenzbildung der Fraßfeinde gegen den Verteidigungsmetaboliten. Die ständige Präsenz der zu Verteidigungszwecken eingesetzten Substanz bietet den Fraßfeinden die Möglichkeit, sich an diesen anzupassen und somit die Verteidigung zu umgehen. Bei terrestrischen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass eine solche Anpassung von einer Detoxifizierung der Verteidigungsmetabolite bis hin zu Veränderungen im Fraßverhalten der Angreifer reichen kann.^[9-11] Für *Pseudo-nitzschia* spp. wurde von Lincoln *et al.* 2001 gezeigt, dass die Domoinsäure (**1**) keinen Einfluss auf die Herbivoren *Acartia tonsa* und *Temora longicornis* – weder im Bezug auf direkte Toxizität noch auf die Reproduktionsrate der Copepoden – zeigt und somit gegen die direkten Fraßfeinde wirkungslos ist.^[12] Aktuellere Studien von Bargu *et al.* hingegen relativieren dieses Ergebnis. Demnach scheint Domoinsäure (**1**) auf das Fraßverhalten einiger Copepodenarten keinen Einfluss zu haben, andere Arten hingegen abzuschrecken;^[13, 14] so dass auch bei diesem System seitens der Herbivoren verschiedene Mechanismen, von Anpassung bis zur Vermeidung, zu beobachten sind. Die konstitutive chemische Verteidigung muss aber nicht zwangsläufig mit strukturell anspruchsvollen organischen Verbindungen erfolgen. Makroalgen der Gattung *Desmarestia* zum Beispiel speichern Schwefelsäure in ihren Vakuolen und schützen sich so vor Herbivoren wie etwa Seeigeln.^[15]

1.2.2 Dynamische chemische Verteidigung

Bei Algen sind nicht nur statische, sondern auch dynamische Verteidigungsstrategien zu finden. Bei der dynamischen chemischen Verteidigung erfolgt die Freisetzung der Abwehrstoffe erst nach einem Angriff auf den Organismus, ob nun durch Herbivoren, Pathogene wie Pilze oder Bakterien oder andere Mikro- und Makroalgenarten. Die Reaktion auf diese Angriffe kann auf sehr unterschiedlichen Wegen erfolgen. Wenn die Alge z. B. von einem Herbivore befallen wird, kann die Verteidigungsreaktion entweder durch die mechanische Verwundung des Gewebes oder durch vom Angreifer abgegebene Signalstoffe in Gang gesetzt werden. Wenn ein Befall durch Pilze oder andere Algen stattfindet, kann das Eindringen durch die Epidermis in das Zellinnere der betroffenen Alge zur Auslösung einer Verteidigungsreaktion führen. Dabei wird ein chemisches Signal erzeugt, das von der angegriffenen Alge wahrgenommen wird und so die Verteidigungsreaktion in Gang setzt.

1.2.2.1 Induzierte chemische Verteidigung

Ein Beispiel für dynamische chemische Verteidigungsstrategien stellt die induzierte chemische Verteidigung dar. Dabei wird die Abwehrreaktion durch die Wahrnehmung eines vom Angreifer produzierten Signals in Gang gesetzt. Im marinen Bereich findet sich diese Reaktion z. B. bei der Rotalge *Chondrus crispus*, die von der Grünalge *Acrochaete operculata* parasitiert wird (Abb. 1-5).

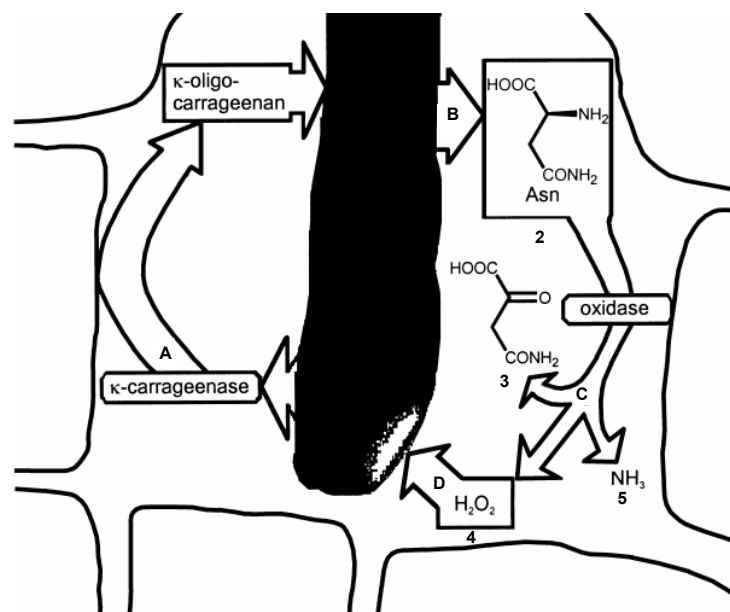


Abbildung 1-5: Modell der Wechselwirkungen von *A. operculata* (schwarz) und *C. crispus*. Nach Weinberger et al. [16]

In *C. crispus* werden durch die eindringende Grünalge *A. operculata* κ -Carragene in κ -Oligocarragenane umgewandelt (A), welche dann die Freisetzung von L-Asparagin (2) induzieren (B). Die Aminosäure 2 ist dann das Signal für *C. crispus*, dass eine Parasitierung stattfindet. Als Abwehrmechanismus wird L-Asparagin (2) in der Rotalge durch eine Aminosäureoxidase in die korrespondierende α -Ketosäure 2-Oxosuccinaminsäure (3), Wasserstoffperoxid (4) und Ammoniak (5) umgewandelt (C). Durch das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid (4) wird die in die Zelle eindringende Grünalge abgetötet, da diese darauf empfindlicher reagiert als die Wirtszelle (D).^[17, 18] *C. crispus* reagiert sehr spezifisch auf das vom Parasiten abgegebene Signal, andere in der Zelle vorhandene Aminosäuren werden nicht verstoffwechselt und der Abwehrmechanismus wird erst nach der Wahrnehmung des L-Asparaginsignals aktiv. Der beschriebene Mechanismus funktioniert allerdings nur in einer bestimmten Entwicklungsstufe der Alge, der gametophytischen Phase. In der sporolytischen Phase ist keine Abwehrreaktion zu beobachten und die Grünalge kann erfolgreich in die Rotalge eindringen.^[16, 19] Dieses auf Induktion ansprechende Verteidigungssystem stellt eine sehr wirkungsvolle und aus stoffwechselphysiologischen Gesichtspunkten ressourcenschonende Verteidigung dar. Der sich verteidigende Organismus muss weder einen Sekundärmetaboliten speichern, noch eine stoffwechselphysiologisch anspruchsvolle Verbindung synthetisieren. Ein vom Angreifer abgegebenes Signal kann vielmehr direkt zur Verteidigung eingesetzt werden.

1.2.2.2 Aktivierte chemische Verteidigung

Aktivierte chemische Verteidigung bei Mikroalgen

Der Großteil der bekannten Diatomeen verfügt, anders als die schon erwähnten *Pseudo-nitzschia* spp., über keine konstitutive chemische Verteidigung und wurde deshalb als nichttoxisch eingestuft. Aufgrund ihrer Zusammensetzung schienen sie darüber hinaus eine gute Futterquelle für ihre Herbivoren darzustellen.^[20-23] Wenn Algenblüten verschiedener Diatomeenarten auftreten, müsste also aufgrund des vermehrten Futterangebots ein Anstieg der Population ihrer Fraßfeinde, hauptsächlich Copepoden, zu beobachten sein.

Von Poulet *et al.* und Ban *et al.* wurde allerdings gezeigt, dass entgegen der Erwartungen die Copepodenpopulation bei der Blüte bestimmter Diatomeenarten sinkt.^[24, 25] Zur Untersuchung dieses Effekts wurde eine bioassay-geleitete Strukturaufklärung durchgeführt. Die Diatomeen wurden extrahiert, das erhaltene Extrakt durch unterschiedliche chromatographische Trennverfahren gereinigt und auf die spezifische biologische Aktivität, d. h. die Herabsetzung des Fortpflanzungserfolges von Copepoden,

getestet. Die jeweils aktive Fraktion wurde bis zum Erhalt eines Reinstoffes weiter aufgereinigt.

Dadurch wurden *2E,4E/Z-Decadienal (7)* und *2E,4E/Z,7Z-Decatrienal (78)* als aktive Komponenten identifiziert.^[26] Diese sind nicht in intakten Diatomeen nachweisbar, sondern werden erst nach Zerstörung der einzelligen Alge produziert. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Diatomeenarten entgegen der bisherigen Vermutungen über einen dynamischen Verteidigungsmechanismus – in diesem Fall eine aktivierte chemische Verteidigung – verfügen.^[27]

Die Verteidigungsmetabolite dieser einzelligen Algen sind biosynthetisch von Fettsäuren abgeleitet. So werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie z. B. Eicosatetraensäure (**6**) (Arachidonsäure) nach Zerstörung der Zellintegrität aus Glyko- und Phospholipiden freigesetzt und in einem zweistufigen enzymatischen Prozess zu den entsprechenden Aldehyden umgesetzt.^[28, 29]

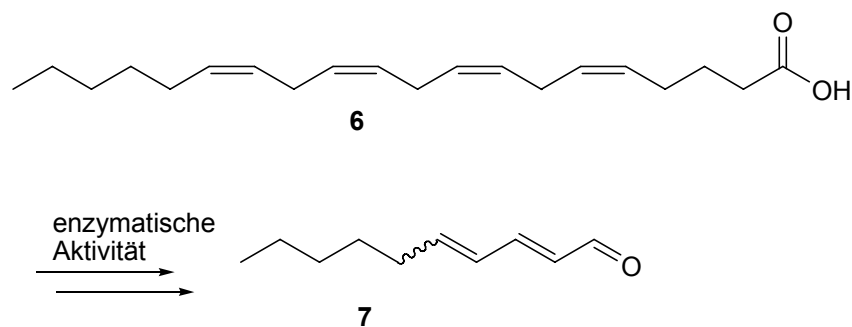


Abbildung 1-6: Umsetzung von Eicosatetraensäure (**6**) nach Verwundung der Alge *T. rotula* zu *2E,4E/Z-Decadienal (7)*

Da die Abwehrstoffe aus Fettsäuren verwundungsaktiviert aus Lipiden abgeleitet werden, welche aus dem Primärstoffwechsel hervorgehen,^[30, 31] werden die Kosten für den produzierenden Organismus stark reduziert. Zur Bereitstellung der Verteidigungsstoffe müssen lediglich die benötigten Enzyme in entsprechenden Zellkompartimenten gespeichert, jedoch keine zusätzlichen Verbindungen biosynthetisiert werden.

Da die Verteidigungsmetabolite erst nach der Zerstörung der Diatomeenzelle freigesetzt werden, erreichen die $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyde lokal sehr hohe Konzentrationen im Verdauungstrakt der Copepoden. Die hydrophoben Verbindungen gelangen so direkt an ihren Wirkort im Fraßfeind.^[32] Die Metabolite sind für die Ruderfußkrebse selbst nicht toxisch, aber für deren Eier und Embryonen. Deshalb wirkt sich diese Verteidigungsstrategie erst auf die nächste Generation der Fraßfeinde aus.^[26, 30, 33]

Aktiviert chemische Verteidigung bei Makroalgen

Der erste Bericht über aktivierte chemische Verteidigung bei Makroalgen wurde von Paul und van Alstyne 1992 publiziert.^[34] So sind einige Spezies der Grünalgenart *Halimeda* in der Lage, den Sekundärmetaboliten Halimedatetraacetat (**8**) nach Verwundung in Halimedatrial (**9**) umzuwandeln.

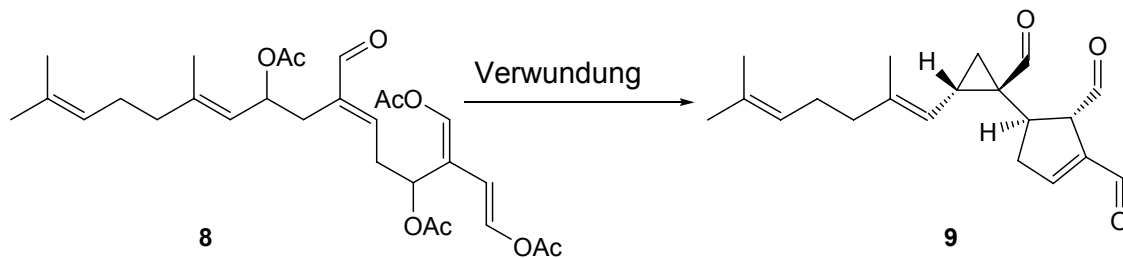


Abbildung 1-7: Nach Verwundung wird Halimedatetraacetat (**8**) von *Halimeda* spp. vermutlich enzymatisch in das fraßhemmende Halimedatrial (**9**) umgewandelt.

In Bioassays wurde die biologische Aktivität der organischen Extrakte verwundeter und intakter Algen miteinander verglichen. Die von den Testorganismen bevorzugte Futteralge *Enteromorpha clathrata* wurde mit den organischen Extrakten von verwundeten und intakten *Halimeda* spp. präpariert und im Freiwasser ausgesetzt. Die Fraßaktivität verschiedener Fischarten an diesen Versuchsalgen zeigte, dass die mit dem Extrakt der verwundeten *Halimeda* spp. behandelten Futteralgen weniger stark befreßen wurden als die Kontrollalgen, welche mit Extrakten von intakten *Halimeda* spp. behandelt worden waren. Diese Studie zeigt, dass die Metabolite in der verwundeten Alge zu einer Verminderung des Fraßdruckes führen. Somit wurde nachgewiesen, dass biologisch nicht aktive Verbindungen nach Verwundung der Alge in eine biologisch aktivere Form überführt werden können, welche dann zur Abwehr von Fraßfeinden dient.^[34]

1.3 Maskierte Aldehyde als Verteidigungsmetabolite in marinen Makroalgen

In Algen sind eine Reihe von Sekundärmetaboliten unterschiedlichster Stoffklassen zu finden, unter anderem funktionalisierte und unfunktionalisierte Terpene, Oxylipine Alkaloide und phenolische Verbindungen.^[18, 35, 36] Funktionalisierte Terpene, die wie Halimedatetraacetat (**8**) Enoylacetatgruppen enthalten, sind im marinen Bereich besonders in der Klasse der Bryopsidophyceae (siphonale Grünalgen) zu finden.^[35, 37-41] Die Acetatgruppe kann bei diesen Molekülen als biogene Schutzgruppe dienen, die leicht enzymatisch entfernt werden kann, wie in Abb.1-8 illustriert ist. Dieser Prozess kann

durch äußere Einflüsse wie z. B. durch mechanische Verwundung oder Fraßaktivität in Gang gesetzt werden.^[34] Durch diesen mechanischen Reiz wird möglicherweise eine Kompartimentierung in der Alge aufgehoben, welche zum Kontakt von Enzym und Sekundärmetaboliten führt. Dadurch wird unter physiologischen Bedingungen ein Enoylacetat in den korrespondierenden ungesättigten Alkohol überführt, welcher dann im tautomeren Gleichgewicht mit dem entsprechenden Aldehyd liegt.^[42] So hat die Alge durch die entsprechenden Enzyme die Möglichkeit, eine inaktive Speicherform sehr schnell in die biologisch aktive Form des freien Aldehyds zu überführen. Diese kann dann, wie bei *Halimeda* spp. gezeigt, zur aktivierten chemischen Verteidigung beitragen.

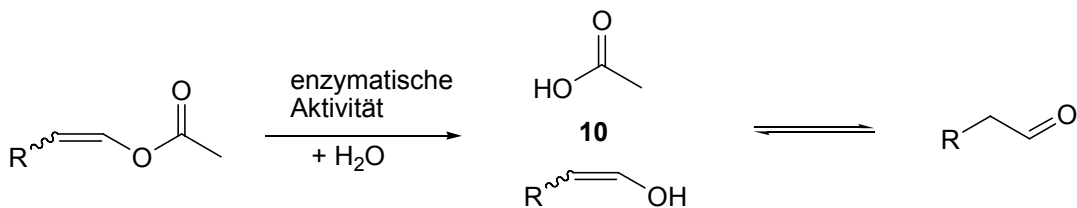


Abbildung 1-8: Enzymatische Umwandlung von Enoylacetaten zu freien Aldehyden

Ein Beispiel für diesen Mechanismus findet sich in der siphonalen grünen Makroalge *Udotea petiolata*, bei der das funktionalisierte Diterpen Udoteal (**11**) nachgewiesen wurde.^[36, 39] Dieses wird bei Verwundung der Alge enzymatisch in Petiodial (**12**) umgewandelt, wie in Abb. 1-9 zu sehen ist.^[43]

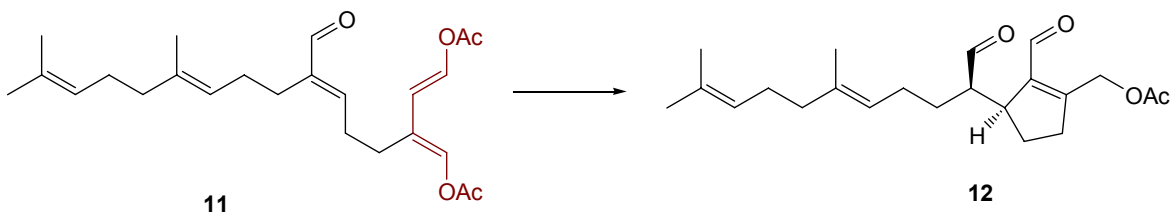


Abbildung 1-9: Umwandlung von Udoteal (**11**) zu Petiodial (**12**) bei *Udotea petiolata*
rot: 1,4-bis-Enoylacetatfunktion

Eine sehr breite Varianz und Strukturvielfalt dieser terpenoiden 1,4-bis-Enoylacetate ist besonders bei der Gattung der Caulerpales, einer Untergattung der Klasse der siphonalen Grünalgen, zu finden.^[40] So wurden z. B. die zyklischen 1,4-bis-Enoylacetate **13** und **14** (Abb. 1-10) in *C. bikinensis* und *C. brownii* nachgewiesen.^[37, 44]

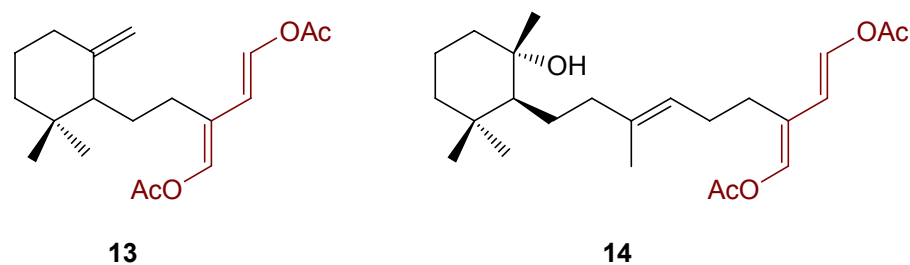


Abbildung 1-10: Zyklische 1,4-bis-Enylacetate **13** und **14** aus *Caulerpa*-Spezies, rot: 1,4-bis-Enylacetatfunktion

Als Beispiele für offenkettige Metabolite sind hier Flexilin (**15**) aus *C. flexilis* und Trifarin (**16**) aus *C. trifaria* gezeigt (Abb. 1-11).

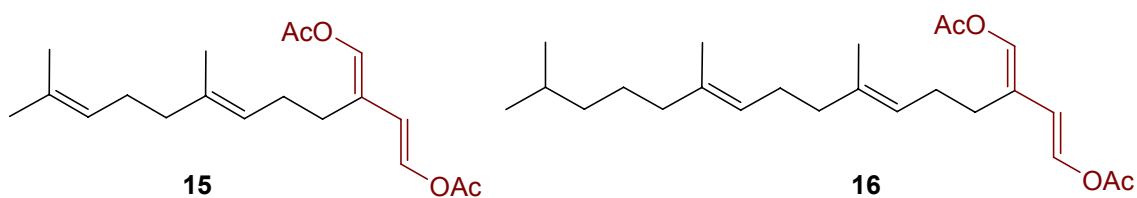
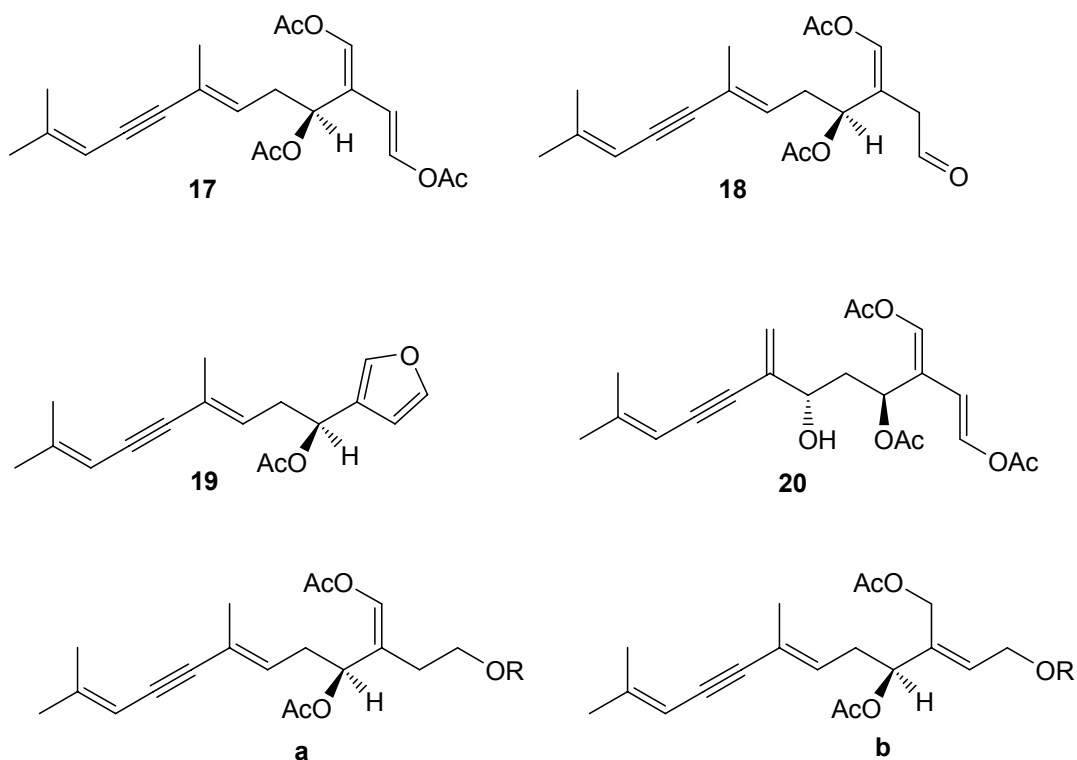


Abbildung 1-11: Flexilin (**15**) und Trifarin (**16**), rot: 1,4-bis-Enylacetatfunktion

In aktueller Literatur werden immer wieder neue funktionalisierte Sesquiterpene dieses Typs charakterisiert.^[44] Trotz dieser Strukturvielfalt stellt jedoch Caulerpenin (**17**) den Hauptsekundärmetaboliten in zahlreichen tropischen und subtropischen *Caulerpa*-Spezies dar und kann in diesen mit einem Anteil von bis zu 1 % des Feuchtgewichts nachgewiesen werden.^[40, 45] Neben Caulerpenin (**17**) finden sich aber auch viele aus **17** biosynthetisch abgeleitete bzw. ähnliche Verbindungen wie zum Beispiel Oxytoxin 1 (**18**)^[46], Furocaulerpenin (**19**)^[47], Dihydrocaulerpenin (**20**)^[48] und caulerpeninverwandte Fettsäureester (**21ab-33ab**)^[49, 50].



21ab R = CH₃-(CH₂)_nCO- ; n = 14; n = 16

22ab R = CH₃-(CH₂)₄-(CH=CH-CH₂)₂-(CH₂)₆CO-

23ab R = CH₃-CH₂-(CH=CH-CH₂)₃-(CH₂)₆CO-

24ab R = CH₃-CH₂-(CH=CH-CH₂)₅-(CH₂)₂CO-

25ab R = CH₃-(CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₉CO-

26ab R = CH₃-(CH₂)₄-(CH=CH-CH₂)₄-(CH₂)₂CO-

27ab R = CH₃-CH₂-(CH=CH-CH₂)₃-(CH₂)₄CO-

28ab R = CH₃-CH₂-(CH=CH-CH₂)₄-(CH₂)₃CO-

29ab R = CH₃-(CH₂)_nCO- ; n = 12; n = 14

30ab R = CH₃-(CH₂)₅-CH=CH-(CH₂)₇CO-

31ab R = CH₃-(CH₂)₄-(CH=CH-CH₂)₂-(CH₂)₆CO-

32ab R = CH₃-CH₂-(CH=CH-CH₂)₃-(CH₂)₄CO-

33ab R = CH₃-(CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₇CO-

Abbildung 1-12: Caulerpenin (17), Oxytoxin 1 (18), Furocaulerpenin (19), Dihydrocaulerpenin (20) und caulerpeninverwandte Fettsäureester (21ab-33ab)

Der Großteil der in diesem Kapitel aufgezählten Verbindungen wurde zur Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus den Algen isoliert. Nur einzelne, aus intakten Algen gewonnene, Substanzen wurden in Bioassays an ausgewählten Testorganismen auf definierte toxikologische Eigenschaften getestet.^[51-56] Bezüglich ihrer Rolle bei der chemischen Verteidigung ist jedoch nur wenig bekannt. Es wurden keine Untersuchungen über den Wirkmechanismus und die mögliche Funktion dieser Verbindungen im Ursprungsorganismus durchgeführt. Somit sind die ökologische Relevanz und die Bedeutung dieser Verbindungsklasse für die Algengattung *Caulerpa* weitgehend unerforscht. Aus *Caulerpa ashmeadii* wurden sowohl Verbindungen mit 1,4-bis-Enoylacetateinheit (34) als auch ungesättigte Sesquiterpen-Aldehyde 35 und 36 isoliert.^[57] Die nachgewiesenen Substanzen sind in Abb. 1-13 dargestellt.

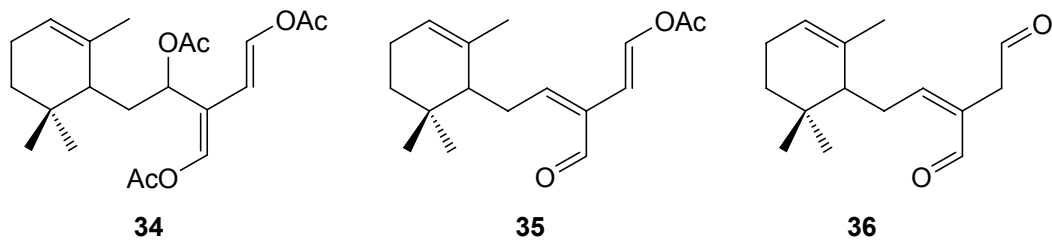


Abbildung 1-13: Sesquiterpene **34-36** aus *Caulerpa ashmeadii*

In von Paul *et al.* durchgeführten Bioassays zeichnete sich *Caulerpa ashmeadii* durch extrem hohe Fraßresistenz aus.^[58] Diese Untersuchungen stützen somit die Vermutung, dass auch bei *Caulerpa*-Spezies die verwundungsaktivierte Umwandlung von 1,4-bis-Enoylacetaten in die korrespondierenden Aldehyde stattfindet. Obwohl eine Studie von Paul und Fenical einen Hinweis auf Verteidigungsreaktionen bei tropischen *Caulerpa*-Arten erbrachte, konnte eine aktivierte chemische Verteidigungsstrategie bisher nicht eindeutig bewiesen werden. Paul und Fenical verglichen die fraßhemmende Wirkung von **34** mit den korrespondierenden freien Aldehyden (**35-36**). Dabei zeigte sich, dass **35** und **36** durchgehend größere Aktivität bei der Abwehr der Fraßfeinde aufwiesen, der Ursprung dieser Verbindungen wurde jedoch nicht detaillierter untersucht.^[57] Bemerkenswert ist, dass eine einzelne Klasse von Sekundärmetaboliten in einer so hohen Konzentration vorliegt. Insgesamt können die 1,4-bis-Enoylacetate mehr als 1 % des Feuchtgewichts bei *C. taxifolia* ausmachen.^[45] Die Biosynthese solcher Mengen bedeutet einen erheblichen stoffwechselphysiologischen Aufwand für die Alge, da viele Ressourcen in die Bildung dieser Verbindungen investiert werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass diese Substanzen und insbesondere die aus ihnen abgeleiteten reaktiven freien Aldehyde in der Alge eine vitale Funktion erfüllen.

Im allgemeinen können Elektrophile wie die aus den 1,4-bis-Enoylacetaten freigesetzten Aldehyde durch Kondensation mit primären Aminen Imine bilden. Durch diese Reaktion können Lysinreste in Proteinen blockiert und dadurch die Funktion von Enzymen eingeschränkt werden. α,β -ungesättigte Aldehyde stellen außerdem ein Michael-Akzeptorsystem dar, welches β -ständig von Nukleophilen angegriffen werden kann, so z. B. durch Thiole, Amine oder Alkohole.^[59] Dies kann ebenfalls zur Inaktivierung von betroffenen Enzymen und damit zu einer gravierenden Beeinträchtigung des Stoffwechsels führen. Allerdings wurden für die, aus verschiedenen siphonalen Grünalgen isolierten, freien Aldehyde noch keine detaillierten mechanistischen Untersuchungen bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit Enzymen durchgeführt.^[57]

1.4 *Caulerpa taxifolia*

Die Algen der Gattung *Caulerpa* gehören taxonomisch zu den Bryopsidophyceae (siphonalen Grünalgen). Diese ausschließlich marin vorkommende Algenklasse, welche in tropischen und subtropischen Meeren beheimatet ist, zeichnet sich insbesondere durch ihren einzelligen Aufbau mit einer zentralen Vakuole aus. Diese ist von einer dünnen Schicht Zytoplasma umgeben, in dem sämtliche Zellorganellen und eine Vielzahl von Zellkernen lokalisiert sind.^[60] Der schematische Aufbau von *C. taxifolia* ist in Abb. 1-14 dargestellt.

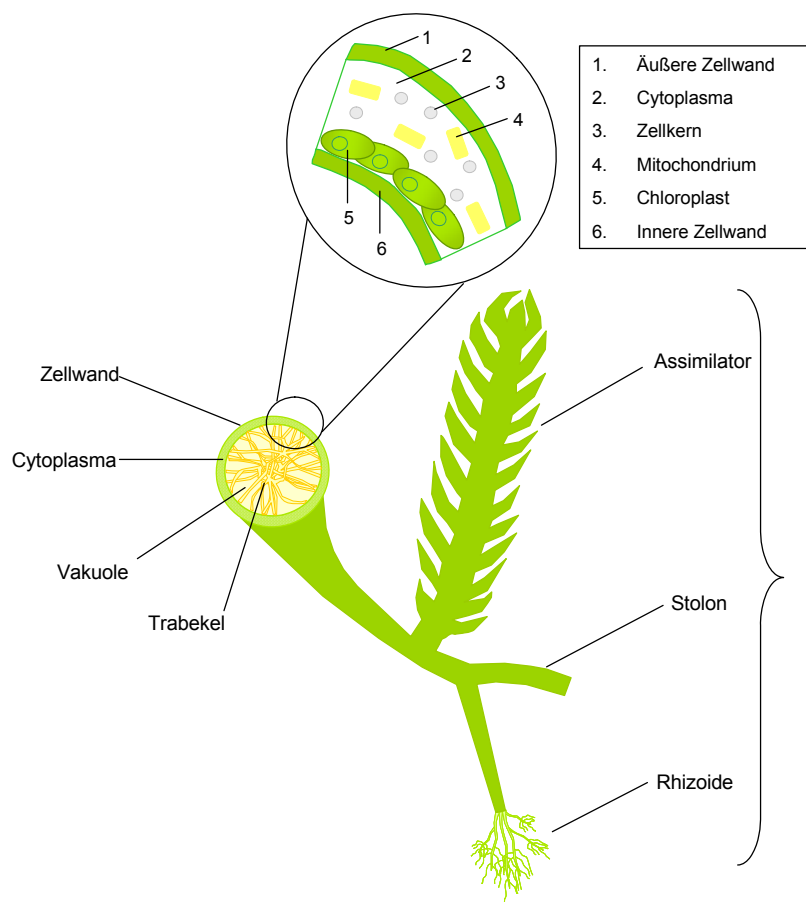


Abbildung 1-14: Schematische Darstellung von *C. taxifolia* mit Querschnitt durch den Stolon. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Zusammensetzung des Zytoplasmas. Mit freundlicher Genehmigung von V. Jung^[60]

Obwohl es sich bei *C. taxifolia* um eine einzellige Alge handelt, sind drei morphologisch unterschiedliche Einheiten zu finden:



- Stolon, der schlauchförmige Hauptstamm der Alge
- Assimilatoren, die aus dem Hauptstamm hervorgehen
- Rhizoide, die die Alge am Substrat verankern

Die Zellen mehrzelliger Algenarten, wie z. B. *Ulva* spp. (Meeressalat) sind in der Regel 100–250 μm^2 groß.^[61] Da sich die einzelne Zelle bei siphonalen Algen über eine Länge von bis zu über einem Meter erstrecken kann,^[62, 63] ist es für die Regulierung des Stoffwechsels unerlässlich, dass sie über eine große Anzahl von Zellkernen verfügt.^[64] Als Beispiel ist dies an der siphonalen Alge *Vaucheria* spp. illustriert, bei der die Zellkerne mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs hellblau angefärbt wurden (Abb. 1-16).^[65]

Abbildung 1-15:
Funktionelle Abschnitte von
C. taxifolia. Mit freundlicher
Genehmigung von V. Jung^[60]

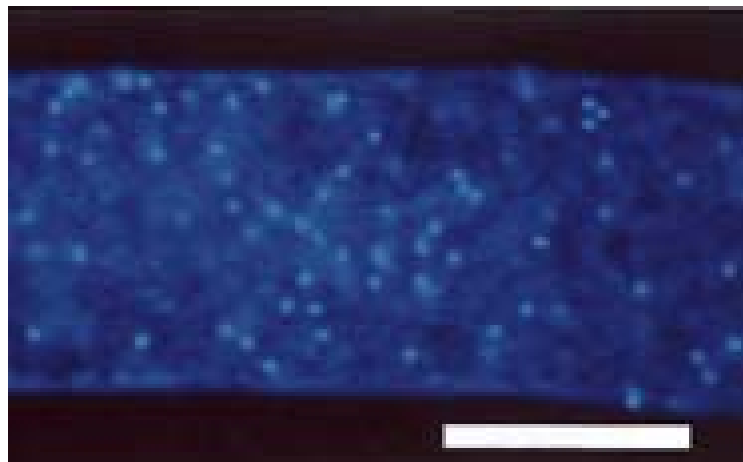


Abbildung 1-16: Mit DAPI abgefärbte Zellkerne bei *Vaucheria* spp., Takahashi et al.^[65],
Skalierung = 50 μm
Mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press

1.4.1 Ökologische Relevanz von *C. taxifolia*

Bei *C. taxifolia* handelt es sich ursprünglich um eine im tropischen Raum weit verbreitete Alge, wie in Abb. 1-17 zu sehen ist.

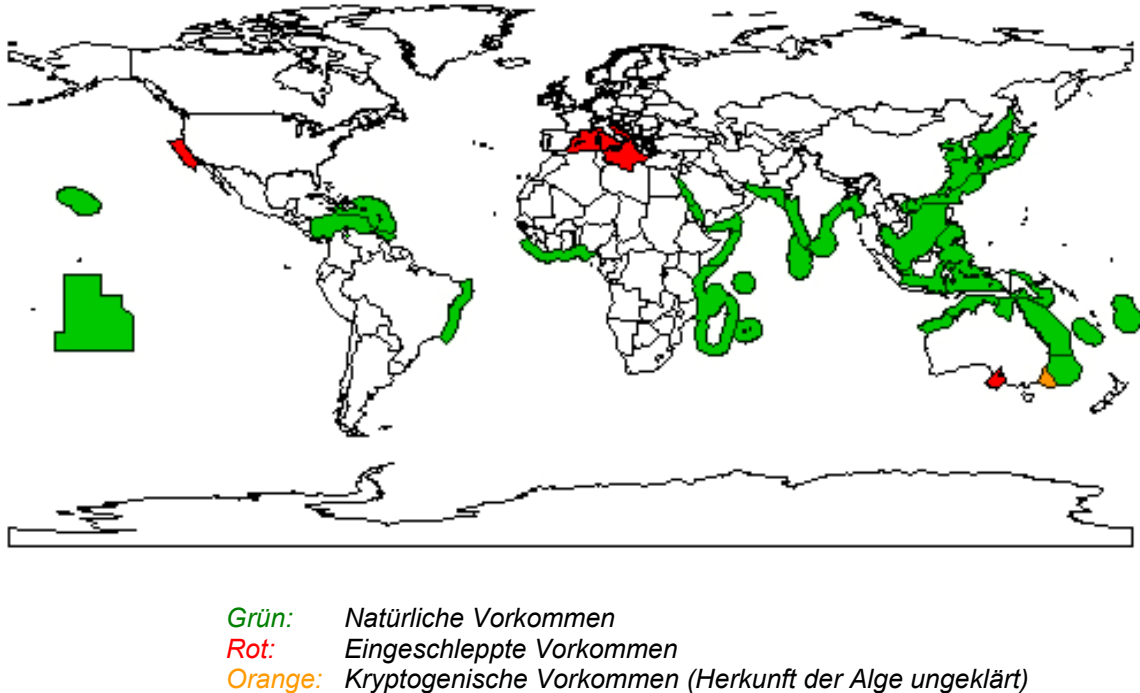


Abbildung 1-17: Globale Verbreitung der Grünalge *C. taxifolia*, Stand 2002, nach NIMPIS^[66]

C. taxifolia wurde 1984 im Mittelmeer vor der Küste Monacos entdeckt. Aufgrund ihrer hohen Substrat-, Temperatur- und Lichttoleranz breitete sie sich seit ihrer Einschleppung ins Mittelmeer mit exponentiellem Wachstum aus.^[67] Während die von *C. taxifolia* bewachsene Fläche 1984 1 m² betrug, waren 1990 schon 3 ha betroffen, 1993 wurden 1000 bis 2000 ha gemessen, 2001 waren es bereits 13.000 ha^[68] und das Wachstum setzt sich bis heute fort.^[67] Durch genetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mittelmeerpopulation um einen Stamm handelt, der seit 1970 als Zieralge für Seewasseraquarien verwendet wird und ursprünglich im australischen Raum beheimatet war. Er wurde im Zoologisch Botanischen Garten Stuttgart kultiviert und von dort aus unter anderem an das Ozeanographische Institut in Monaco verschickt.^[69-71] *C. taxifolia* stellt eine große Bedrohung für die Ökosysteme der betroffenen Meere dar, da sie in zusammenhängenden Wiesen wächst und die ursprüngliche Flora überwuchert.^[72-74]

So werden im Mittelmeer unter anderem Posidonia (Seegras)-Wiesen überwachsen, wodurch Laichplätze und Aufzuchtstellen für heimische Fischarten wegfallen, was großen Einfluss auf die Flora und Fauna hat und weiterhin haben wird.^[75] Verlaque *et al.*

zeigten in einer vergleichenden Studie, dass mit der Zeit eine schrittweise Verarmung an heimischen Spezies auftritt und sich eine *C. taxifolia* Monokultur ausbilden wird.^[76]



Abbildung 1-18: *C. taxifolia* überwächst die im Mittelmeer heimische Flora. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von A. Žuljević, Split

C. taxifolia vermehrt sich in ihrem neuen Habitat, in dem keine weiblichen Algen dieser Spezies entdeckt wurden, ungeschlechtlich durch Fragmentierung.^[77] Die z. B. durch Anker von Sportbooten oder durch Fischernetzte entstehenden Fragmente^[78] enthalten durch die beschriebene hohe Anzahl an Zellkernen die komplette genetische Information und sorgen so nach dem Anwachsen an einem neuen Standort für die Ausbildung neuer Kolonien.^[79] Der Erfolg dieser Vermehrungsstrategie ist daran zu erkennen, dass es sich bei der gesamten Population um einen einzigen männlichen Klon handelt.^[69]

Ähnliche Probleme wie im Mittelmeer können auch in anderen Lebensräumen entstehen, in die *C. taxifolia* inzwischen eingeschleppt wurde. Die Alge ist in der Lage, bei absoluter Dunkelheit, 18°C Umgebungstemperatur und 85 % Luftfeuchtigkeit zehn Tage außerhalb des Wassers zu überleben und nach dem Zurücksetzen ins Meer weiter zu wachsen.^[80] So überlebt sie auch über längere Strecken in Ballastwassertanks von Schiffen und kann in bisher noch nicht betroffene Ökosysteme eingebracht werden. Ein weiterer Risikofaktor

ist das versehentliche Aussetzen von Algen aus Seewasseraquarien, wie es im Mittelmeer geschehen sein könnte.^[69] Durch einen dieser Faktoren wurde die Alge inzwischen auch in Kalifornien^[74, 81] und Australien eingeschleppt.^[82, 83] Von Famà *et al.* konnte gezeigt werden, dass es sich bei all diesen Populationen um denselben Stamm wie im Mittelmeer handelt.^[68] Dieser zeichnet sich durch eine sehr hohe Robustheit aus und ist relativ unempfindlich gegen niedrige Temperaturen.^[82] Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass *C. taxifolia* auch in den neu besetzten Habitaten gute Überlebens- und Ausbreitungschancen haben wird.

In allen genannten Gebieten wurden inzwischen Versuche unternommen, die Alge auszurotten. So wurde beispielsweise in Kalifornien Chlorbleiche (Natriumhypochlorid) eingesetzt, um die Algen in dem betroffenen Bereich zu entfernen.^[84] Dazu wurden die Algen mit Folie gegenüber der Umgebung abgeschirmt und die Chlorbleiche direkt in das Seewasser eingeleitet, wodurch die Population in diesem Bereich eingedämmt werden konnte. In Australien wurde Natriumchlorid in lokal sehr hohen Konzentrationen auf *C. taxifolia*-Kolonien gegeben, um diese abzutöten.^[85] Diese Maßnahme hatte auch in einem gewissen Rahmen Erfolg; die Population konnte verkleinert werden, ohne dabei die heimische Flora zu stark zu verändern. Allerdings ist die in Australien betroffene Fläche schon zu groß, um dieses Verfahren flächendeckend einzusetzen. Es wurde ebenfalls versucht, die Algen durch manuelles Entfernen durch Taucher einzudämmen, jedoch blieben dabei die schlecht sichtbaren, im Sediment liegenden Algenteile intakt und bildeten anschließend neue Kolonien aus.^[85] So führte letztlich keine der eingesetzten Methoden in Australien zu dem gewünschten langfristigen Erfolg. Ein ähnliches Verfahren wie der Einsatz von erhöhten Salzkonzentrationen^[86] und das Abtöten der Algen durch lokales Einleiten von kaltem Wasser wurden in Frankreich patentiert^[87], allerdings ist die betroffene Fläche auch hier zu groß, als dass durch diese Methoden ein Erfolg zu verzeichnen wäre.^[88]

1.5 Wundverschlussreaktionen bei siphonalen Algen

Mehrzellige Organismen benötigen in der Regel keine Reparatursysteme für beschädigte Zellen, da diese absterben und durch nachwachsendes umliegendes Gewebe ersetzt werden. Da es sich bei den siphonalen Algen jedoch um einzellige Organismen handelt, würden sie die Verletzung nicht überleben, da das Zytoplasma und somit alle Organellen, die zum Überleben und zur Reproduktion benötigt werden, in das sie umgebende Medium austreten würden. Sie benötigen deshalb ein System, um das verwundete Gewebe von dem es umgebenden Medium abzuschirmen und die Zelle somit zu schützen. Ein Vertreter der Klasse der siphonalen Algen ist *Dasycladus vermicularis*, eine Grünalge,

welche in den litoralen Zonen (Uferregion) des Nordostatlantiks (Kanarische Inseln), des Nordwestatlantiks (Antillen) und im Mittelmeer auftritt.^[89]

Bei dieser nur einige Zentimeter großen Alge läuft eine Wundverschlussreaktion über oxidative Prozesse ab.^[90, 91] Direkt nach der Verwundung tritt ein Teil des Zytoplasmas und des Vakuoleninhalts in das sie umgebende Seewasser aus, das verbleibende Zytoplasma zieht sich in das Zelleninnere zurück. Diese Zellbestandteile formen dann innerhalb von 2 Minuten ein Gel, welches die Zelle gegen die Umwelt isoliert. Dieses Gel besteht hauptsächlich aus teilweise sulfatierten Zuckern und Lectinen (mit Sacchariden wechselwirkende Proteine). Anschliessend findet die Freisetzung von H₂O₂ (**4**) in einen so genannten „oxidative burst“ statt. Dadurch kommt es zu einer Braunfärbung des angrenzenden Gewebes und zur Ausbildung eines stabilen Wundverschlusses.^[90] Ross *et al.* vermuten, dass diese Verfärbung auf die Oxidation des bereits bekannten und isolierten 3,6,7-Trihydroxycoumarins (**37**)^[92] zu dem entsprechenden Chinon zurückzuführen ist. Diese phenolische Verbindung könnte in Quervernetzungsprozessen reagieren.^[90]

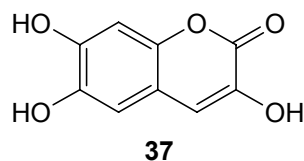


Abbildung 1-19: 3,6,7-Trihydroxycoumarin (**37**), isoliert aus *Dasycladus vermicularis*

Ein anderer Mechanismus der Wundreaktion ist bei der ebenfalls siphonalen Grünalge *Bryopsis plumosa* zu beobachten (Abb. 1-20). Bei dieser weit verbreiteten Alge tritt nach mechanischer Verletzung zuerst der Zellinhalt in das sie umgebende Medium aus. Anschließend kommt es in einem Zeitraum von ca. 10 Minuten durch Wechselwirkungen zwischen Lectinen und Kohlenhydraten zur Agglomeration der Zellorganellen, welche sich in einer runden Form anordnen.^[93] Um diese Ansammlung von Zellorganellen, die einen Durchmesser von zwischen 50 und 200 µm aufweist, bildet sich dann nach 10 bis 20 Minuten eine Membran aus. Dieser primäre Umschlag besteht in erster Linie aus Polysacchariden, was durch deren Abbau durch α-Mannosidase bestätigt werden konnte.^[94] Obwohl diese Schutzschicht auf Kohlenhydraten basiert, weist sie Eigenschaften von Zellmembranen – so z. B. Semipermeabilität – auf. Innerhalb von zwölf Stunden wird diese primäre Schutzhülle dann nach und nach durch eine sekundäre ersetzt. Diese auf Lipiden basierende Membran bildet sich im Inneren der neu entstandenen Zellen und wird von dort aus nach außen transportiert.^[94] So hat sich am Ende dieser Wundreaktion eine Zelle mit vollständiger Membran entwickelt, welche in der

Lage ist, an anderen Standorten Kolonien hervorzubringen und somit die Art weiter zu verbreiten.^[95]

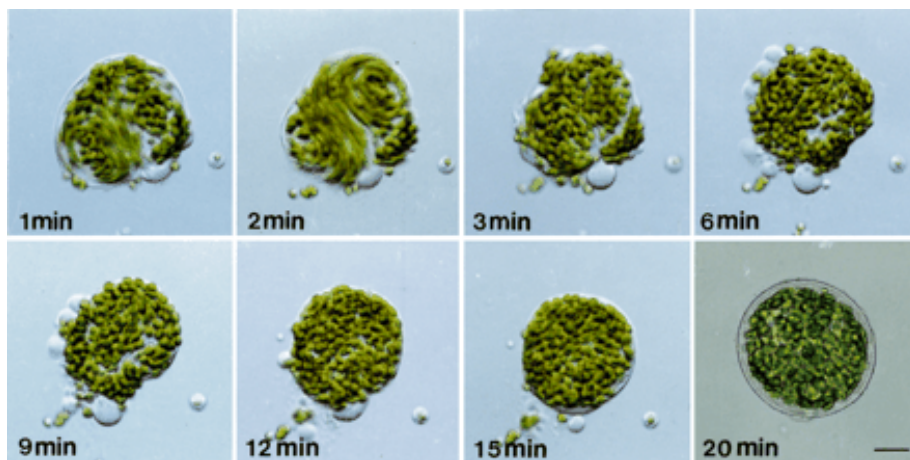


Abbildung 1-20: Ausbildung der Zellmembran nach Verwundung von *Bryopsis plumosa*, Kim et al.^[94] Mit freundlicher Genehmigung von *The Company of Biologists Ltd.*

Im Gegensatz zu diesen sehr detaillierten Untersuchungen ist über die Wundverschlussreaktion bei *Caulerpa*-Arten nur wenig bekannt. Direkt nach der Verwundung verschließen diese Algen die betroffene Stelle mit einem gelartigen Wundverschluss, was in Abb. 1-21 anhand einer Aufnahme von *C. taxifolia* illustriert ist.



2000 μm

Abbildung 1-21: Wundverschluss bei *C. taxifolia*

2 Aufgabenstellung

Über die Ausbildung des Wundverschlusses der einzelligen marinen Grünalpengattung *Caulerpa* war bisher nur wenig bekannt. Die Kenntnisse basierten größtenteils auf licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Dreher und Menzel aus den Jahren 1978 bis 1988. Diese eingehenden morphologischen Untersuchungen von verwundeter *Caulerpa simpliciuscula* beschrieben detailliert die zeitliche Abfolge der Verwundungsreaktion. In kolorimetrischen Untersuchungen wurden darüber hinaus Proteine und Kohlehydrate als Hauptbestandteile des Wundpfropfens nachgewiesen.^[62, 96, 97] Eingehende Untersuchungen der molekularen Abläufe nach Verwundung wurden allerdings nicht durchgeführt. Von Jung wurde 2003 gezeigt, dass nach Verwundung von *C. taxifolia* eine Reihe enzymatischer Prozesse einsetzen, die zur Umwandlung des Hauptsekundärmetaboliten Caulerpenin (**17**) führen. In diesen Untersuchungen wurden erste Anzeichen entdeckt, dass ein Zusammenhang zwischen der Umwandlung von Caulerpenin (**17**) und der Ausbildung des Wundverschlusses besteht.^[60] Ziel dieser Arbeit ist es, den molekularen Mechanismus der Wundverschlussreaktion aufzuklären.

- Durch das Erstellen zeitabhängiger metabolischer Profile soll untersucht werden, wie sich die Zusammensetzung der Alge nach der Verwundung des Gewebes verändert. Diese Studien sollen sowohl niedermolekulare Verbindungen, wie Sekundärmetabolite, als auch Proteine und Polymere umfassen.
- Durch den Einsatz eines fluoreszent markierten Histons soll die Beteiligung von Proteinen an der Wundverschlussbildung überprüft werden.
- Die Algenmatrix stellt ein Problem bei der Charakterisierung der bei der Wundreaktion entstehenden Verbindungen dar. Aus diesem Grund soll ein Modellsystem entwickelt werden, welches in der Lage ist, die Prozesse, die nach Verwundung von *C. taxifolia* auftreten, im zellfreien System zu simulieren. Ein solches Modellsystem ist notwendig, um entstehende Produkte analytisch zu erfassen und zu charakterisieren; die erhaltenen Ergebnisse sollen dann auf die Abläufe in der Alge übertragen werden. Dadurch soll es möglich werden, die an der Wundverschlussreaktion beteiligten Verbindungen eindeutig zu identifizieren sowie den Ablauf der Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* aufzuklären.

Sollte ein Einfluss der Wundreaktion auf die Protein- und Metabolitenebene von *C. taxifolia* nachweisbar sein, soll weitergehend untersucht werden, wie sich diese unterschiedlichen Faktoren auf die Nahrungsqualität der Alge für deren Fraßfeinde auswirken.

- Durch Vergleich des Aminosäureprofils von intakter und verwundeter Alge soll der Einfluss der Wundreaktion auf die Verfügbarkeit von Aminosäuren für Herbivoren untersucht werden.
- In Bioassays soll überprüft werden, ob die Produkte der Wundreaktion oder aber der Sekundärmetabolit Caulerpenin (**17**) für die hohe Fraßresistenz der Alge verantwortlich sind.

Wundreaktionen sind nicht nur bei Makro-, sondern auch bei Mikroalgen wie z. B. Diatomeen zu beobachten. Die bei diesen Algen als Verteidigungsmetabolite wirkenden ungesättigten Aldehyde sind fettsäureabgeleitet und ihre Biosynthese lässt sich größtenteils durch den oxidativen Abbau weit verbreiteter Fettsäuren erklären. Die Freisetzung von Octatrienal (**80**) setzt jedoch die Umwandlung der ungewöhnlichen, terminal ungesättigten 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (**96**) voraus.

- Durch die synthetische Herstellung der Fettsäure **96** und deren deuteriummarkierten Analogon soll ein Werkzeug bereitgestellt werden, mit dem der postulierte Biosyntheseweg verifiziert oder falsifiziert werden kann.
- Dazu soll eine Syntheseroute entwickelt werden, die, ausgehend von einem zentralen Synthon, die Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei gleichzeitiger Isotopenmarkierung ermöglicht. Damit soll generell ein einfacher Zugang zu dieser Substanzklasse ermöglicht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *Caulerpa taxifolia*

Aufgrund ihres Organisationsniveaus ist die Wundverschlussreaktion für siphonale Grünalgen wie z. B. *C. taxifolia* von vitaler Bedeutung. Diese einzellige Algengattung ist im Gegensatz zu mehrzelligen Lebensformen nicht in der Lage, eine verwundete Zelle durch anderes nachwachsendes Gewebe zu ersetzen. Deshalb muss sich die Alge innerhalb kürzester Zeit durch einen Schutzmechanismus, der die entstandene Wunde verschließt, gegenüber dem sie umgebenden Medium abschirmen, um ihr Überleben zu sichern. Wie in Kapitel 1.5 (Wundverschlussreaktionen bei siphonalen Algen) dargestellt, sind die morphologischen Abläufe nach Verwundung bei *Bryopsis plumosa* oder bei der Gattung *Caulerpales* gut dokumentiert.^[62, 93-97] Die molekularen Grundlagen, auf denen die Wundverschlussreaktionen beruhen, sind jedoch weitestgehend unerforscht. Zwar ist die verwundungsaktivierte Umwandlung von Metaboliten bei z. B. *C. taxifolia* bekannt, ein Einfluss dieser Reaktion auf den Wundverschluss konnte jedoch nicht bewiesen werden.^[60, 98]

3.1.1 Verwundungsaktivierte Reaktionen

Von Jung und Pohnert wurde der Einfluss der Verwundung auf die Sekundärmetabolite der Alge untersucht. Dazu wurde nach mechanischer Zerstörung des Gewebes 2,4-Dinitrophenylhydrazin eingesetzt, um labile Produkte abzufangen und zu charakterisieren.^[98] Die entstehenden Derivate wurden extrahiert, mittels NP-HPLC/MS untersucht und ihre Struktur mit Hilfe von Referenzsubstanzen synthetisch dargestellter Standards aufgeklärt. Die im Labor herbeigeführte künstliche Verwundung und der Einsatz von Derivatisierungsreagenzien von Jung und Pohnert trugen dazu bei, den Einfluss der Gewebeerstörung auf die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite der Alge zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Hauptsekundärmetabolit von *C. taxifolia*, Caulerpenin (**17**), durch Esterasen schrittweise deacetyliert wird, wie in Abb. 3-1 zu sehen ist. Dabei werden die Enole **38** und **39** freigesetzt, welche dann im tautomeren Gleichgewicht mit den entsprechenden reaktiven ungesättigten Aldehyden stehen.^[60, 98]

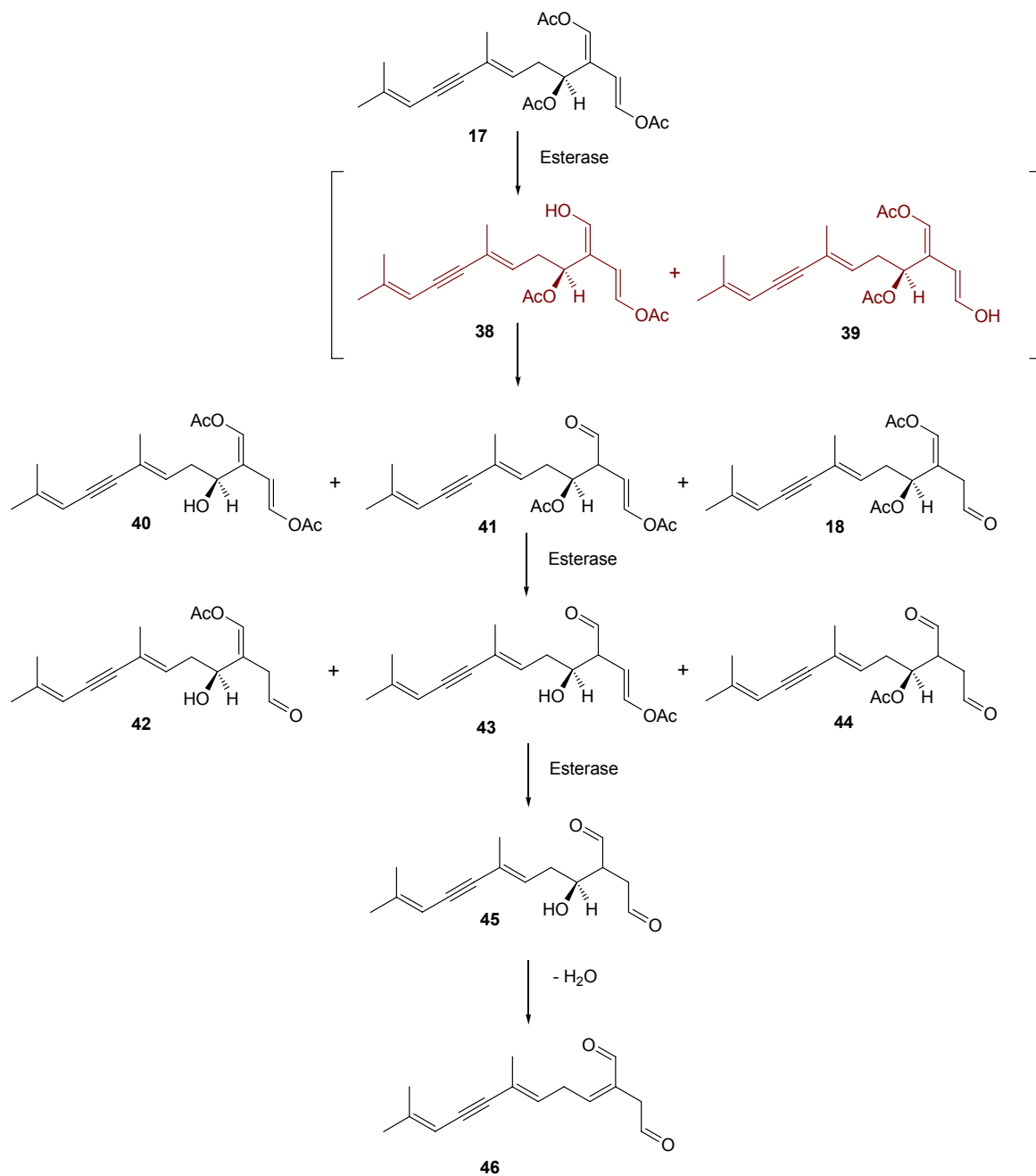


Abbildung 3-1: Enzymatische Umwandlung von Caulerpenin (17) zu Oxytoxin 2 (46) nach Verwendung von *C. taxifolia*. Rot: enolische Zwischenstufen nach Jung^[60]

Nach der Abspaltung sämtlicher Acetylgruppen erfolgt die spontane Wassereliminierung an der C4-Alkoholfunktion, was zur Ausbildung des konjugierten 1,4-Dialdehyds Oxytoxin 2 (46) führt. Die Oxytoxine 1 (18) und 2 (46) sind Verbindungen, welche von Cimino *et al.* 1990 isoliert wurden. Sie wurden in der marinen Schnecke *Oxynoe olivacea* nachgewiesen, die verschiedenen Caulerpa-Arten frisst und die Metabolite 18 und 46 in ihrem Verteidigungssekret speichert.^[99] In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verteidigungsmetabolite der Schnecke von Caulerpenin (17) abgeleitet

sind und *O. olivacea* in der Lage ist, über einen anderen enzymatischen Weg als *C. taxifolia* Caulerpenin (**17**) aktiv in Oxytoxin 2 (**46**) zu überführen.^[100]

Der Mechanismus der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung von *C. taxifolia* lässt zwei Möglichkeiten der Initialisierung der Deacetylierungsreaktion zu: entweder wird eine Kompartimentierung der Alge aufgehoben und es kommt dadurch zu einer Vermischung des Substrats Caulerpenin (**17**) mit der Esterase, wodurch die enzymatische Kaskade ausgelöst wird oder es wird ein Signal übermittelt, das bei Zerstörung der Alge gebildet wird, z. B. die Freisetzung eines Co-Faktors, wodurch die Esterase aktiviert wird. In Kooperation mit dem Lehrstuhl Physikalische Chemie (Biophotonik/Materialphotonik) der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde versucht, Caulerpenin (**17**) in Algengewebe zu lokalisieren, um die Theorie der Kompartimentierung zu überprüfen. Dazu wurde die Alge mittels Raman-Mikroskopie untersucht, um die gesamte Alge nach der lokalen Verteilung des Sesquiterpens **17** zu scannen. Allerdings war das Signal von Caulerpenin (**17**) im Algengewebe zu schwach, um eine mögliche Lokalisierung in abgegrenzten Kompartimenten nachweisen zu können.

Um die Hypothese des Einflusses eines Co-Faktors oder Signals zu überprüfen und die an der Umwandlung beteiligte(n) Esterase(n) näher zu charakterisieren wurde versucht, diese aus der Alge zu isolieren und aufzureinigen. Dazu wurde die Alge zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen, um an der Oberfläche anhaftende Bakterien oder andere Algen aus der Aquariumskultur zu entfernen. Anschließend erfolgte die reversible Inaktivierung der Enzymaktivität, indem die Alge mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die so behandelte Alge wurde gemörsert, um einen möglichst großen Extraktionserfolg zu erreichen. Anschließend wurde die noch gefrorene Alge für 5 Minuten mit 50 mmol HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure))/NaOH-Puffer (pH = 7) extrahiert. Die Algenbestandteile wurden mittels Zentrifugation von der wässrigen Phase (A) abgetrennt und wieder in Puffer resuspendiert (B). Mit diesen zwei Fraktionen wurde separat ein Aktivitätstest durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Umwandlung des Modellsubstrats Geranylacetat zu Geraniol.^[60] Hierbei lässt sich feststellen, dass in der resuspendierten Algenlösung (B) größere Esteraseaktivität zu beobachten ist als in der Pufferphase (A). Trotzdem wurde versucht, durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eine aktive Fraktion der Pufferlösung (A) nachzuweisen, da hier bereits eine Vortrennung der Algenbestandteile stattgefunden hatte. Dazu wurden der Pufferlösung (A) schrittweise bis zum Erreichen der maximalen Sättigung Ammoniumsulfat zugesetzt und die ausfallenden Enzyme isoliert. Es konnte hierbei jedoch in keiner Fraktion erhöhte Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass für die enzymatische Aktivität die Beteiligung eines Co-Faktors nötig ist oder dass es sich bei der Esterase um ein membrangebundenes

Protein handelt, welches durch den verwendeten Extraktionspuffer nur schwer in Lösung zu bringen ist. Da jedoch die resuspendierten Algenfragmente (B) aktiver waren als das Extrakt (A), spricht dies eher für das Vorhandensein eines membrangebundenen Proteins. Deshalb wurde ein modifizierter Extraktionspuffer aus 50 mM TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)/MES (2-(N-Morpholin)-ethansulfonsäure) mit einem pH-Wert von 7 und 10 mM CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat) als Detergenz eingesetzt, um so membrangebundene oder -assoziierte Proteine in Lösung zu bringen.^[101] Durch den Zusatz von CHAPS gelang es, die Esteraseaktivität in der Pufferlösung zu erhöhen. Anschließend wurde durch Größenausschlussfiltration versucht, die erhaltenen Esterase weiter aufzureinigen. Hierzu wurde die Pufferlösung über Viva-spin-Filter mit verschiedenen molekularen cut-offs filtriert. Bei diesen Filtern werden Moleküle, deren Masse über dem als cut-off definierten Wert liegen, durch eine Membran im Überstand festgehalten. Sämtliche kleineren Moleküle finden sich dann im Filtrat wieder. Es wurden Filter mit cut-offs von 5, 30, 50 und 100 kDa eingesetzt, die aktive Fraktion war allerdings immer im Rückstand und nicht im Filtrat zu finden. Dasselbe galt auch für den Fall, dass eine rein mechanische Barriere (Filter mit 0,22 µm Porenweite) benutzt wurde, die nicht in der Lage ist, Proteine zurückzuhalten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der gesuchten Esterase um ein membrangebundenes oder -assoziiertes Enzym handelt, das sich auf diesem Weg nicht isolieren lässt. Die Aktivität des Überstandes (A) lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass sich immer noch Reste der Zellmembran suspendiert in der Pufferlösung befanden oder eine nicht-membrangebundene, weniger aktive Esterase aus der Alge extrahiert wurde. Die weitere langwierige und schwierige Isolierung eines Membranproteins war im Rahmen dieser Dissertation nicht durchführbar.

3.1.2 Wundverschlussreaktion

3.1.2.1 Morphologische Untersuchungen

Erste Erkenntnisse der Wundverschlussreaktion der Algengattung *Caulerpales* bezogen sich vorwiegend auf die morphologische Beobachtung der Wundverschlussreaktion bei *C. simpliciuscula*. So zeigten Dreher *et al.* und Menzel *et al.* durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass nach Verwundung der Alge (Bild A in Abb. 3-2) die folgenden Prozesse ablaufen:

1. Aus der Alge treten durch den hohen Innendruck Zellbestandteile nach außen und bilden dort einen gelartigen Pfropfen, der die Wunde von dem sie umgebenden Medium isoliert. (Abb. 3-2, B).
2. Es erfolgt der Rückzug des Zytoplasmas weg von der Verwundungsstelle und hin zum Inneren der Zelle. Dadurch wird der noch intakte Teil der Zelle von dem von der Verwundung betroffenen Teil separiert. (Abb.3-2, C).
3. Auf der Innenseite (zum intakten Zellbestandteil hin) des Wundverschlusses wird eine neue Zellwand aufgebaut, die die Alge permanent verschließt. Der Algenteil, der den primären Wundverschluss gebildet hat, stirbt anschließend ab (D). Dieser Prozess ist nach wenigen Tagen abgeschlossen.^[62, 96]

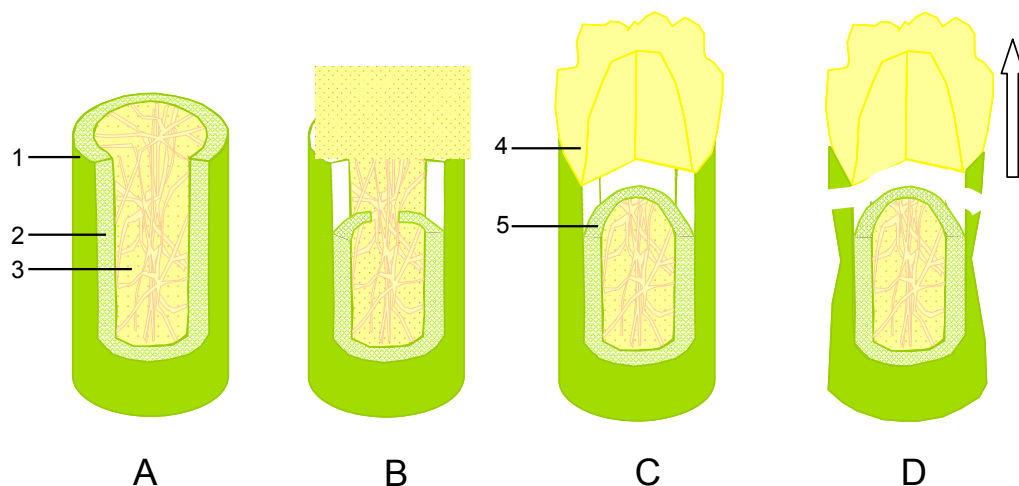


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Wundverschlussreaktion bei *C. taxifolia*. A: Verwundung der Alge. B: Der Vakuoleninhalt tritt aus und polymerisiert. C: Das Zytoplasma zieht sich zurück und bildet einen inneren Wundverschluss. D: In wenigen Tagen wird eine neue Zellwand aufgebaut und der externe Wundverschluss wird von der Alge abgestoßen.

1 = Zellwand, 2 = Zytoplasma, 3 = Vakuole, 4 = externer (primärer) Wundverschluss, 5 = interner (sekundärer) Wundverschluss
 Mit freundlicher Genehmigung von V. Jung^[60]

Mit Hilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen von *C. taxifolia* konnte ein ähnlicher Verlauf der von *C. simpliciuscula* bekannten Wundverschlussreaktion beobachtet werden (Abb. 3-3). Auch hier tritt direkt nach der Verwundung der Zellinhalt der Alge in das sie umgebende Medium aus. Aus dem Algenmaterial entsteht dort ein gelartiger Pfropfen, der die Alge verschließt. Nach wenigen Tagen hat die Alge eine neue Zellwand ausgebildet und das Gewebe kurz hinter dem Wundverschluss stirbt ab.



Abbildung 3-3: Primärer Wundverschluss von *C. taxifolia*

3.1.2.2 Untersuchungen mittels HPLC/MS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob die von Dreher *et al.* beobachteten Wundverschlussmechanismen mit der verwundungsaktivierten Caulerpeninumwandlung bei *C. taxifolia* zeitlich korrelieren und im funktionellen Zusammenhang miteinander stehen. Um die mechanische Verwundung zu simulieren, wurde die Alge komplett zermörsert. Diese Methode kann jedoch nur als Annäherung an die natürliche Verwundung gesehen werden, da z. B. Befraß nur zu lokal begrenzten Schäden und nicht zur Zerstörung des gesamten Organismus führt. Um jedoch Probenhomogenität zu gewährleisten und dadurch ein einheitliches Muster von Folgemetaboliten zu erhalten, ist es unumgänglich, die gesamte Alge zu zerstören, da es sonst zu einer Überlagerung von Metaboliten aus dem intakten und verwundeten Teil der Alge in derselben Probe kommen würde. Durch diese Überlagerung wäre dann die Unterscheidung von bereits in der intakten Alge vorhandenen Metaboliten und denen aus der Gewebeerzörung resultierenden Folgeprodukten nur schwer möglich.

In Analogie zur mechanischen Zerstörung wird an der von der Verwundung durch z. B. Herbivorie betroffenen Stelle ebenfalls die Integrität der Zelle zerstört, was die eigentliche Verwundungsreaktion auslöst. Dabei kommt es zur Vereinigung von sonst durch Membranen separierten flüssigen Zellbestandteilen (Zytoplasma und Vakuoleninhalt) und zum Kontakt mit der Zellwand der Alge. Da die mechanische Gewebeerzörung ähnlich dem auslösenden Faktor bei der Verwundungsreaktion ist, kann die hier verwendete Methode als Modell zur Untersuchung der Wundreaktion der Alge benutzt werden.^[60]

Um den Anteil an Caulerpenin (**17**) in *C. taxifolia* zu ermitteln, wurde in Anlehnung an eine bereits bestehende Methode zur Quantifizierung dieses Metaboliten^[102] eine NP-HPLC/UV/MS-Methode entwickelt. Zur Extraktion des Sesquiterpens Caulerpenin (**17**) und dessen Folgeprodukten wurde die Alge in definierten Zeitabständen nach der Verwundung mit 250 µl *n*-Hexan pro g Feuchtwicht extrahiert und die organische Phase direkt auf die Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) aufgegeben. Als interner Standard (IS) diente *trans*-Stilben mit einem Anteil von 20 µg pro ml *n*-Hexan. Dabei wurden zu jedem Zeitpunkt drei voneinander unabhängige Messwerte erhoben. Durch dieses Experiment sollte die Kinetik der Metabolitenumwandlung nach Verwundung der Alge ermittelt werden. Caulerpenin (**17**) konnte aufgrund seines UV-Spektrums, der charakteristischen Massenfragmentierung und durch Retentionszeitvergleich mit einem aus *C. taxifolia* isolierten und chromatographisch aufgereinigten Standard eindeutig identifiziert werden. Allerdings liegt die Retentionszeit des Signals im selben Bereich wie das weiterer Metabolite der Alge. Auf die Entwicklung einer basislinientrennenden Methode wurde jedoch verzichtet, um die Laufzeit der Methode nicht zu verlängern. Da die entstehenden Metabolite sehr reaktiv und deshalb nur schwer quantifizierbar sind, hätte jede Methodenverlängerung ihren Gehalt weiter reduziert, ebenso die Wiederfindungsrate reduziert und somit die Reproduzierbarkeit der Methode insgesamt verringert. Deshalb wurde der Gehalt an Caulerpenin (**17**) über dessen charakteristische Fragment-Ionen bestimmt. Bei der chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck in der APCI-Quelle des Massenspektrometers kommt es zur Abspaltung von zwei Essigsäureresten, also zum Verlust von 120 Da im Vergleich zum Pseudomolekülion $[M+H]^+ = 375$ Da des Caulerpenins (**17**)^[60, 98] (Abb.: 3-4). Durch die Auswertung der Ionenspur konnte das für **17** typische Ion $m/z = 255$ zur Quantifizierung herangezogen werden (Abb. 3-5 C).

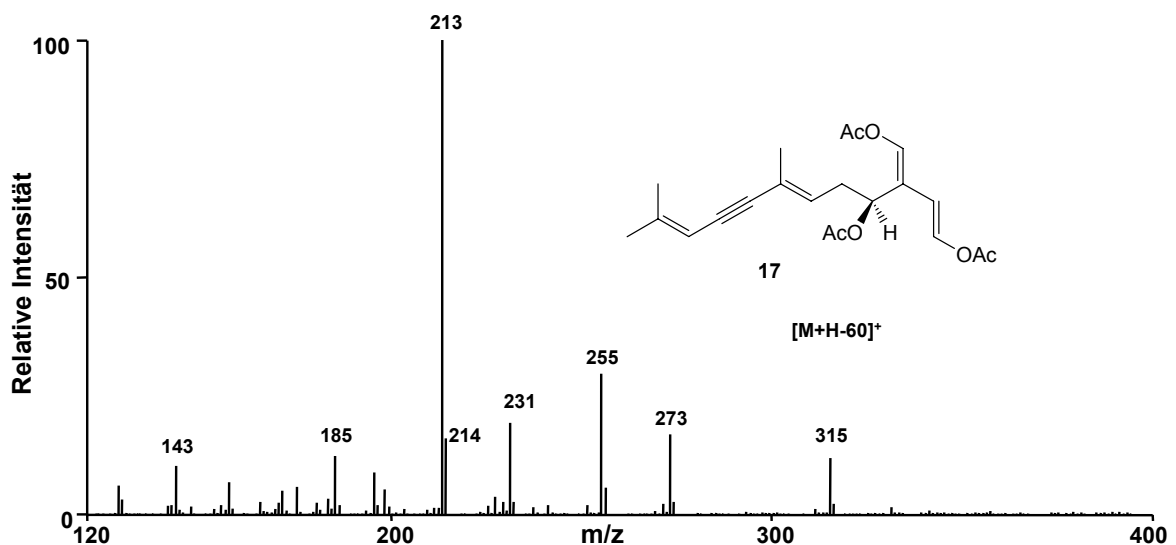


Abbildung 3-4: APCI-Massenspektrum von Caulerpenin (**17**)

Das caulerpeninabgeleitete Produkt wurde über das Pseudomolekülion $[M+H]^+ = 231$ Da quantifiziert. Das entspricht dem Verlust von CH_3COOH (**10**) und 2 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ aus dem Caulerpeninmolekül (**17**) und ist für das Endprodukt der enzymatischen Reaktion, Oxytoxin 2 (**46**), charakteristisch (vgl. Abb.3-1). Allerdings ist Oxytoxin 2 (**46**) nur in geringen Mengen vorhanden und aufgrund der ähnlichen chromatographischen Eigenschaften mit Caulerpenin (**17**) nicht von diesem getrennt, sondern als Flanke bei einer Retentionszeit von 10,8 Minuten zu erkennen (Abb. 3-5 A).

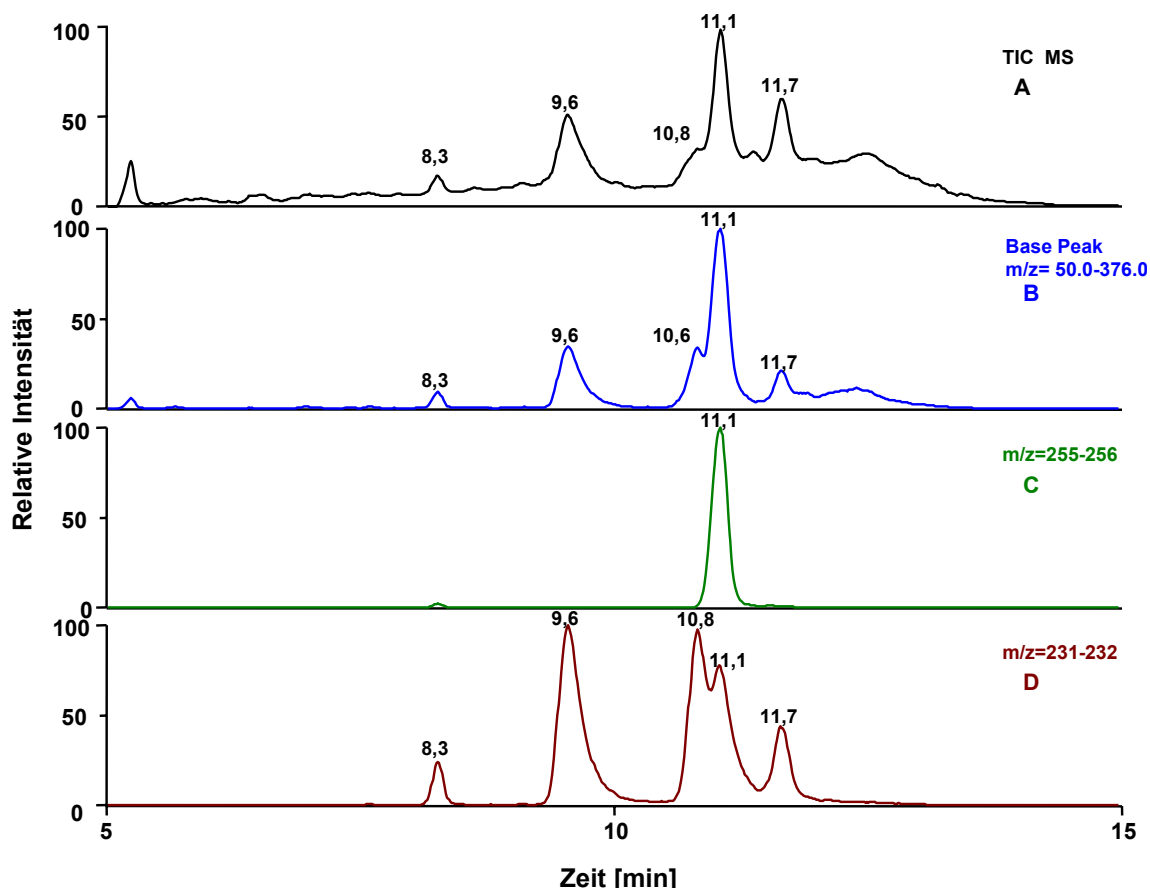


Abbildung 3-5: HPLC/MS-Läufe der Caulerpenin-Quantifizierung

A: Full scan mode (schwarz); B: Base peak (blau); C: SIM 255-256 (Caulerpenin (**17**)(grün)), D: SIM 231-232 (Abbauprodukte des Caulerpenins und Caulerpenin (**17**)(rot))

Der dominante neue Peak, der nach Verwundung der Alge zu beobachten ist, eluiert jedoch bei 9,6 Minuten. Das Molekülion ist mit $m/z = 231$ mit dem des Oxytoxins 2 (**46**) identisch, auch sonst weist das Massenspektrum starke Ähnlichkeit auf (Abb. 3-7 unten). Das UV-Spektrum hingegen zeigt nicht das charakteristische Muster des Caulerpenin (**17**)- und Oxytoxin 2 (**46**)-Gerüsts mit einem Maximum von 256 nm und Schultern bei 265 und 283 nm. Stattdessen ist eine bathochrome Verschiebung zu erkennen, das Absorptionsmaximum der Verbindung (**48**) liegt bei 316 nm; dies spricht für die Ausbildung eines durchkonjugierten π -Systems im Molekül.^[103] Ein Strukturvorschlag,

der die Massenfragmentierung sowie das UV-Spektrum dieser Verbindung erklären würde, ist ein aus Oxytoxin 2 (**46**) hervorgehendes Halbacetal (**48**) (Abb. 3-6)

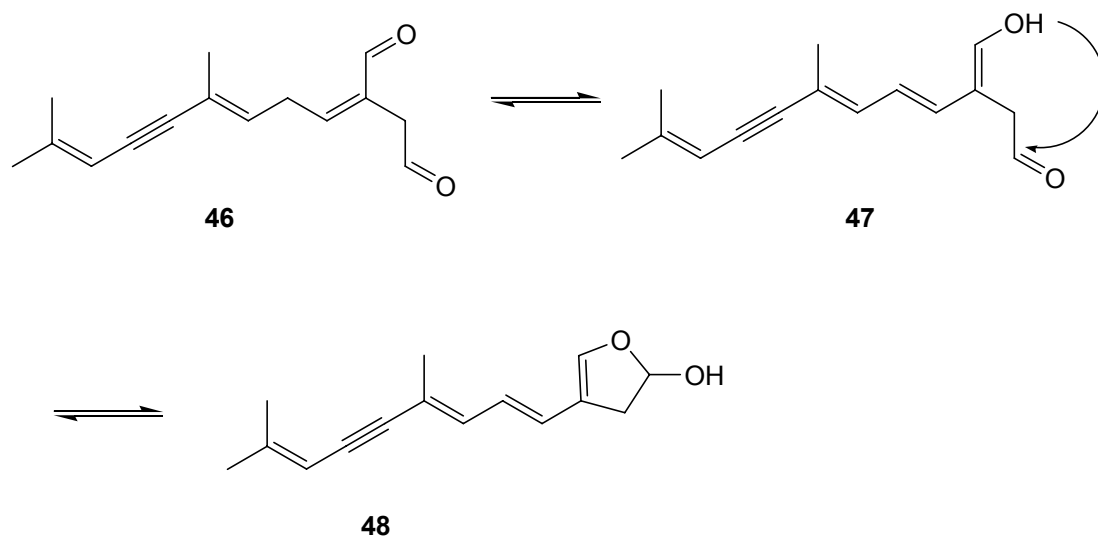


Abbildung 3-6: Strukturvorschlag und möglicher Bildungsweg des Halbacetals **48**

Die Verbindung **48** könnte aus dem mit Oxytoxin 2 (**46**) im Gleichgewicht liegenden Enol **47** durch nukleophilen Angriff des Alkohols am Aldehydkohlenstoff hervorgehen. Im Gegensatz zu intermolekular gebildeten Halbacetalen sind aus intramolekularen Reaktionen hervorgehende zyklische Halbacetale stabil.^[104] **48** verfügt sowohl über ein konjugiertes π -System als auch über ein Pseudomolekülion von $m/z = 231$ und ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie **46**. Aus den durchgeführten Analysen kann jedoch nur ein Strukturvorschlag für **48** abgeleitet werden, da die Verbindung nicht isoliert und spektroskopisch charakterisiert wurde. Eindeutig jedoch ist, dass dieses Molekül nach Verwundung der Alge als dominantes neues Signal auftritt, deshalb wurde es zur Bestimmung des Konzentrationsverlaufs der nach Verwundung von *C. taxifolia* entstehenden Produkte herangezogen (Abb. 3-5 D).

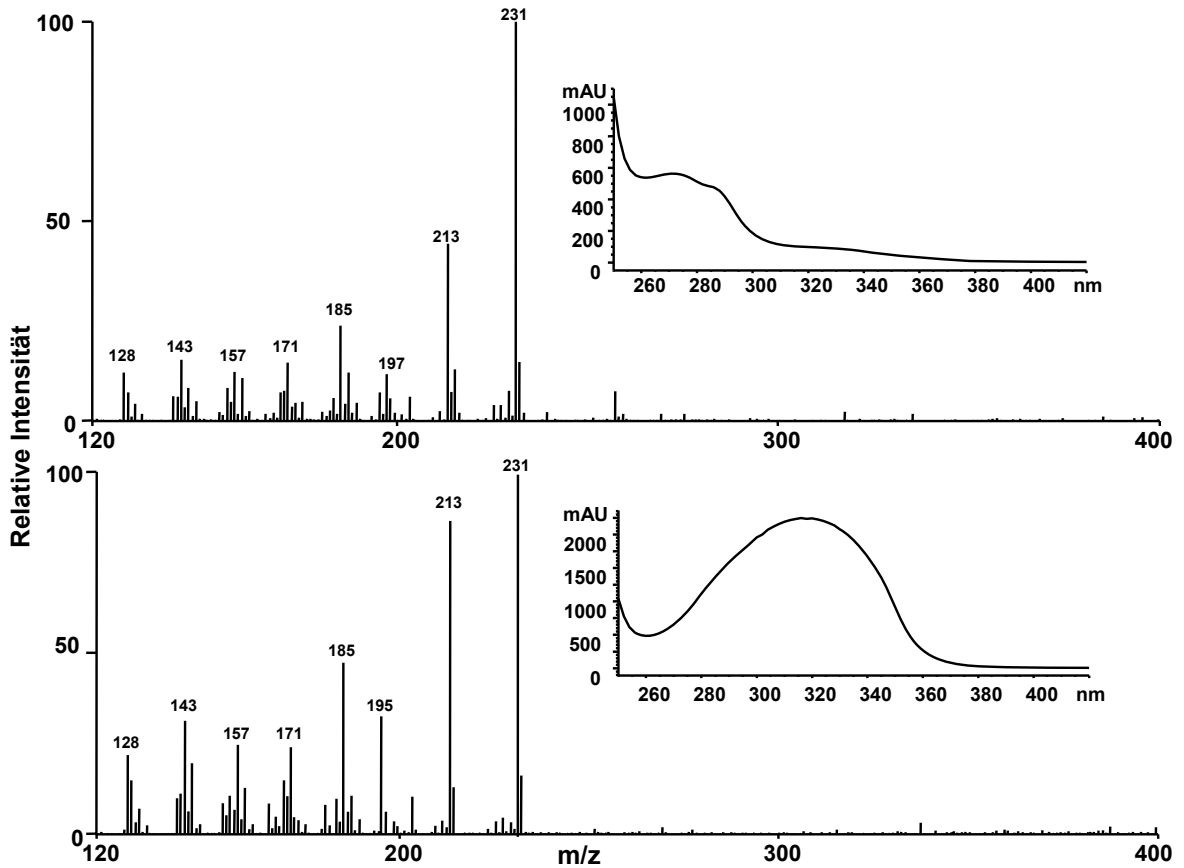


Abbildung 3-7: Massen- und UV-Spektren von Oxytoxin 2 (**46**) (oben) und dem aus diesem abgeleiteten Halbacetal (**48**) (unten)

Um trotz der unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften der einzelnen Verbindungen eine grobe Gehaltsabschätzung von Caulerpenin (**17**) und dem daraus durch enzymatische Reaktion entstehenden Produkt **48** anstellen zu können, wurden die charakteristischen Ionenspuren der Verbindungen mit dem Basispeakspektrum (Abb. 3-5 B) verglichen. Dazu wurde bei der Retentionszeit von Caulerpenin (**17**) bzw. **48** das Massenspektrum von $m/z = 50-376$ aus den Messungen extrahiert. Auf die Intensität dieses Spektrums, also die Gesamtheit der hier erhaltenen Ionen, wurden dann die Ionenspuren normiert. Durch diese Operation sind die Signalintensitäten der Verbindungen miteinander vergleichbar, wenn auch nicht quantifizierbar. Dieses Verfahren ist anwendbar, weil die zu diesen Retentionszeiten coeluiierenden Verbindungen über eine höheres Masse zu Ladungs-Verhältnis ($m/z > 400$) verfügen und somit nicht mit berücksichtigt werden. Da es aufgrund der Reaktivität von Oxytoxin 2 (**46**) und anderen aktiven Folgeprodukten des Caulerpeninabbaus nicht möglich ist, einen Standard dieser Verbindungen zu erhalten, und die absolute Konzentration von Caulerpenin (**17**) in *C. taxifolia* bekannt ist,^[40, 45, 60] sind jeweils nur die relativen Gehalte der untersuchten Verbindungen dargestellt.

Um den Caulerpeningehalt der intakten Alge bestimmen zu können, wurden Teile von *C. taxifolia* mit 0,33 µl 1 molarer Salzsäure pro mg Alge behandelt; dadurch wurde die Inhibierung der Enzymaktivität erreicht. Aus Abb. 3-8 kann nun der Konzentrationsverlauf des Caulerpenins (**17**) und dessen deacetylierten Folgemetaboliten **46** (anhand der Quantifizierung des daraus entstehenden Halbacetals **48**) während der Wundreaktion abgeleitet werden. Die hohe Variabilität der Werte und die daraus resultierende große Standardabweichung sind durch den schnellen enzymatischen Reaktionsverlauf in einem biologischen System und durch die Reaktivität der entstehenden Metabolite, welche im Laufe der Probenvorbereitung / chromatographischen Trennung nicht zwingend stabil sind, zu erklären. Allerdings ist trotz der hohen Standardabweichung deutlich der Verlauf der Reaktion und deren Geschwindigkeit zu erkennen.

Erwartungsgemäß sind in der intakten Alge keine Folgeprodukte der enzymatischen Caulerpeninumwandlung und ein hoher Gehalt an Caulerpenin (**17**) nachweisbar. Der Caulerpeningehalt sinkt dann im Zeitverlauf relativ schnell ab, bereits nach einer Minute hat sich der Anteil an Caulerpenin (**17**) halbiert, 8 Minuten nach der Verletzung ist es nicht mehr nachweisbar. Die Konzentration des caulerpeninabgeleiteten Folgeprodukts **48** steigt bereits nach 30 Sekunden signifikant an, durchläuft dann bei 2 Minuten ein Maximum und ist ebenfalls 8 Minuten nach Beginn der Verwundung nicht mehr nachweisbar. Ein vergleichbarer Reaktionsverlauf wurde bereits von Jung für *C. prolifera* gezeigt.^[60]

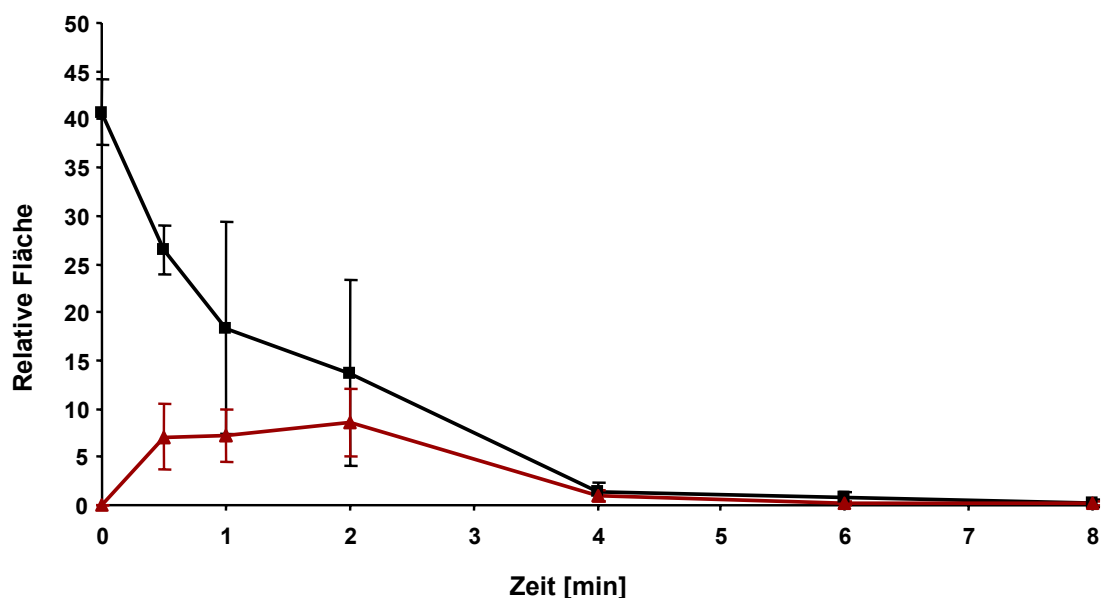


Abbildung 3-8: Konzentrationsverlauf von Caulerpenin (**17**) (schwarz) und dessen Folgeprodukt **48** (rot) nach mechanischer Verwundung von *C. taxifolia*

Der Konzentrationsverlauf des Caulerpenins (**17**) und des daraus entstehenden deacetylierten Produkts **48** erinnert an eine Folgereaktion erster Ordnung (Abb.3-9). Hierbei wird ein Edukt A zu einem Intermediat B umgesetzt, welches parallel zum Absinken der Konzentration von A ansteigt. Die Zwischenstufe B reagiert dann weiter zu Produkt C, welches im idealisierten Fall am Ende der Reaktion als einziges Produkt vorliegt.^[105]

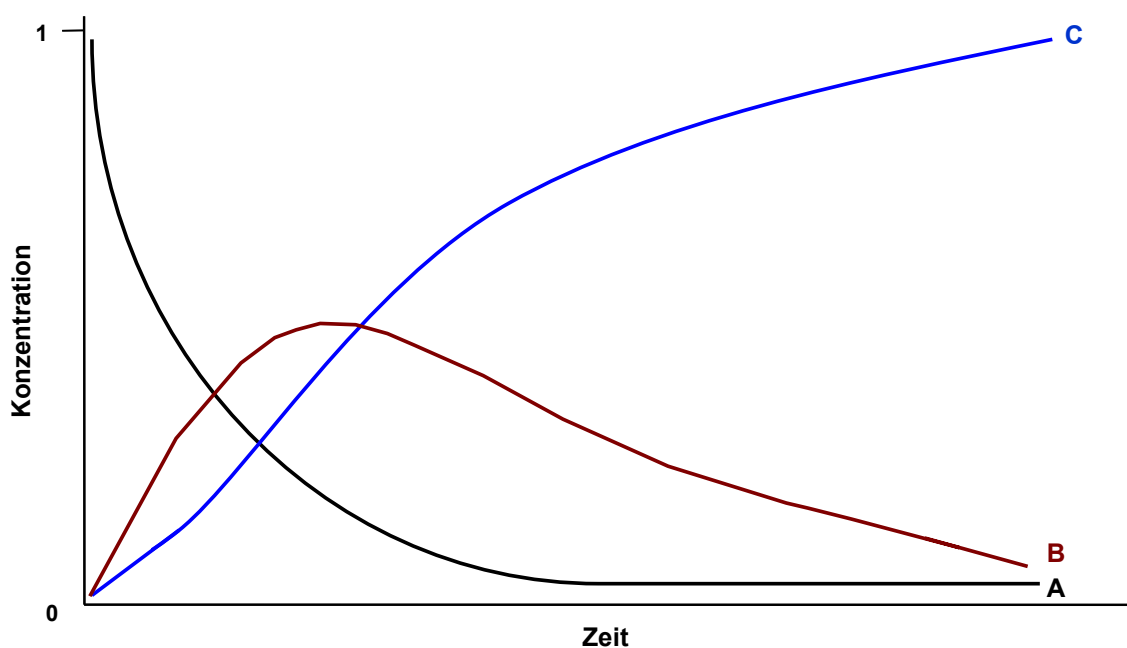


Abb. 3-9: Konzentrationsverlauf bei einer Folgereaktion erster Ordnung
 A = Edukt (schwarz),
 B = Zwischenprodukt (rot),
 C = Produkt (blau)

Im konkreten Fall der Caulerpeninumwandlung bei *C. taxifolia* würde dies bedeuten, dass Caulerpenin (**46**) in dessen deacetylierte Folgeprodukte **46** bzw. **48** überführt wird, welche dann ein Konzentrationsmaximum durchlaufen und anschließend zu einem Endprodukt weiterreagieren. Allerdings konnte weder durch den Einsatz von HPLC/UV/MS, GC/MS noch NMR ein eindeutiges Folgeprodukt nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Caulerpeninumwandlung im selben zeitlichen Rahmen liegt wie die Ausbildung des Wundverschlusses. Hier setzt die Ausbildung des gelatinösen Wundpfropfes bereits wenige Sekunden nach Auftreten der Verwundung ein. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das reaktive Intermediat Oxytoxin 2 (**46**) entweder mit sich selbst zu einem Polymer weiterreagiert oder durch Co-Polymerisationsreaktionen in ein Polymer eingebunden wird.

Cimino *et al.* dokumentierten bereits bei der Entdeckung von Oxytoxins 2 (**46**) dessen hohe Reaktivität. Die Aufnahme der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **46** gelang nur durch die direkte Extraktion der Schnecken mit deuteriertem Benzol und durch Subtraktion des

bereits vorher isolierten und charakterisierten Oxytoxin 1 (**18**) aus dem Spektrum. Eine weitere Aufreinigung und Charakterisierung der Verbindung war aufgrund ihrer Instabilität nicht möglich.^[99]

3.1.2.3 Gelelektrophoretische Studien

Oxytoxin 2 (**46**) weist aufgrund seiner Dialdehydstruktur große Ähnlichkeit mit Glutaraldehyd (**49**) auf. Dieser 1,5-Dialdehyd stellt einen Proteinquervernetzer dar, der durch Kondensationsreaktionen mit freien Aminfunktionen mit Proteinen ein hochmolekulares Co-Polymer ausbildet (Abb. 3-10). Aufgrund dieser Eigenschaft wird er z. B. zum Verkleben von Wunden in der Chirurgie und zum Fixieren von mikroskopischen Proben eingesetzt.^[97]

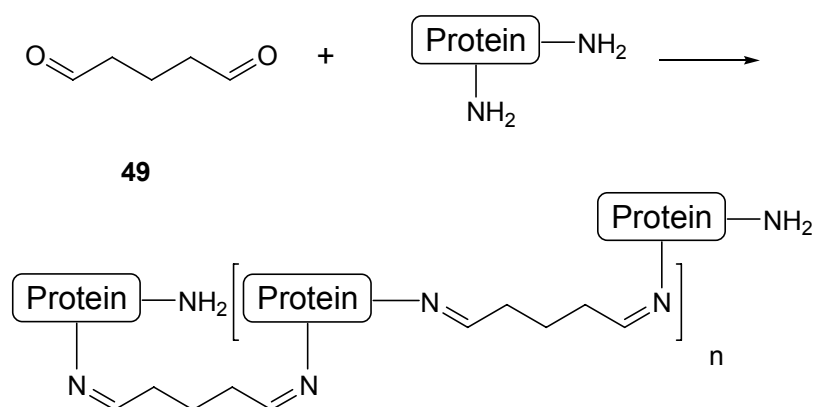


Abbildung 3-10: Vernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd (**49**)

Von Dreher *et al.* wurde weiterhin beobachtet, dass es zu einer Anreicherung von Proteinen im Wundverschluss von *C. taxifolia* kommt.^[97] Ausgehend von dieser Beobachtung wurde die Wundverschlussreaktion der Alge mit Hilfe der Gelelektrophorese auf Proteinebene untersucht. Das Trennprinzip dieser Methode beruht darauf, dass geladene Teilchen an einem Gel aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld separiert werden. Bei der hier verwendeten SDS-PAGE-Technik wird aus einer Mischung von Acrylamid und bis-Acrylamid, Natriumdodecylsulfat (SDS) und einem TRIS/HCl-Puffersystem mit Hilfe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) ein Gel mit definiertem pH-Wert hergestellt. Das Gel besteht aus zwei unterschiedlichen Zonen, dem Sammel- und dem Trenngel. Die aufgetragenen Proteine, die bei den im Gel vorhandenen pH-Werten (pH = 6,6 im Sammelgel bzw. pH = 9,1 im Trenngel) geladen vorliegen, werden durch das Anlegen einer elektrischen Spannung durch das Gel bewegt. Das Sammelgel verfügt, neben einem niedrigeren pH-Wert, über einen höheren Wasseranteil und somit größere Poren

als das Trenngel, wodurch alle Proteine, unabhängig von ihren molekularen Massen, ähnliche Laufeigenschaften aufweisen. Dadurch wird die Probe vor dem Erreichen des Trenngels fokussiert, was sich in schärferen Banden bemerkbar macht. Im Trenngel mit höherem pH-Wert und geringerer Porengröße werden die mit der Probe aufgebrauchten Proteine dann anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Dies geschieht über Wechselwirkungen der geladenen Proteine mit dem Gel, so dass die schweren Proteine nahe am Ausgangspunkt verbleiben, während die Proteine mit geringerer molekularer Masse durch das Gel bis zum Endpunkt wandern. Bei der eingesetzten SDS-PAGE-Technik handelt es sich um eine so genannte denaturierende Methode, da durch das verwendete SDS in Puffer und Gel nichtkovalente Bindungen der Proteine aufgebrochen werden, wodurch diese aufgrund ihrer veränderten Tertiärstruktur nicht mehr funktionsfähig sind. Zwar kann dadurch die Bestimmung einer spezifischen enzymatischen Aktivität nach der Trennung nicht mehr durchgeführt werden, dem steht jedoch der Vorteil gegenüber, dass durch den Einsatz denaturierender Techniken die Trennschärfe im Gel erhöht wird, was sich in fokussierteren Banden und somit einer leichteren Auswert- und Vergleichbarkeit einzelner Experimente niederschlägt.^[106]

Um das Proteinmuster der intakten Alge zu bestimmen, wurde *C. taxifolia* vor der Zerstörung des Gewebes 2 Minuten lang in kochendes Wasser gegeben, um deren

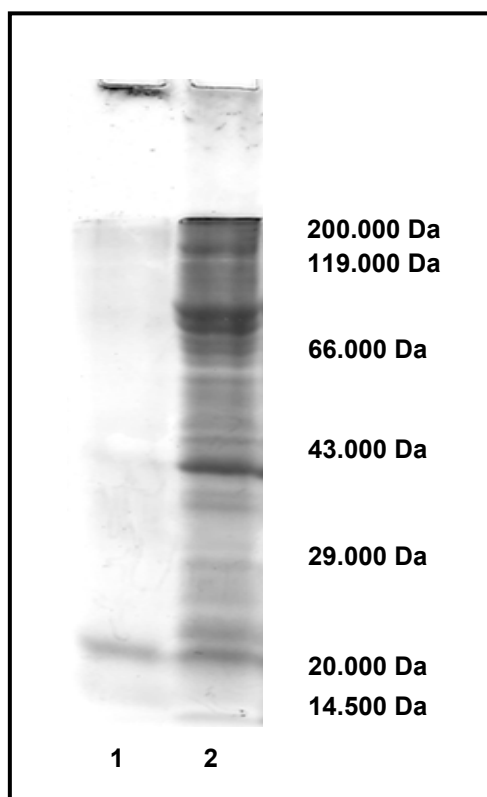


Abbildung 3-11:
Gelelektrophoretische
Untersuchungen von verwundeter (1)
und intakter (2) *C. taxifolia*

Enzymaktivität zu inhibieren, und anschließend gemörsert. Um auch den Anteil der nicht gelösten Proteine mit einer hohen molekularen Masse auf das Gel aufzubringen, wurde die Probe mit Ladepuffer versetzt und mit Ultraschall behandelt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Trennung erfolgte die Anfärbung der Proteine mit Coomassie Blau. Beim Vergleich der Proteinmuster der intakten mit der mechanisch verwundeten, nicht gekochten Alge zeigen sich deutliche Unterschiede, wie in Abb. 3-11 zu erkennen ist. Während bei der intakten Alge (2) eine Vielzahl scharf aufgelöster Banden zu beobachten ist, findet man bei der verwundeten Alge (1) nur noch wenige, eher diffuse Banden, darüber hinaus ist das Spektrum der Proteinmassen zum höhermolekularen Bereich hin verschoben. Der hier zu beobachtete Großteil der Proteine weist eine zu hohe molekulare Masse auf, um überhaupt

in das Gel einzudringen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass sich die Proteinzusammensetzung der Alge bei der Verwundungsreaktion ändert und somit eine Quervernetzungsreaktion beim Wundverschluss eine Rolle spielen kann. Standardmäßig wird bei der Probenvorbereitung für ein SDS-Gel Dithiothreitol (DTT) zugegeben, um Schwefelbrücken aufzubrechen.^[107] In vergleichenden Experimenten wurden Gele mit bzw. ohne Zugabe von DTT (3 µl 0,2 molarer wässriger Lösung pro 30 µl Probevolumen) präpariert und den resultierenden Bandenmustern gegenübergestellt, um die Bedeutung von Thiolbrücken für den Wundverschluss zu überprüfen. In den Gelen konnten keine Unterschiede beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nach Abschluss der Verwundungsreaktion die Spaltung der Schwefelbrücken keinen Einfluss mehr auf das Proteinmuster hat.

Das erhaltene Proteinmuster der intakten Alge ist sehr komplex. Es gibt nur wenige Proteine, die in deutlich höheren Anteilen vorhanden sind als andere und es gibt keinen Bereich im Gel, der frei von Proteinen ist, so dass eine neue Bande in diesem Bereich eine Di- oder Oligomerisierung von Proteinen belegen könnte. Um mögliche Oligomerisierungsprodukte trotzdem nachweisen zu können, wurde vor der Verwundung der Alge ein fluoreszenzmarkiertes Protein – es handelt sich hierbei um ein Histon des Typs H1 – zugesetzt. Bei der fluorophoren Gruppe, die an das Histon gebunden ist, handelt es sich um Alexa Fluor 488. Sie zeichnet sich durch hohe Photostabilität aus und ist bei einer Wellenlänge anregbar, bei der keine Eigenfluoreszenz der Alge zu beobachten ist.^[108] Histone dienen in der Zelle zur Regulierung der Zellteilung; in der Ruhephase der Zelle wickelt sich die DNA um die Histone, so dass ein Ablesen nicht möglich ist und die DNA platz sparend im Zellkern unterbracht werden kann. Histone zeichnen sich dadurch aus, dass sie über ausgesprochen viele basische Aminosäuren verfügen, die eine Interaktion mit der sauren DNA ermöglichen.^[109-111] Durch die Tatsache, dass Histone keine enzymatische Funktion haben, die die Wundreaktion von *C. taxifolia* beeinflussen könnte, und durch das Vorhandensein vieler Lysingruppen^[111], welche für eine Quervernetzungsreaktion nach bereits bekannten Mechanismen notwendig sind, stellt dieses markierte Protein ein ideales Untersuchungswerkzeug für die Wundreaktion dar. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Alexa Fluor 488 Histon, welche in Abb. 3-12 zu sehen sind (A-C), stützen die nach Coomassie Blau Färbung (1-3) gefundenen Resultate. Auf dem dargestellten Gel wurde in 1/A nur markiertes Protein geladen, in 2/B das markierte Protein zusammen mit intakter *C. taxifolia* und in 3/C die in Gegenwart des fluoreszente Histons verwundete Alge. Das fluoreszenzmarkierte Protein weist molekulare Masse von ca. 30 kDa auf. Bei der Anfärbung mit Coomassie Blau zeigt sich das gleiche Bild wie in den unbehandelten Algenproben.

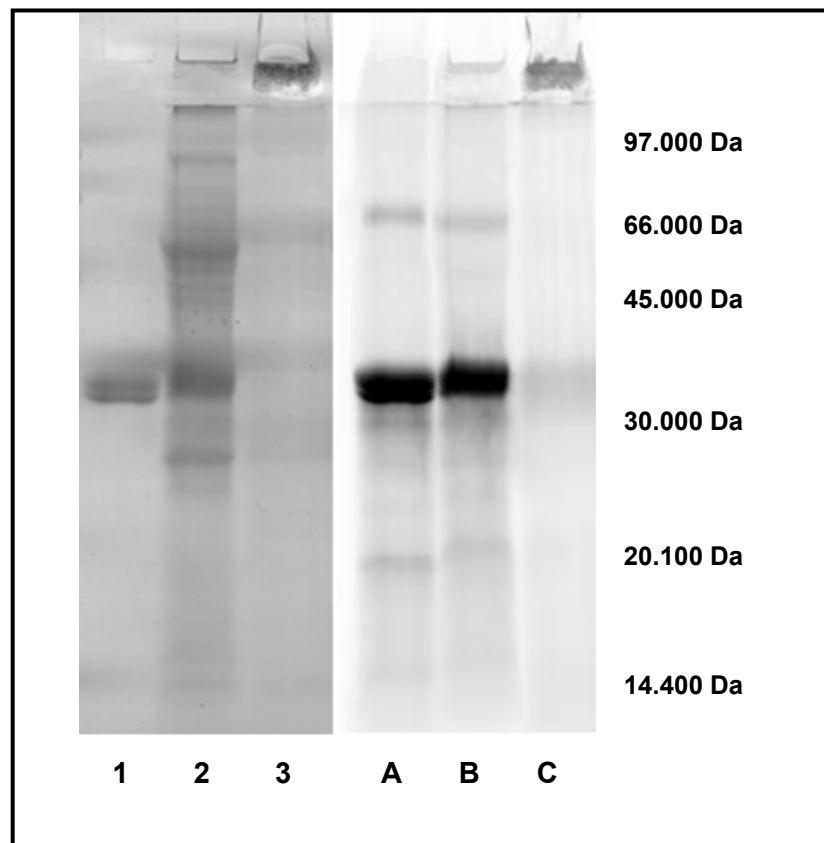


Abbildung 3-12: Gelelektrophoretische Untersuchungen von verwundeter und intakter C. taxifolia
 1/A = Alexa Fluor 488 Histon H1,
 2/B = intakte Alge
 3/B = verwundete Alge
 1,2,3 = Anfärbung mit Coomassie Blau
 A,B,C = Fluoreszenzanregung bei 488 nm

Bei der intakten Alge zeigt sich ein scharf aufgelöstes Muster vieler einzelner Banden, zu denen das Signal bei 30 kDa des markierten Histons hinzukommt. Diese Bande ist jedoch, eventuell durch Wechselwirkungen mit der Algenmatrix, zu höheren Massen hin verschoben. Bei der Probe der verwundeten Alge ist, wie schon bei den Untersuchungen der reinen Algenproben, eine starke Abreicherung der mit SDS-PAGE auftrennbaren Proteinmenge zu beobachten. Im Gegensatz dazu reichern sich in der Ladetasche des Gels Proteine an.

Deutlicher ist dieser Befund in den Fluoreszenzaufnahmen des Gels (A-C) zu sehen, da dort die Proteinmatrix der Alge nicht detektiert wird. Bei der Betrachtung des Histons in der intakten Algenprobe kann man klar die Hauptbande bei 30 kDa sowie Signale bei ca. 20 und 63 kDa identifizieren. In der verwundeten Alge hingegen ist nur noch sehr wenig des ursprünglich eingebrachten Histons nachzuweisen. Stattdessen ist ein starkes Fluoreszenzsignal in der Ladetasche des Gels zu beobachten. Es sind also keine

definierten Di- oder Trimere des markierten Proteins nachweisbar, sondern nur dessen Einbindung in ein Polymer von offensichtlich sehr hoher molekularer Masse.

Dieses hohe Molekulargewicht erklärt auch, weshalb mit den vorhergehenden Methoden kein Folgeprodukt der Wundverschlussreaktion nachgewiesen werden konnte. Die Polymere können die Trennsäulen der verwendeten chromatographischen Systeme nicht passieren und der Nachweis mittels NMR scheiterte an der geringen Löslichkeit der Polymere in den eingesetzten Lösungsmitteln und der Komplexität der Probe. Der Befund der gelelektrophoretischen Untersuchungen unterstützt die These, dass die Wundverschlussreaktion der Alge auf einer Proteinquervernetzungsreaktion basiert.

3.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um die erhaltenen Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen wurde *C. taxifolia* in Gegenwart des markierten Histons verwundet. Um dies zu realisieren, wurde in künstlichem Seewasser eine Lösung des fluoreszenten Histons hergestellt und die Alge mit einer Rasierklinge in dieser Lösung verwundet. Nach einer Stunde wurde die Alge dann aus dem Seewasser entfernt, mit destilliertem Wasser gewaschen, um an der Oberfläche anhaftende Proteinreste zu entfernen, und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3-13). Die Probe wurde zuerst mit einer Wellenlänge von 546 nm angeregt, um das im ganzen Gewebe vorhandene Chlorophyll zu detektieren.^[112] Anschließend wurde das fluoreszent markierte Histon mit einer Wellenlänge von 450 nm angeregt, um dessen Verteilung in der Probe zu untersuchen. Bei der unbehandelten Alge ist bei dieser Anregungswellenlänge keine Eigenfluoreszenz zu beobachten.

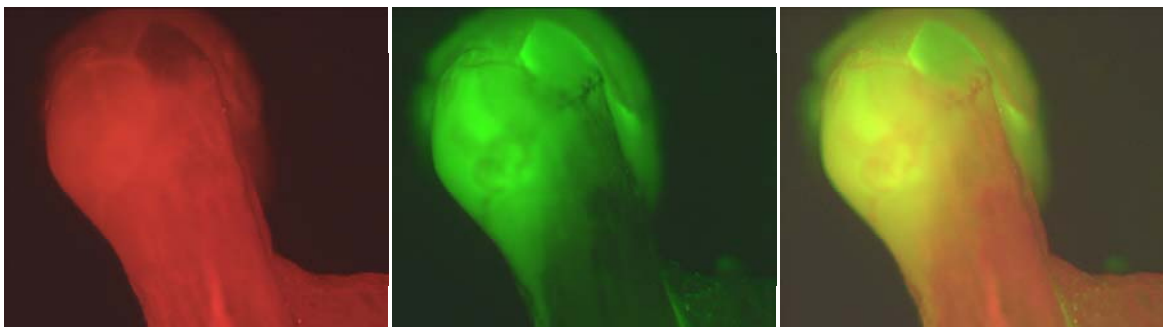
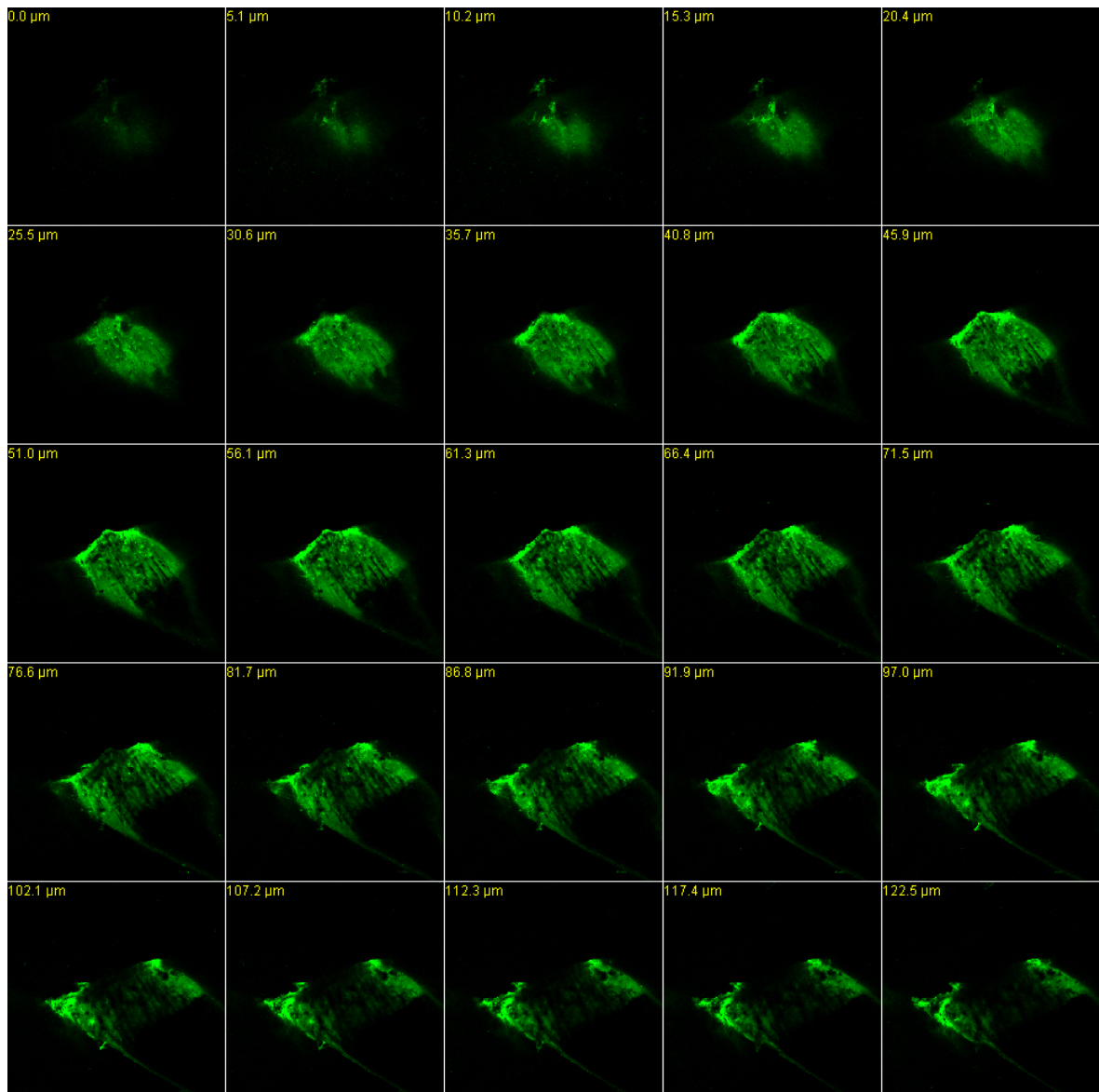


Abbildung 3-13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. taxifolia* nach Verwundung in mit Alexa Fluor 488 Histon H1 versetztem Seewasser. Links= Fluoreszenzanregung von Chlorophyll, Mitte= Fluoreszenzanregung von Alexa Fluor 488, rechts= Überlagerung der beiden Aufnahmen. Durchmesser der Alge ca. 500 μm .

In der Aufnahme der Chlorophyllanregung (rot dargestellt) ist sehr gut zu erkennen, dass aufgrund der Verteilung des Chlorophylls im gesamten Gewebe die Alge hier komplett abgebildet wird. Im Gegensatz dazu ist das markierte Protein stark im Wundverschluss der Alge angereichert. Die entsprechende grüne Fluoreszenz ist fast ausschließlich in diesem Bereich zu beobachten, es sind nur sehr geringe Anhaftungen im Bereich des Thallus zu finden. Zur Verdeutlichung dieses Resultats wurden die Aufnahmen der beiden Anregungswellenlängen miteinander kombiniert. Die gelbe Färbung, die vor allem in Teilen des Wundverschlusses zu sehen ist, stellt ein gleichzeitiges Auftreten von Chlorophyll und dem fluoreszenten Protein dar, während die intakten Bereiche der Alge ausschließlich Chlorophyllfluoreszenz zeigen; dies spricht für die Einbindung des markierten Histons in den externen, gelartigen Wundverschluss der Alge. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den erhaltenen Bildern nicht um Anhaftungen an dem klebrigen, gelatinösen Polymer des primären Wundverschlusses oder andere durch die Probenvorbereitung verursachten Phänomene handelt, wurde eine andere Algenprobe mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei dieser Technik erfolgt die Anregung einer bestimmten Wellenlänge durch einen Laser, welcher auf verschiedenen Ebenen des Untersuchungsobjektes fokussierbar ist. So ist es möglich, zerstörungsfreie Aufnahmen einzelner Schichten des Untersuchungsobjektes (Abb. 3-14) zu machen. Durch das Zusammenfügen der verschiedenen Ebenen kann eine dreidimensionale Darstellung des Objekts erreicht werden. In Abb. 3-14 sind verschiedene Ebenen einer, in Gegenwart von fluoreszentem Histon verletzten, Alge einen Tag nach der mechanischen Verwundung zu sehen. In diesem Zeitraum hat sich aus dem zu Beginn der Reaktion gelatinösen Polymer ein stabiler interner, sekundärer Wundverschluss gebildet (vgl. Kapitel 3.1.2.1 Morphologische Untersuchungen).^[62, 96]



*Abbildung 3-14: Konfokale Lasermikroskopische Aufnahmen des in den Wundverschluss von *C. taxifolia* eingebundenen Alexa Fluor 488 Histons H1. Gezeigt sind verschiedene Ebenen im Querschnitt des internen Wundverschlusses. Durchmesser der Alge ca. 500 µm.*

Die Aufnahmen zeigen deutlich, dass das Histon gleichmäßig in dem von der Alge ausgebildeten Wundverschluss nachzuweisen ist. Dadurch kann eindeutig gezeigt werden, dass es nicht nur zu einer Anlagerung des markierten Histons an der Oberfläche des Polymers kommt, sondern dass ein aktiver Einbau in den Wundpfropf stattfindet. Durch die Aufnahme einer Kontrollprobe, der kein markiertes Protein zugesetzt wurde, konnte bei dieser Untersuchung eine Eigenfluoreszenz des Gewebes ausgeschlossen werden (Abb. 3-15 links).

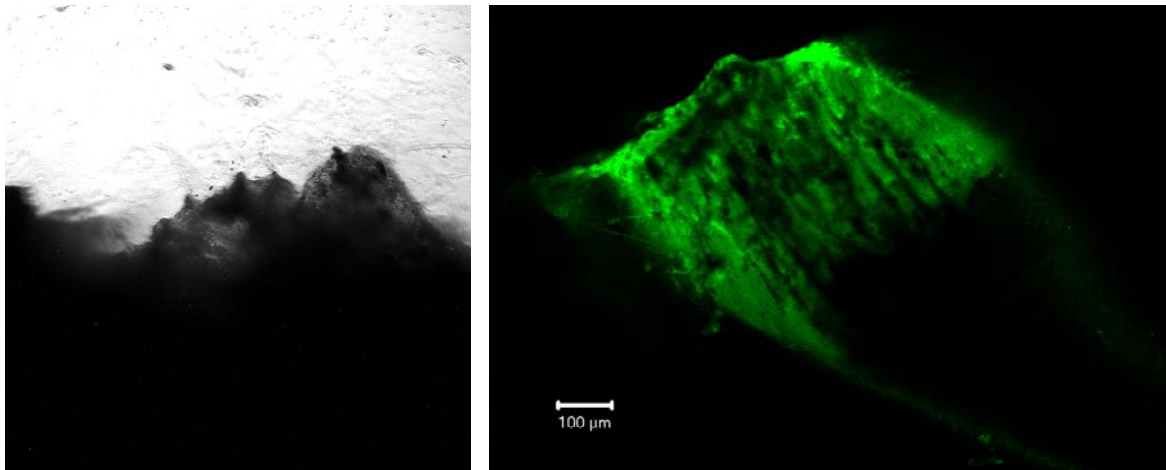


Abbildung 3-15: Konfokale Aufnahmen des Wundverschlusses von *C. taxifolia*. Links: ohne Zugabe des markierten Histons, rechts: Anreicherung des Alexa Fluor Histons H1 im Wundpfropf der Alge

In diesen Aufnahmen (Abb. 3-14 und 3-15) aus dem inneren Bereich der Alge ist eine Strukturierung des Wundverschlusses erkennbar. Hierbei zeigt sich, dass die vernetzten Proteine im Wundverschluss in einer fein vernetzten Anordnung vorliegen. Laut Dreher *et al.* besteht der Wundverschluss von *C. simpliciuscula* nicht nur aus Proteinen, sondern auch aus Kohlenhydraten.^[96, 97] Dreher *et al.* gingen in ihren Untersuchungen aus dem Jahre 1982 davon aus, dass der primäre Wundverschluss durch in der Alge vorhandene, sulfatierte Sacchariden in Verbindung mit dem sie umgebendem Seewasser gebildet wird. Ihre These wurde dadurch gestützt, dass aus verschiedenen *Caulerpa*-Spezies komplexe, hoch sulfatierte Glucomannosoglactane durch Extraktion mit heißem Wasser isoliert wurden, deren Gehalt bis zu 1 % der Trockenmasse der Alge ausmacht.^[96, 97] In ihren Versuchen wurde allerdings gezeigt, dass diese Zucker – anders als der aus Rotalgen bekannte Gelbildner λ -Carrageenan – nicht in der Lage sind, ein Gel zu bilden. Ein gelbildender Prozess durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Metallzentren und funktionalisierten Sacchariden, wie er sonst bei verschiedenen marinen Algen zu beobachten ist, findet nicht statt.^[113, 114] Auch die Zugabe der Proteine BSA oder Cytochrom C zum den im Seewasser gelösten sulfatierten Zuckern führte nicht zur Ausbildung eines Gels.^[97] Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch keine nichtkovalenten Bindungen zwischen Proteinen und Sacchariden für die Wundverschlussreaktion verantwortlich sind, anders als es z. B. bei der schon in der Einleitung erwähnten siphonalen Grünalge *Bryopsis plumosa* der Fall ist, bei der eine Membran durch Wechselwirkungen von Lectinen und Kohlenhydraten ausgebildet wird.^[93] Die von Dreher *et al.* durchgeführten Untersuchungen der Wundverschlüsse verschiedener *Caulerpa*les zeigten, dass diese reich an polymeren Verbindungen mit einer molekularen Masse von mehr als 1000 kDa sind.^[97] Diese, aus der einschlägigen

Literatur bekannten, Ergebnisse stehen im Einklang mit den, aus den durchgeführten gelelektrophoretischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erhaltenen, Resultaten. Aus der Tatsache, dass die sulfatierten Zucker laut Dreher *et al.* mit heißem Wasser aus dem Wundverschluss extrahiert werden konnten,^[97] ist abzuleiten, dass sie zwar im Wundverschluss enthalten sind, aber keine elementare Rolle bei dessen Ausbildung spielen, da sie weder kovalent noch über starke nichtkovalente Wechselwirkungen in diesen eingebunden sind. Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen (Abb.: 3-14 und Abb.: 3-15) zeigen unterschiedliche Bereiche des Wundverschlusses, die eventuell aus Proteinen und Sacchariden bestehen können. Die von Dreher *et al.* im Wundverschluss nachgewiesenen Polymere mit hohem Molekulargewicht sprechen klar für die Quervernetzung von Proteinen.

Die Quervernetzung von Proteinen durch verwundungsaktiviert freigesetzte Aldehyde wurde bereits bei terrestrischen Pflanzen untersucht. So wurde von Konno *et al.* durch den Einsatz der SDS-PAGE-Technik ein Proteinquervernetzer im Liguster (*Ligustrum obtusifolium*) identifiziert.^[115] Im Falle des Ligusters wurde folgender Mechanismus der Quervernetzung angenommen: Die Verwundung der Pflanze führt durch die Aufhebung der Zellkompartimentierung zur Vereinigung von dem in Vakuolen und Zytosol gespeicherte Oleuropein (**50**) mit Enzymen wie β -Glucosidase und Polyphenoloxidase aus den Zellorganellen (z. B. Chloroplasten). Dadurch wird der Brenzcatechinrest von **50** zu einem Chinonsystem oxidiert, welches dann mit dem freien ϵ -Amin des Lysins (**64**) reagieren kann (Abb. 3-16). In vergleichenden Studien mit Brenzcatechin und dem aus dem Liguster isolierten Enzymsystem konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Reaktion zwar einen nachweisbaren, aber eher geringen Anteil an der Quervernetzungsaktivität hat: Das weitaus aktivere Zentrum für die Vernetzungsreaktion von **51** wird durch eine β -Glucosidase generiert. Durch die Abspaltung der Glucose wird das zyklische/glucosidische Acetal von **50** gespalten, das entstehende Enol steht dann im tautomeren Gleichgewicht mit dem Aldehyd. Die zweite freigesetzte Aldehydfunktion wird von einer in Konjugation stehenden α,β -Doppelbindung flankiert. Dieses sehr reaktive System reagiert mit angebotenen Nucleophilen, was bei der Reaktion mit proteinogenem Lysin (**64**) zur Vernetzung von Proteinen durch die Ausbildung von **52** führt.^[115]

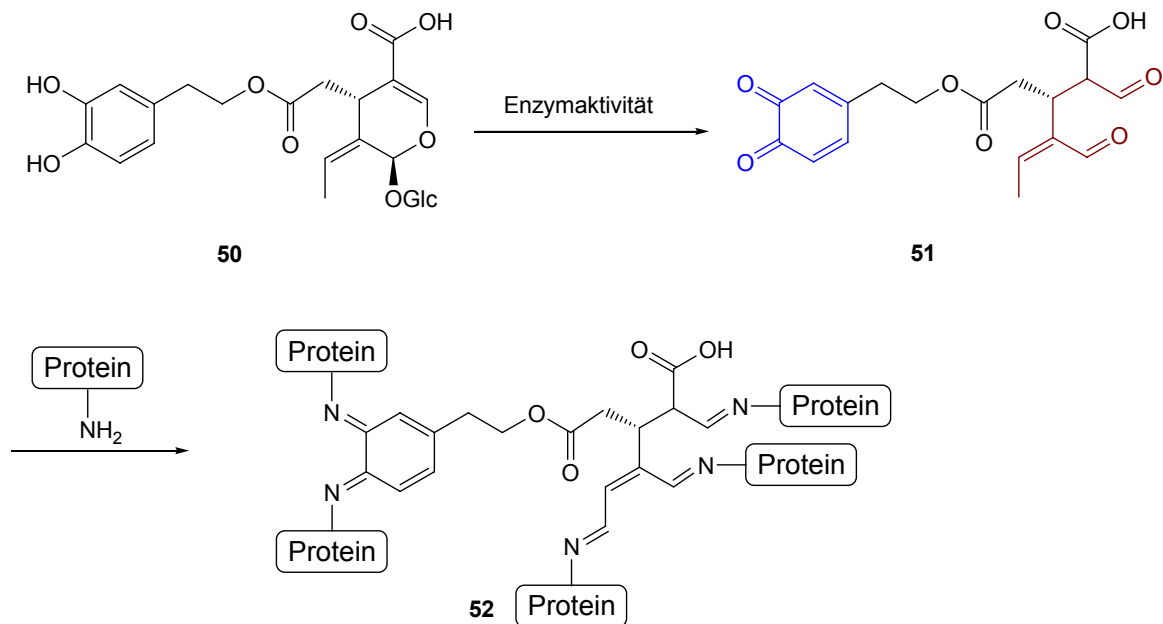


Abbildung 3-16: Vermuteter Mechanismus der Proteinquervernetzung bei *Ligustrum obtusifolium*. **Rot**: 1,5-Dialdehyd mit konjugierter Doppelbindung, **blau**: Chinon; nach Konno et al.^[115]

Konno *et al.* stellten in diesem Zusammenhang fest, dass durch die Quervernetzung von Proteinen die Nahrungsqualität des Ligusters für die auf ihm fressenden Raupen stark herabgesetzt wird, da Lysin (**64**) für die Herbivoren eine essentielle Aminosäure darstellt. Durch die Quervernetzung sinkt der Anteil an dem für die Raupen verwertbaren, nicht an Oleuropein (**50**)-abgeleiteten Produkten kovalent gebundenen Lysins (**64**) stark herab. Bestimmte *Lepidoptera*-Larven, deren Hauptnahrung Liguster ist, haben im Laufe der Evolution einen Abwehrmechanismus gegen diese Vernetzungsreaktion entwickelt, indem sie in ihrem Darm Glycin freisetzen. Die freie Aminosäure reagiert bevorzugt mit **51**, wodurch die proteindenaturierende Wirkung von Oleuropein (**50**) stark vermindert wird.^[116] Beim Liguster handelt es sich um die Abwehrreaktion einer Pflanze gegen Fraßfeinde und nicht, wie bei *C. taxifolia*, um eine Wundverschlussreaktion. Beiden gemeinsam ist allerdings, dass nach Zerstörung des Gewebes die Quervernetzung von Proteinen in Gang gesetzt wird.

3.1.3 Verwundung in Gegenwart von freien Aminosäuren

Versucht man nun, den von Konno *et al.*^[115] postulierten Mechanismus auf *C. taxifolia* zu übertragen, kann man von folgendem Prozessablauf ausgehen: Nach der Verwundung der Alge wird Caulerpenin (**17**) in eine aktive Verbindung überführt. Der Metabolit **46** nutzt dann die freien Aminogruppen von Proteinen dazu, diese in einem Co-Polymerisationsprozess zu vernetzen. In diesem Fall sollte die

Wundverschlussreaktion durch eine im Überschuss angebotene freie Aminosäure unterdrückbar sein. Zur Überprüfung der Hypothese, wurde die Alge in mit Lysin (**64**) gesättigtem Seewasser verwundet und die Wundreaktion mikroskopisch beobachtet, das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3-17 zu sehen.



Abbildung 3-17: *C. taxifolia* 1 Minute nach Verwundung in Seewasser mit 100 mg/ml Lysin (**64**)

Dabei ist zu beobachten, dass die Alge in Gegenwart eines großen Überschusses an Lysin (**64**) nicht in der Lage ist, den Wundverschluss auszubilden. Stattdessen läuft der gesamte Zellinhalt der Alge in das sie umgebende Medium aus und die Alge stirbt ab. Dies ist ein Hinweis darauf, dass hier, ähnlich wie bei der von Konno *et al.* beobachteten Quervernetzung im Liguster, ein Mechanismus vorliegt, welcher auf der Proteinvernetzung durch die Reaktion mit freien Aminen basiert.^[115]

Um mögliche Reaktionsprodukte von caulerpeninabgeleiteten Metaboliten mit Lysin (**64**) nachzuweisen, wurden das auslaufende Zytoplasma und das die Alge umgebende Medium mit HPLC/MS-Methoden untersucht; es war nicht möglich, einzelne, der Wundverschlussreaktion eindeutig zuzuordnende, Verbindungen nachzuweisen.

Zur näheren Untersuchung des Einflusses von Aminosäuren auf die Wundverschlussreaktion wurden mit Lysin (**64**) und Cystein (**73**) dotierte Algenproben mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-18).

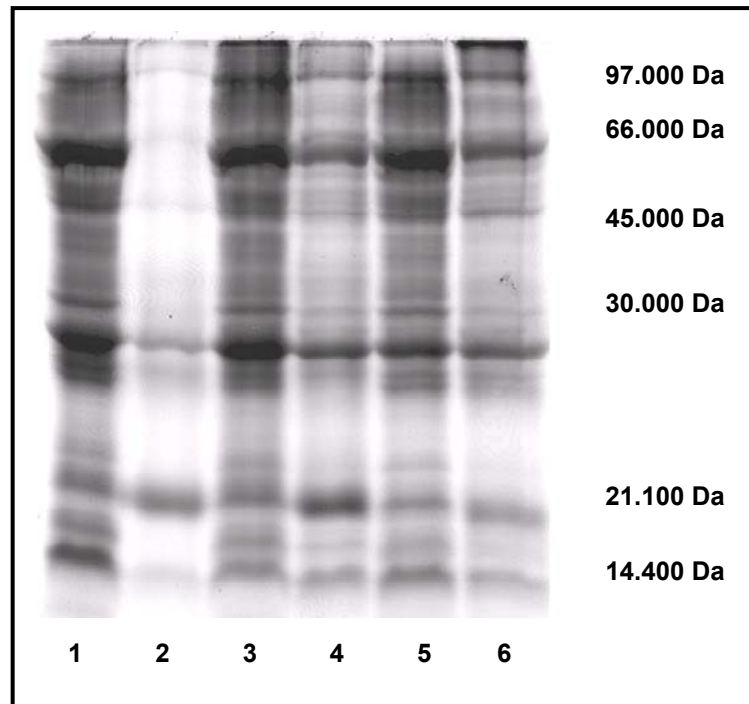


Abbildung 3-18: SDS-Page der Proteine von *C. taxifolia*

1 = intakt

2 = 5 min nach Verwundung

3 = intakt + Lysin (64)

4 = verwundet + Lysin (64)

5 = intakt + Cystein (73)

6 = verwundet + Cystein (73)

Hierzu wurde vor der Zerstörung der Algenstruktur eine wässrige Lysin (64)- oder Cystein (73)-Lösung (100 mg/ml) zugegeben. Nach 5-minütiger Reaktionszeit, dem Versetzen der Proben mit SDS und dem Anfärben des Gels mit Coomassie Blau ist bei der intakten Alge (1) ein gut separiertes Proteinspektrum zu erkennen (Abb. 3-18, 1). Die Probe der verwundeten Alge (2) ist im Gegensatz dazu deutlich an SDS-trennbaren Proteinen verarmt. Bei den Experimenten, bei denen die intakte Alge mit den freien Aminosäuren versetzt wurde (3/5), gleicht das Muster dem der intakten Alge; somit scheinen die Aminosäuren keinen Einfluss auf diese Proben zu haben. Bei den verwundeten Algen ändert sich das Muster der Proteinbanden nach Zugabe der Aminosäurelösungen (4/6) jedoch gravierend, da nun im Gegensatz zu Reihe 2 definierte Proteinbanden von hoher Intensität zu beobachten sind. Zwar sind eindeutig Banden von geringerer Intensität als in der intakten Probe zu erkennen, insgesamt jedoch weisen die so behandelten Proben größere Analogie zur intakten Alge auf als zur verwundeten. Das Auftreten eines eindeutigen Bandenmusters geht mit einer herabgesetzten Einbindung von Proteinen in Polymere einher. Durch diese Resultate wird die Hypothese einer Proteinquervernetzung als zentralem Mechanismus der Wundverschlussreaktion erhärtet. Durch die Blockierung der reaktiven Gruppen des Quervernetzers mit im Überschuss vorliegenden freien

Aminen sind diese nicht mehr in der Lage, mit Proteinen zu reagieren, was zur Inhibierung der Wundverschlussreaktion führt.

Auffällig bei den SDS-Gelen der verwundeten Alge (2) ist die Bande bei ca. 20 kDa, die relativ klar und mit hoher Intensität zu erkennen ist, während alle anderen Proteinbanden deutlich abgereichert sind, was verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zulässt: Es könnte sich z. B. um ein Protein mit ausgesprochen wenig Lysinresten handeln, das deswegen nicht von Oxytoxin 2 (46) angegriffen werden kann. Es ist auch denkbar, dass das Protein sehr hydrophob ist und sich die Lysinreste im Inneren des Proteins befinden und somit für das freigesetzte Oxytoxin 2 (46) nicht erreichbar sind. Es kann sich um eine Esterase handeln, die im Verwundungsfall Caulerpenin (17) zu dessen proteinquervernetzenden Derivaten umwandelt. Die Alge wäre so in der Lage, die Enzymdeaktivierung durch Caulerpenin (17) zu umgehen. Bei der Umwandlung von Caulerpenin (17) zu Oxytoxin 2 (46) entstünde direkt im aktiven Zentrum des Enzyms ein hoch reaktives Produkt, welches potentiell in der Lage ist, dieses Zentrum irreversibel zu blockieren und somit die weitere Umwandlung zu stoppen. Ein solches Selbstmordsubstrat stellt z. B. Petrosaspongiolid M, ein Enzym-denaturierendes Sesquiterpen aus dem Schwamm *Luffariella* spp. dar, welches nach enzymatischer Deacetylierung das enzymatische Zentrum von Phospholipasen A₂ blockiert.^[117] Um eine solche Inhibierung der enzymatischen Umwandlung zu vermeiden und einen effektiven Wundverschluss generieren zu können, muss die Esterase der Alge entweder an das entstehende Produkt angepasst sein oder in großen Mengen vorliegen. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um eine Esterase handelt, wurde die entsprechende Bande aus dem SDS-Gel isoliert und von der Proteomics-Abteilung der École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) untersucht. Das enthaltene Protein wurde zuerst entfärbt, reduzierend alkyliert und anschließend im Gel durch Trypsin verdaut. Trypsin ist in der Lage, die Amidbindungen von Proteinen nach den Aminosäuren Lysin (64), Arginin und modifiziertem Cystein hydrolytisch zu spalten.^[106] Die so erhaltenen Bruchstücke wurden im Proteomics-Labor mittels HPLC/MS untersucht, um die Proteinsequenz mit Datenbankeinträgen vergleichen zu können und Ähnlichkeiten mit Esterasen oder anderen bekannten Proteinen zu ermitteln. Es wurde jedoch keine Übereinstimmung gefunden, was auf die relativ geringe Menge an verfügbaren proteomischen Daten von Caulerpales zurückzuführen ist, so dass die Funktion dieses Proteins ungeklärt bleibt.

Um sicherzustellen, dass der bei den gelelektrophoretischen Untersuchungen beobachtete Effekt des Ausbleibens der Proteinquervernetzung auf die Konkurrenzreaktion mit dem freien Lysin (64) zurückzuführen ist und nicht auf eine mögliche Inhibierung der beteiligten Enzyme, wurde die Umsatzgeschwindigkeit von Caulerpenin (17) in *C. taxifolia* unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Dazu wurde

C. taxifolia in Gegenwart von Lysin (**64**) oder Cystein (**73**) verwundet (jeweils 100 mg/ml Wasser). In definierten Zeitabständen wurde die Probe mit 1,2 ml Dichlormethan (mit 0,1 mg 4'-Methoxyacetophenon pro ml Lösung als internem Standard) pro g Alge extrahiert. In der organischen Phase wurde per GC/MS der Caulerpeningehalt relativ zum internen Standard bestimmt. Für jeden Messpunkt wurden fünf voneinander unabhängige Proben vermessen. Zur Bestimmung des Caulerpeningehalts in der intakten Alge als Vergleichswert wurden deren Enzyme durch 2-minütiges Kochen denaturiert. Die relative Quantifizierung erfolgte durch die Flächenintegrale des Bereichs von $m/z = 134,5-135,5$ für 4'-Methoxyacetophenon, $[M-CH_3]^+$ bzw. $212,5-214,5$ Da für Caulerpenin (**17**), $[M-2 CH_3COOH -C_2H_3O]^+$. Die stärkere Fragmentierung des Caulerpenins (**17**) im Vergleich zur HPLC/MS ist durch die Elektronenstoßionisation mit 70 eV zu erklären. Der Gehalt von **17** wurde relativ zum internen Standard berechnet. Der Verlauf des Caulerpeninabbaus ist in Abb. 3-19 dargestellt.

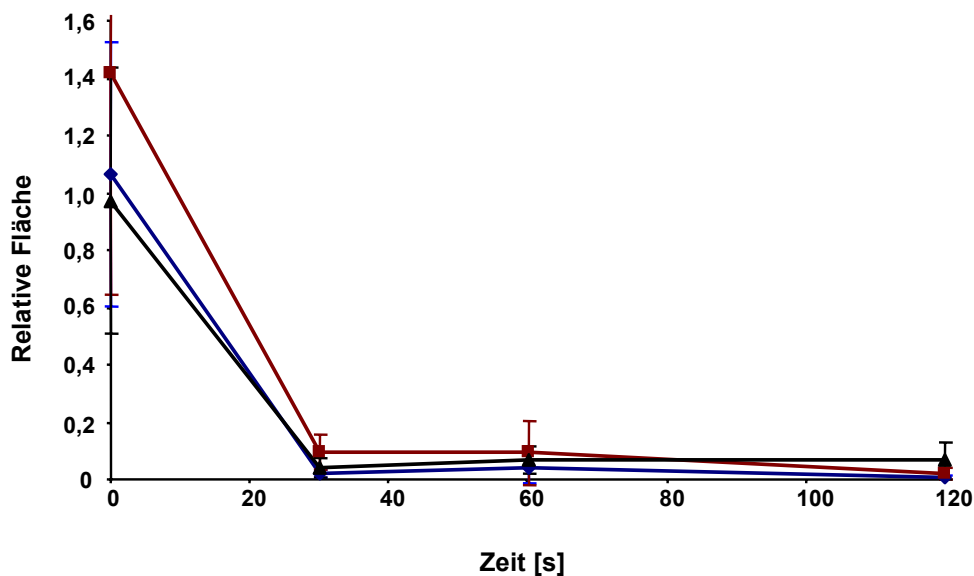


Abbildung 3-19: Umwandlung von Caulerpenin (**17**) in Wasser (blau), Lysinlösung (100mg Lysin (**64**) pro ml H₂O, (rot)) und Cysteinlösung (100 mg Cystein (**73**) pro ml H₂O, (schwarz))

Aus Abb. 3-19 kann abgeleitet werden, dass die Esterase auch nach Zugabe der freien Aminosäure in der Lage ist, Caulerpenin (**17**) umzuwandeln.

Somit kann abgesichert werden, dass die Veränderung des Bandenmusters in Abb. 3-18 durch die Konkurrenzreaktionen um die aktiven Zentren des Quervernetzers verursacht wird und nicht auf die Inaktivierung der Esterase(n) zurückzuführen ist.

3.1.4 Modellreaktionen zur Untersuchung des Wundverschlusses

Nachdem gelelektrophoretisch und phänomenologisch durch Mikroskopie ein Einfluss von freien Aminosäuren auf den Verlauf der Wundverschlussreaktion bei *C. taxifolia* nachgewiesen werden konnte, wurde nun versucht, die dieser Inhibierung zugrunde liegenden molekularen Prozesse zu ermitteln. Dazu wurde die Alge in Gegenwart eines Überschusses von Lysin (**64**) (10 mg pro g Algengewicht) durch Mörsern mechanisch verwundet, die Algenbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und die verbleibende wässrige Phase ohne Zusatz weiterer Lösungsmittel unmittelbar mit RP-HPLC/UV/MS analysiert.

Zur Ionisierung der Analyten wurde, im Gegensatz der zur Quantifizierung von Caulerpenin (**17**) benutzten APCI, die Elektrospray-Ionisierung (ESI) eingesetzt. Diese bietet den Vorteil, dass die Probe sanft ionisiert wird und aus diesem Grund so gut wie keine Fragmentierung auftritt. Dadurch nimmt die Signalstärke der Pseudomolekülonen $[M+H]^+$ deutlich zu^[118] und es ist möglich, gezielt nach Folgeprodukten zu suchen. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abb. 3-20 zu sehen.

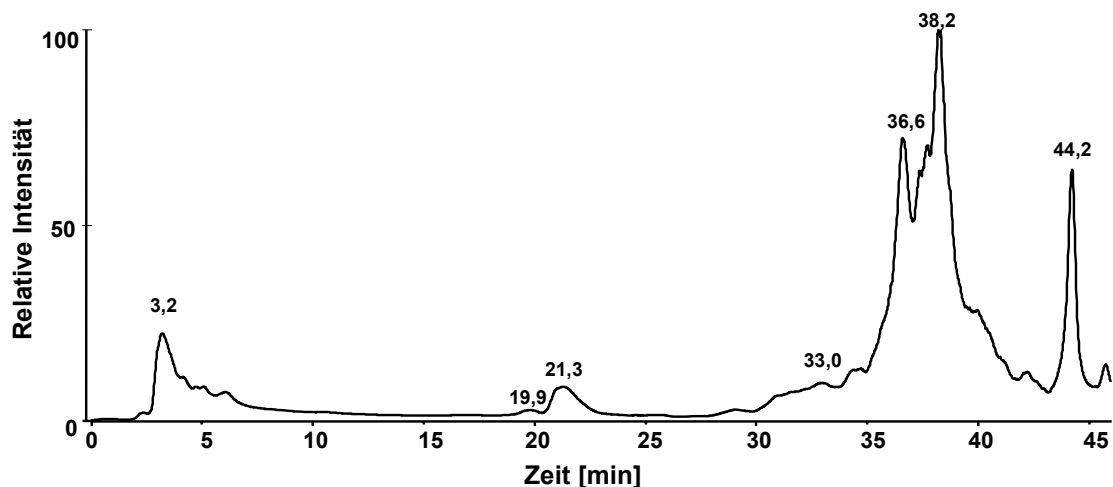


Abbildung 3-20: TIC-MS-Chromatogramm von in Gegenwart von Lysin (**64**) verwundeter *C. taxifolia*

Anhand seines charakteristischen $[M+H]^+$ -Ions ist das Signal von nicht abreagiertem Lysin (**64**), welches wegen der unzureichenden Retention auf der relativ unpolaren C_{18} -Säule bei einer Retentionszeit von 3,2 Minuten eluiert, eindeutig zu identifizieren. Durch den Nachweis von **64** ist sichergestellt, dass während der Verwundung der Alge die freie Aminosäure im Überschuss vorhanden war. Im weiteren Verlauf der Trennung ist eine Vielzahl unpolarer Verbindungen bei hohen Retentionszeiten zu sehen, welche bei der verwendeten Umkehrphasenchromatographie nur unzureichend separiert werden. Die

Verwendung von RP-HPLC ist aber unumgänglich, da eine rein wässrige Phase als Probe zur HPLC-Trennung aufgegeben wird, um sämtliche, bei der Verwundungsreaktion der Alge freigesetzten, Verbindungen analysieren zu können und nicht nur den mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Anteil. Deshalb wurde die enthaltene Massen- und UV-Information genutzt, um caulerpeninabgeleitete Metabolite in der Gruppe der unpolaren, spät eluierenden Verbindungen nachzuweisen. Als Ausgangsbasis wurden dazu unter Verwendung bestehender Literatur verschiedene Strukturvorschläge möglicher Produkte der Reaktion von Oxytoxin 2 (**46**) mit Lysin (**64**) erarbeitet.

Von Jung und Pohnert wurde durch saure Deacetylierung von Caulerpenin (**17**) in Ethanol die entstehenden reaktiven Aldehyde mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin abgefangen und analytisch charakterisiert.^[102] Das als Endprodukt der enzymatischen Reaktionskaskade entstehende Oxytoxin 2 (**46**) wurde hierbei als das korrespondierende di-Hydrason (**53**) identifiziert (Abb. 3-21). Von Guerriero *et al.* wurde Caulerpenin (**17**) in Methanol mit Butylamin umgesetzt. Durch die basisch katalysierte Deacetylierung wird der bis-Aldehyd **46** freigesetzt, der z. B. durch die Addition einesamins an die Michael-Akzeptorposition und die Ausbildung eines Pyrrolsystems zu dem Oxytoxin 2-Derivat (**54**) reagiert.^[119] Es ist auch ein zu Abb. 3-22 analoger Mechanismus denkbar.

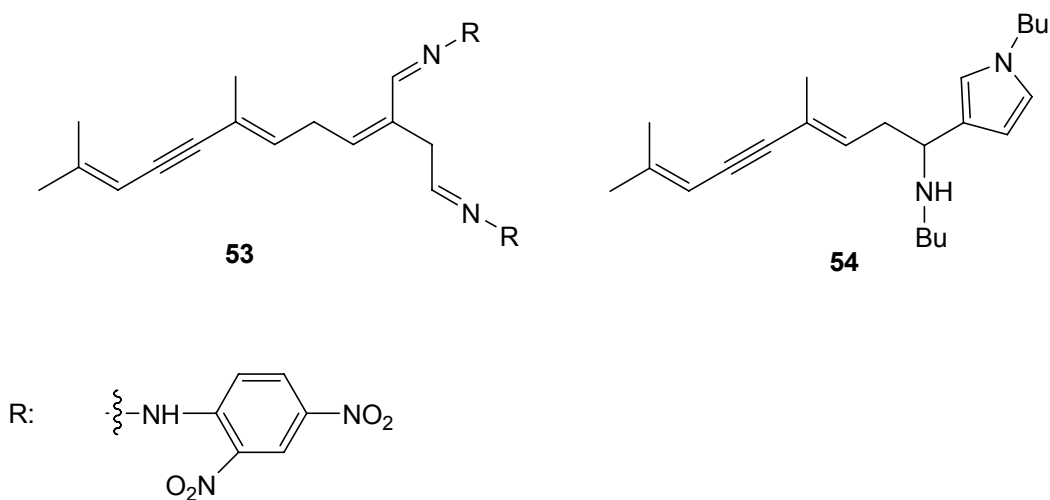


Abbildung 3-21: Endprodukte der Reaktion von Caulerpenin (**17**) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin oder Butylamin nach Guerriero *et al.*^[119] und Jung *et al.*^[102]

Der von Jung postulierte Mechanismus (Abb. 3-22) basiert auf der Annahme, dass es im ersten Schritt nach der Deacetylierung zur Kondensation des Hydrazins an die C13-Aldehydfunktion von Oxytoxin 2 (**46**) und damit zur Ausbildung von **55** kommt. Danach kann der Prozess auf zwei möglichen Reaktionsrouten weiterlaufen: entweder kann es durch eine weitere Kondensationsreaktion zur Ausbildung des di-Imins **56** oder zu einem elektrophilen Angriff des Stickstoffs am C1-Aldehyd kommen. Dadurch wird ein intermediäres di-Hydro-Pyrrolsystem (**57**) generiert, aus welchem nach Wasserabspaltung dann das Endprodukt (**58**) hervorgeht. Beide postulierten Reaktionswege eröffnen die

Möglichkeit eines Quervernetzungsprozesses, da entweder durch eine doppelte Kondensationsreaktion oder durch eine kombinierte Kondensations-/Additionsreaktion Oxytoxin 2 (**46**) mit freien Aminogruppen von Proteinen reagieren und somit ein komplexes Co-Polymer ausbilden kann.^[60]

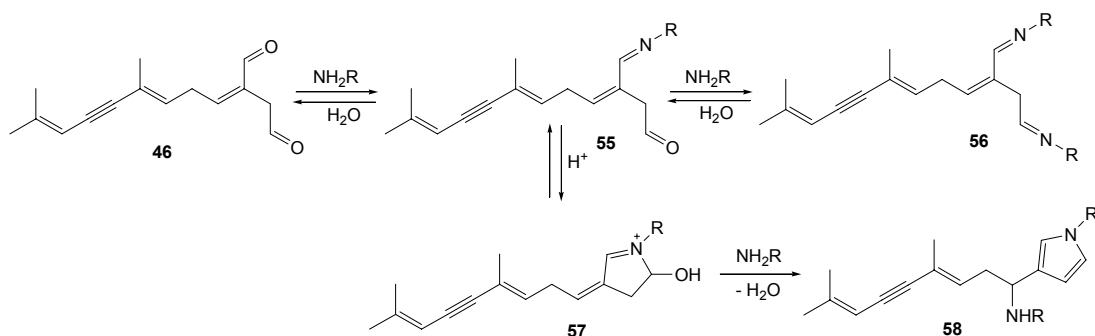


Abbildung 3-22: Postulierter Mechanismus der Reaktion von Oxytoxin 2 (**46**) mit Aminen nach Jung^[60]

So wurden durch die Eingrenzung des Massenspektrums auf das Pseudomolekülion mit $m/z = 487$ (single ion monitoring, SIM) versucht, die beiden möglichen Endprodukte **56** und **58** nach der Reaktion mit Lysin (**64**) ($R = C_6H_{12}NO_2$) nachzuweisen (vgl. Abb. 3-22). Da beide Moleküle dieselbe Summenformel haben und somit isobar sind, ist im Falle der Elektrospray-Ionisierung nicht festzustellen, welche Verbindung vorliegt. Es sind zwei Signalgruppen zu erkennen, in welchen das Pseudomolekülion dieser Verbindung zu detektieren ist (Abb. 3-23).

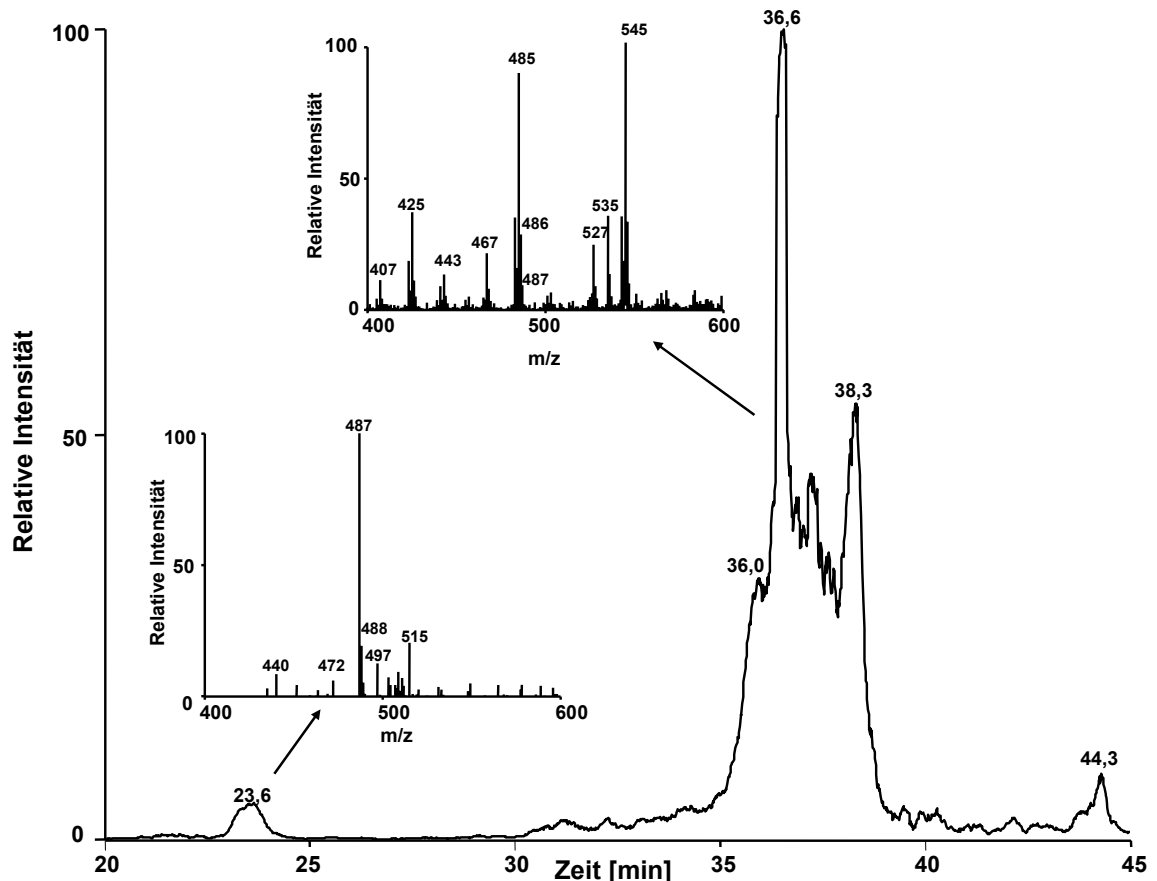


Abbildung 3-23: SIM-MS-Chromatogramm vom $m/z = 487,3$ mit den Massenspektren der Signale bei 23 und 36 min.

In dem Peak mit einer Retentionszeit von 36 Minuten ist die Masse von 487 Da deutlich präsent. Die Interpretation des Massenspektrums zeigt jedoch, dass es sich hierbei höchstwahrscheinlich nur um einen Isotopenpeak von $m/z = 485$ handelt und nicht um eine eigenständige Verbindung. Ein Vergleich mit der Ionenspur von $m/z = 485$ bestätigt diese Annahme, da die beiden Signale die gleichen zeitlichen Intensitätsmaxima aufweisen. Das Signal bei 23 Minuten hingegen zeigt ein Spektrum, bei dem $m/z = 487$ das Hauptsignal darstellt; daher ist es möglich, dass es sich hierbei um ein Quervernetzungsprodukt von Oxytoxin 2 und Lysin (**56** oder **58**, $R = C_6H_{12}NO_2$) handelt. Allerdings ist das Signal sehr schwach, es ist nur in der Ionenspur und nicht im Total Ion Count (TIC) oder UV-Spektrum des HPLC-Laufes nachzuweisen. Da Caulerpenin (**17**) aber einen sehr hohen Anteil im Algengewebe aufweist und Lysin (**64**) im Überschuss eingesetzt wurde, ist es auffällig, dass nur eine geringe Menge eines Oxytoxin 2/Lysin-abgeleiteten Produkts (**56** oder **58**, $R = C_6H_{12}NO_2$) entsteht. Auch die Zugabe von höheren Konzentrationen von Lysin (**64**) konnte das Signal nicht verstärken. Deshalb wurde zur Überprüfung der Plausibilität dieses Reaktionsweges nach weiteren möglichen Produkten gesucht. Signale, die durch aus dem Reaktionsverlauf hervorgehenden

Zwischenstufen **55** und **57** ($R = C_6H_{12}NO_2$) hervorgehen, sind auch bei der Betrachtung der Ionenspur nur im Rauschen zu erkennen. Es konnte kein Signal nachgewiesen werden, in dem eine der beiden Verbindungen anhand ihres Pseudomoleküliions eindeutig detektiert werden konnte. Von Guerriero *et al.* wurde allerdings noch ein anderes Kondensationsprodukt (**59**) bei der Umsetzung von Butylamin mit Caulerpenin (**17**) nachgewiesen (Abb. 3-24). Hierbei handelt es sich um ein Pyrrolo-system mit durchgängiger Konjugation durch das gesamte Molekül, das ein gegenüber Caulerpenin (**17**) stark bathochrom verschobenes UV-Signal haben sollte,^[19] was die Identifizierung im HPLC-Lauf vereinfacht.

Aufgrund des Diamincharakters von Lysin (**64**) sollten sowohl die beiden sich chromatographisch unterschiedlich verhaltenen Regioisomere des mono-Kondensationsprodukts von Oxytoxin 2/Lysin (**60** und **61**) als auch das di-Kondensationsprodukt **62** nachweisbar sein (Abb.3-24).

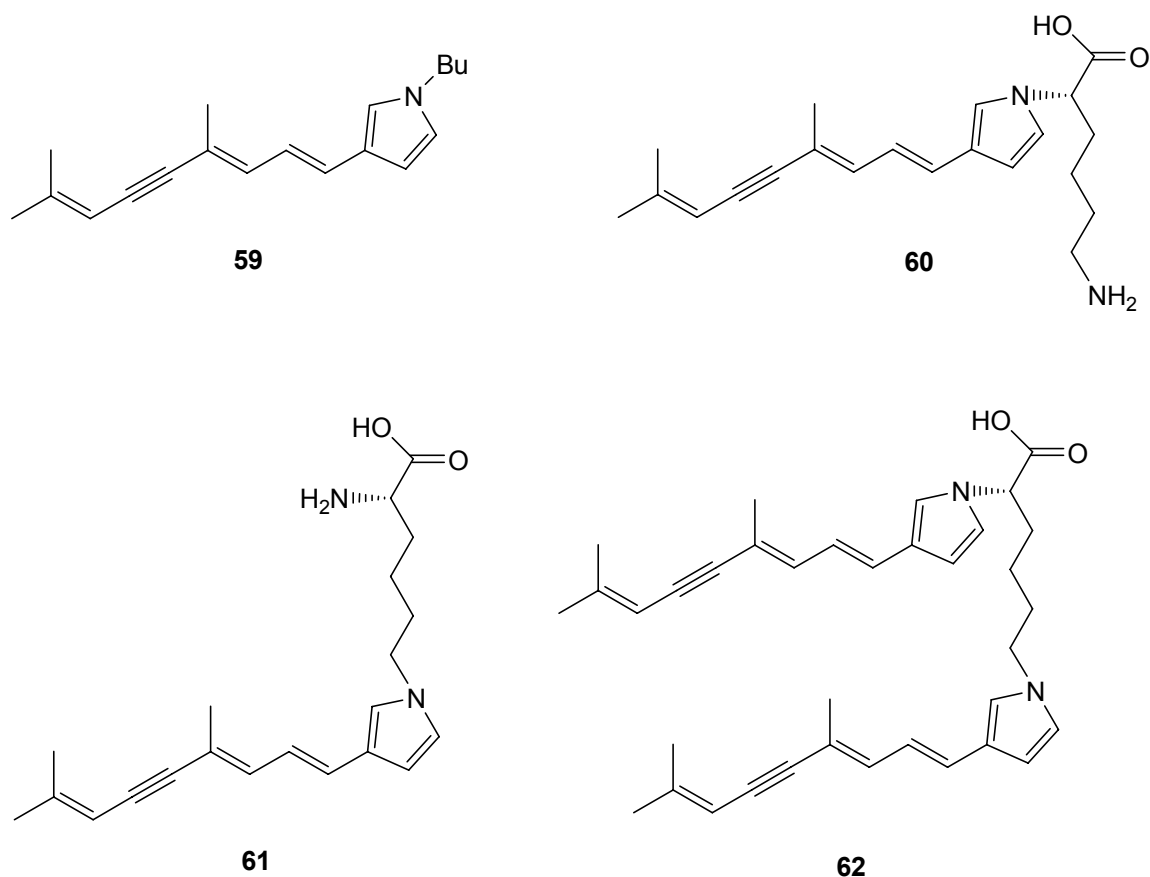


Abbildung 3-24. Kondensationsprodukte von Oxytoxin 2 (**46**) mit Aminen

Im Chromatogramm der in Gegenwart von Lysin (**64**) verwundeten Alge kann eindeutig das Signal des di-Kondensationsprodukts von Oxytoxin 2/Lysin (**62**) detektiert werden (Abb. 3-25 oben). Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigt die zu erwartende bathochrome Verschiebung mit einem Maximum von 344 nm; auch das

Pseudomolekülon mit einem m/z -Verhältnis von 535 wurde detektiert. Ebenfalls sind die regioisomeren mono-Kondensationsverbindungen (**60** und **61**) aufgrund ihres ähnlichen UV-Spektrums und $m/z = 431$ des Pseudomoleküliions im Chromatogramm nachweisbar (Abb. 3-25 unten). Das Verhältnis der einfach kondensierten Regioisomere (**60** und **61**) und des di-Kondensationsprodukts (**62**) ist von der Menge des eingesetzten Lysins (**64**) abhängig; bei höherem Gehalt an Lysin (**64**) entsteht bevorzugt das di-Kondensationsprodukt (**62**).

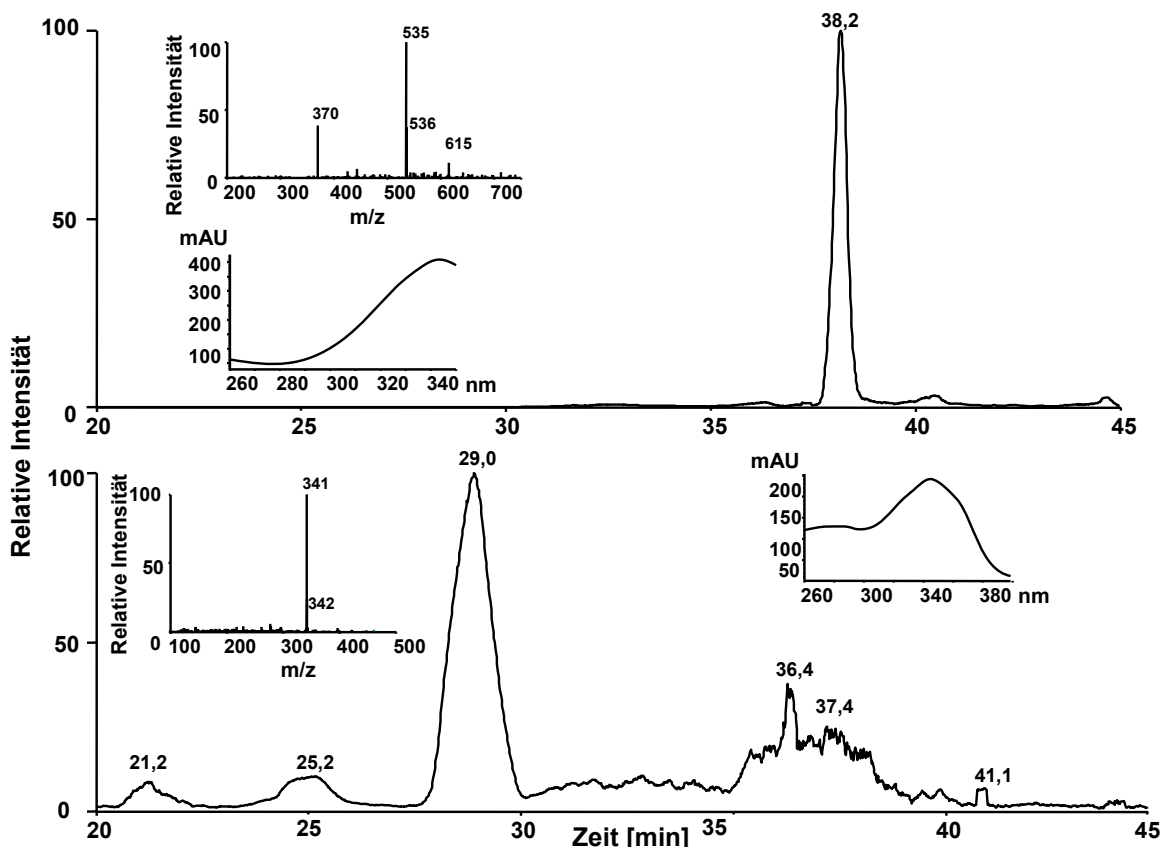


Abbildung 3-25: SIM-MS-Chromatogramme vom $m/z = 341$ (oben) und $m/z = 535$ Da (unten) mit den Massen- und UV-Spektrum der Signale bei 29 und 38 min.

Alle aus diesem Reaktionsprozess hervorgehenden Produkte weisen große strukturelle Analogien auf; weshalb davon ausgegangen werden kann, dass ihre Ionisierbarkeit in der ESI-Quelle des Massenspektrometers ähnlich ist. Legt man diese Annahme zugrunde, zeigt sich, dass Verbindungen, die denen von Guerriero *et al.*^[119] und Jung^[60] nachgewiesenen Quervernetzungsprodukten **56** und **58** ($R = C_6H_{12}NO_2$) entsprechen, nur in sehr geringer Menge detektierbar sind. Ihre Konzentration ist ungefähr zwei Größenordnungen geringer als die der Kondensationsprodukte **60-62**. In diesem direkten Vergleich sind somit deutliche Unterschiede zwischen den synthetischen Deacetylierungen und dem natürlichen System erkennbar. Während bei der chemischen Umsetzung von Aminen und Hydrazonen in organischen Lösungsmitteln die

semisynthetischen Produkte **56** und **58** einen entscheidenden Anteil an der Zusammensetzung des Produktgemisches haben, spielen sie im natürlichen System, in dem enzymatische Aktivität und Algenmatrix großen Einfluss haben, nur eine untergeordnete Rolle.

Unter analytischen Gesichtspunkten ist die Nutzung des natürlichen Systems für die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Quervernetzungsreaktion jedoch mit etlichen Problemen behaftet. Ein Hindernis ist die Matrix der Probe, da neben Chlorophyll, Fettsäuren, Steroiden und anderen Primär- und Sekundärmetaboliten der Anteil der gesuchten Verbindungen in der Gesamtprobe eher gering ist.^[120-123] Dadurch ist die Trennung unter RP-HPLC-Bedingungen erschwert und fast alle Signale werden durch andere Stoffe überlagert. Aus diesen Gründen konnten die gesuchten Verbindungen in den bisher durchgeführten Experimenten nur durch Verwendung ihrer Ionenspur in Verbindung mit den UV-Daten identifiziert werden. Eine weitere Charakterisierung bzw. die Führung eines Strukturbeweises ist unter diesen Bedingungen relativ kompliziert und zeitintensiv, da sehr kleine Analytenmengen aus einer sehr komplexen Matrix abgetrennt werden müssen. Die Probenmatrix selbst ist zudem auch in der Lage, mit den freigesetzten reaktiven Caulerpeninderivaten (**18**, **41-46**) zu reagieren, was zur Ausbildung heterogener, analytisch schwer zugänglicher Polymere führt (siehe Kapitel 3.1.3. Verwundung in Gegenwart von freien Aminosäuren).

Von Jung wurde gezeigt, dass Caulerpenin (**17**) unter physiologischen Bedingungen in wässrigen Puffersystemen durch kommerziell erhältliche Esterasen mit geringer Substratspezifität deacetyliert werden kann.^[60] Esterasen gehören zur Enzymgruppe der Hydrolasen, die in der Lage sind, Bindungsspaltungen unter Einbeziehung von Wasser zu katalysieren. Lipasen und Esterasen spalten dabei Esterbindungen. Lipasen bevorzugen hierzu Triglyceride und andere wasserunlösliche Fettsäureester, Esterasen hingegen wasserlösliche Substanzen.^[124] Als besonders effektiv bei der Deacetylierung von Caulerpenin (**17**) erwiesen sich dabei aus der Hefe *Candida lipolytica* (CLE) und aus Schweineleber (PLE) isolierte Esterasen.^[60] Da diese nicht auf die Umsetzung von Caulerpenin (**17**) spezialisiert sind, müssen ihnen allerdings zur Umsetzung von Caulerpenin (**17**) längere Reaktionszeiten als den algeneigenen Enzymen eingeräumt werden. Jung stellte weiter fest, dass Caulerpenin (**17**) für diese Esterasen ein Selbstmordsubstrat darstellt. Nach der enzymatischen Umwandlung der Speicherform Caulerpenin (**17**) in dessen reaktives Folgeprodukt Oxytoxin 2 (**46**) reagiert dieses mit der Esterase. Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Mayer *et al.*, in denen gezeigt wurde, dass Caulerpenin (**17**) bereits in einer Konzentration von 4,2 μM in der Lage ist, Phospholipase A₂ zu inhibieren.^[125] Dies resultiert, je nach Konzentration des

eingesetzten Caulerpenins (**17**), in einem Aktivitätsverlust bis hin zur Inhibierung der Enzyme.^[60, 126]

Der molekulare Hintergrund der Reaktion von Selbstmordsubstraten mit Enzymzentren wurde unter anderem von Dal Piaz *et al.* und Randazzo *et al.* anhand der Wechselwirkungen von aus dem Schwamm *Petrosaspongia nigra* isoliertem Petrosaspongiolid M und Phospholipase A₂ gezeigt (vgl. Kapitel 3.1.3. Wundung in Gegenwart von freien Aminosäuren).^[117, 127] Hierbei führt die enzymatische Umwandlung des Substrats, eines Hydroxylactons, zu einem reaktiven Aldehyd, der mit dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert und damit zu dessen irreversibler Blockierung führt.^[117] Von Jung konnte jedoch in gelelektrophoretischen Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der Umsetzung von Caulerpenin (**17**) mit CLE oder PLE nicht nur das aktive Zentrum des Enzyms betroffen ist; die eingesetzten Esterasen werden durch die freigesetzten Aldehyde zu Polymeren vernetzt, die im Puffersystem unlösliche Niederschläge bilden.^[60] Somit kann davon ausgegangen werden, dass es nicht immer zu einer Inhibierung des aktiven Zentrums durch das entstehende Produkt kommt, sondern dass dieses auch in der Lage ist, die Enzymtasche wieder zu verlassen, sonst wäre keine Quervernetzung zwischen Oxytoxin 2 (**46**) und Proteinen, die letztendlich zur Ausbildung eines unlöslichen Polymers führt, möglich. Folglich sollte es möglich sein, aus dem isolierten Enzym und Caulerpenin (**17**) ein Modellsystem zur Untersuchung der Quervernetzungsreaktion zu entwickeln. Eine Modellreaktion ermöglicht die Untersuchung der Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* anhand analoger Reaktionen im zellfreien System. Damit werden alle in der Alge auftretenden Matrixeffekte umgangen und die Aufreinigung und Charakterisierung der entstehenden Reaktionsprodukte wird durch wegfallende Nebenreaktionen mit der Algenmatrix ebenfalls vereinfacht. Des Weiteren kann in einem Modellsystem vergleichend untersucht werden, ob neben Caulerpenin (**17**), Esteraseaktivität und der Anwesenheit freier Aminfunktionen noch weitere Co-Faktoren bei der Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* eine Rolle spielen.

Das Problem der Enzymdeaktivierung kann durch den Einsatz erhöhter Konzentrationen des Enzyms ausgeglichen werden. Ein größeres Problem stellt jedoch die anschließende Abtrennung der eingesetzten Esterase dar, da diese mit dem Caulerpenin (**17**) und den eingesetzten Edukten mit Aminfunktionalität in dem gepufferten wässrigen Medium gelöst vorliegt. Durch die geringe Substratspezifität im Bezug auf Caulerpenin (**17**) muss im Vergleich zu den Edukten **17** und den entsprechenden Aminosäuren ein hoher Überschuss des Enzyms eingesetzt werden; so konnte Jung nachweisen, dass es ab dem Verhältnis von 10 Massenprozent Caulerpenin (**17**) im Vergleich zur Esterase zu einer signifikanten Absenkung der Esteraseaktivität kommt.^[60] Ein weiteres Problem stellt das

breite Spektrum von nieder- und hochmolekularen Kondensationsprodukten aus Esterase, Oxytoxin 2 (**46**) und Aminen dar.

Um die Abtrennung der unerwünschten Nebenprodukte zu ermöglichen, wurde auf polymergebundene PLE zurückgegriffen. Diese kommerziell erhältliche Esterase ist an einem Co-Polymer aus Methacrylamid, Allylglycidylether und N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Eupergit C) kovalent fixiert. Zur Immobilisierung der Esterase wird das Polymer mit Oxiran aktiviert, an welches sich die Esterase dann über freie Aminfunktionalitäten bindet. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit eines nukleophilen Angriffs des Oxytoxins 2 (**46**) an freie Lysingruppen herabgesetzt, da die reaktivsten Amine der Esterase bereits mit dem Polymer abreagieren^[128]. Mit der polymergebundenen PLE steht nun ein System zur Verfügung, mit dem die Deacetylierung von Caulerpenin (**17**) in Gegenwart von Aminosäuren im zellfreien, matrixarmen System durchgeführt werden kann. Die durch die Reaktion mit der Esterase entstehenden Nebenprodukte sind immobilisiert und können einfach durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt werden. Somit bleibt nur noch das gewünschte Produkt zusammen mit eventuell nicht abreagiertem Caulerpenin (**17**) oder dessen teildeacetylierten Produkten in der Pufferlösung zurück, was die Analytik und chromatographische Trennung erheblich vereinfacht.

Zur Überprüfung der Durchführbarkeit dieser Modellreaktion wurde die immobilisierte Esterase mit Caulerpenin (**17**) und dem fluoreszenzmarkierten Histon (vgl. Kapitel 3.1.2.3 Gelelektrophoretische Studien und 3.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopie) in Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,5 umgesetzt. Von Jung wurde gezeigt, dass Caulerpenin (**17**) in diesem pH-Bereich hydrolysestabil ist und im Bereich des pH-Optimums der PLE von pH = 8,0 liegt.^[60, 129] Als Puffersystem

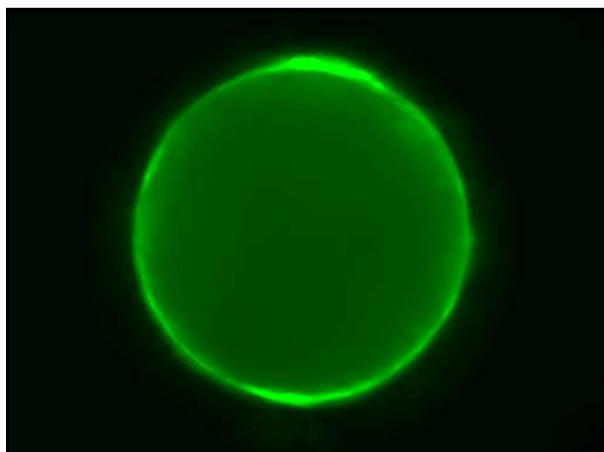


Abbildung 3-26:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme
des markierten Proteins auf der
Oberfläche der immobilisierten Esterase
(PLE)

wurde 10 mM TRIS/TFA (Trifluoressigsäure) gewählt, da flüchtige TRIS-Puffer für die Massenspektrometrie geeignet sind und somit auch die Direktinjektion ohne vorherige HPLC-Auftrennung ermöglichen.^[130] Bei den anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass das markierte Protein an der Oberfläche der Polymerkugel akkumuliert vorliegt (Abb. 3-26).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass auch die immobilisierte Esterase in der Lage ist, Caulerpenin (**17**) in den gewünschten Proteinquervernetzter umzuwandeln, welcher dann mit freien Proteinen reagiert.

Aufgrund dieser Reaktionsfähigkeit konnte sie für die Umsetzung von Caulerpenin (**17**) in Gegenwart von Lysin (**64**) eingesetzt werden. In diesem Modellansatz wurde 1 μmol Lysin (**64**) in 500 μl Pufferlösung mit 0,3 μmol Caulerpenin (**17**) und 11,2 mg immobilisierter Esterase umgesetzt; der wässrige Überstand wurde direkt mit RP-HPLC/UV/MS untersucht (Abb.3-27).

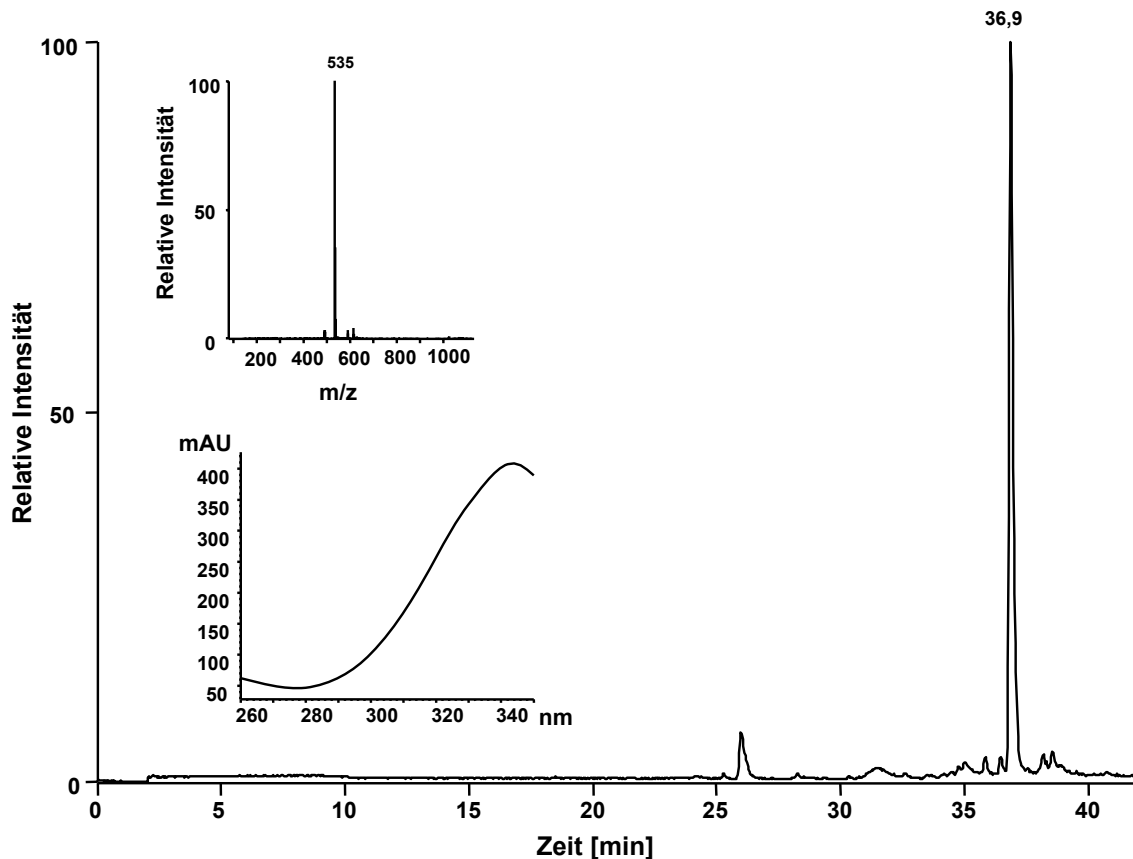


Abbildung 3-27: TIC-MS-Chromatogramm des Überstandes der Modellreaktion von Caulerpenin (**17**) mit Lysin (**64**) in Gegenwart der immobilisierten Esterase (PLE). Gezeigt ist das Massen- und UV-Spektrum der Hauptverbindung **62**

Bei der Modellreaktion ist das Hauptprodukt mit einer Retentionszeit von 37 Minuten eindeutig zu erkennen. Die Massen- und UV-Spektren stimmen mit der bereits identifizierten Verbindung **62** überein, der Unterschied in der Retentionszeit ist vermutlich auf die Alterung der Säule zurückzuführen. Um Substanz für weitere analytische Untersuchungen nach Aufreinigung des Produkts durch präparative HPLC zu erhalten, wurde die enzymatische Umsetzung in erhöhter Konzentration mit 60 μmol Caulerpenin (**17**), 200 μl Lysin (**64**) und 2,2 g immobilisierter Esterase in 20 ml Pufferlösung angesetzt. Die wässrige Phase zeigte bei HPLC/MS-Untersuchungen dann allerdings einen sehr

geringen Gehalt an **62**. Aus diesem Grund wurde die Esterase mit Methanol ausgewaschen, diese Phase wies, vermutlich aufgrund der Hydrophobie der entstandenen Verbindung, einen deutlich höheren Gehalt an **62** auf. Möglicherweise war durch die erhöhte Konzentration der Reaktionslösung nur noch ein geringer Anteil des entstehenden hydrophoben Produktes in dem Puffer löslich. Nach der Aufreinigung konnte durch hochauflösende Massenspektrometrie die exakte molekulare Masse der Verbindung als $[M-H]^-$ bestimmt und die Elementarzusammensetzung $C_{36}H_{42}N_2O_2$ ermittelt werden, wodurch der Strukturvorschlag von **62** untermauert wird. Bei der Auswertung der NMR-Spektren zeigt sich, dass erwartungsgemäß mehrere Stereoisomere entstanden sind, was sich in komplexer Überlagerung der Signale in den 1H -NMR-Spektren widerspiegelt (Abb.3-28). Dadurch war es nicht möglich, isolierte Signale einzelner CH-Gruppen in den Doppelbindungsbereich des Moleküls zu integrieren oder sie anhand ihrer Kopplungskonstanten eindeutig bestimmten Positionen im Molekül zuzuordnen. Die in Konjugation zu den Mehrfachbindungen des CaulerpeninGrundgerüsts stehenden Pyrrolsysteme sind durch ihre unterschiedlichen chemischen Umgebungen und Aufspaltungen ebenfalls überlagert und somit nicht eindeutig zuzuordnen.

Trotz der Komplexität der Spektren konnten für die Verbindung signifikante Signale zugeordnet werden. Die Wasserstoffatome an C2'' bis C4'' konnten aufgrund Ihrer chemischen Verschiebung ebenso identifiziert werden wie die Methylgruppen der ankondensierten Caulerpeninreste (C12/C13/C14, C12'/C13'/C14'). Durch den Einsatz verschiedener NMR-Pulssequenzen (HMBC und HSQC) konnten auch ^{13}C -Spektren erhalten werden, in welchen aber die Signale des Doppelbindungsbereiches ebenfalls nicht eindeutig zuzuordnen sind. Die charakteristischen Verschiebungen der Methylgruppen des Caulerpenin- und die Signale des Lysingerüsts sind aber auch hier eindeutig identifizierbar, wodurch die erhaltenen Spektren den Strukturvorschlag **62** untermauern.

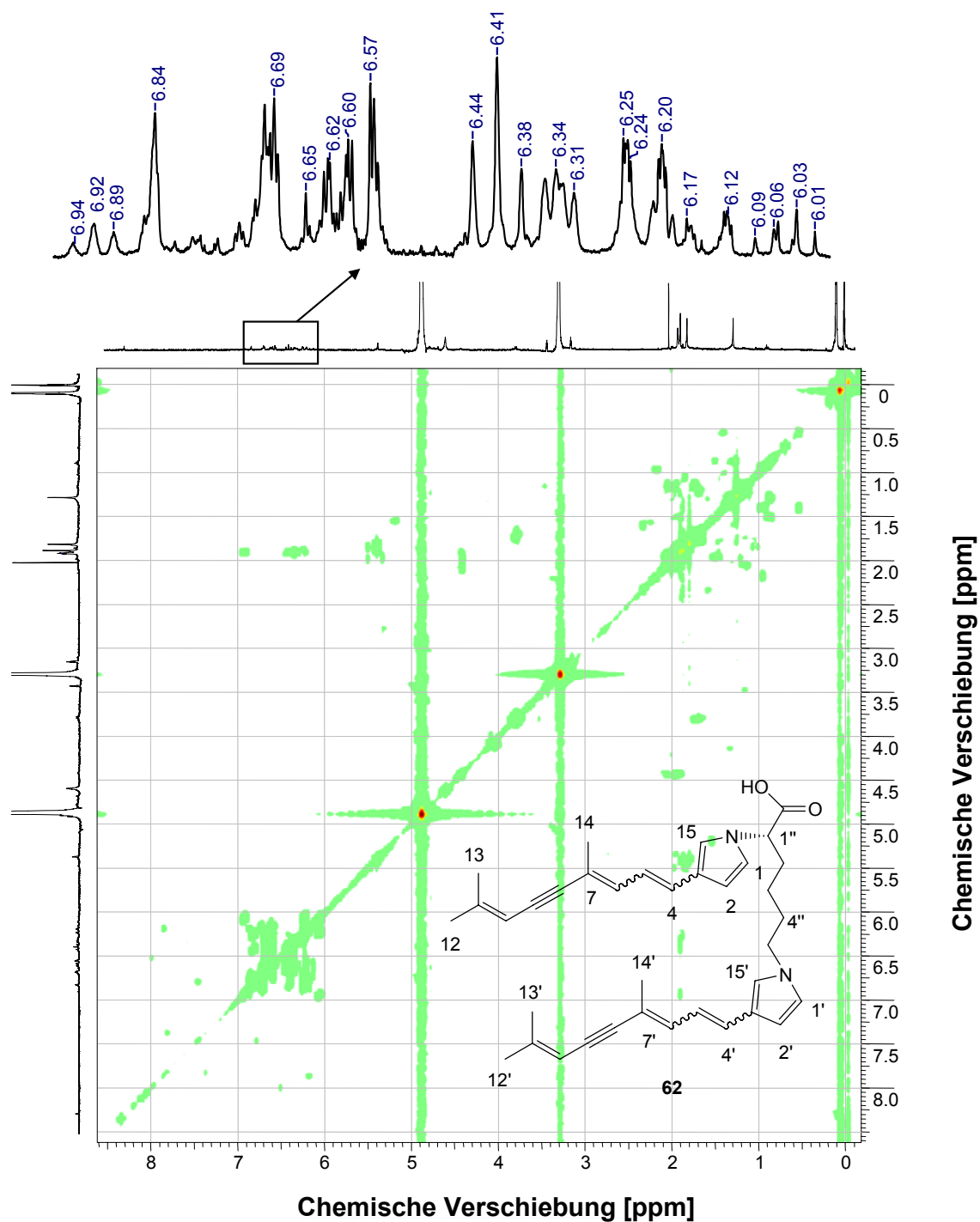


Abbildung 3-28: $H-H$ -COSY des Kondensationsprodukts **62**

In weiteren Experimenten wurde nun versucht, dieses Modell auf die Proteinebene zu übertragen. Dazu wurden 50 nM Myoglobin in Gegenwart der immobilisierten Esterase in einer Versuchsreihe mit 125–1000 nM Caulerpenin (**17**) umgesetzt, die Esterase abfiltriert und die Lösung direkt mittels MALDI-ToF untersucht, ein typisches Massenspektrum ist in Abb. 3-29 dargestellt.

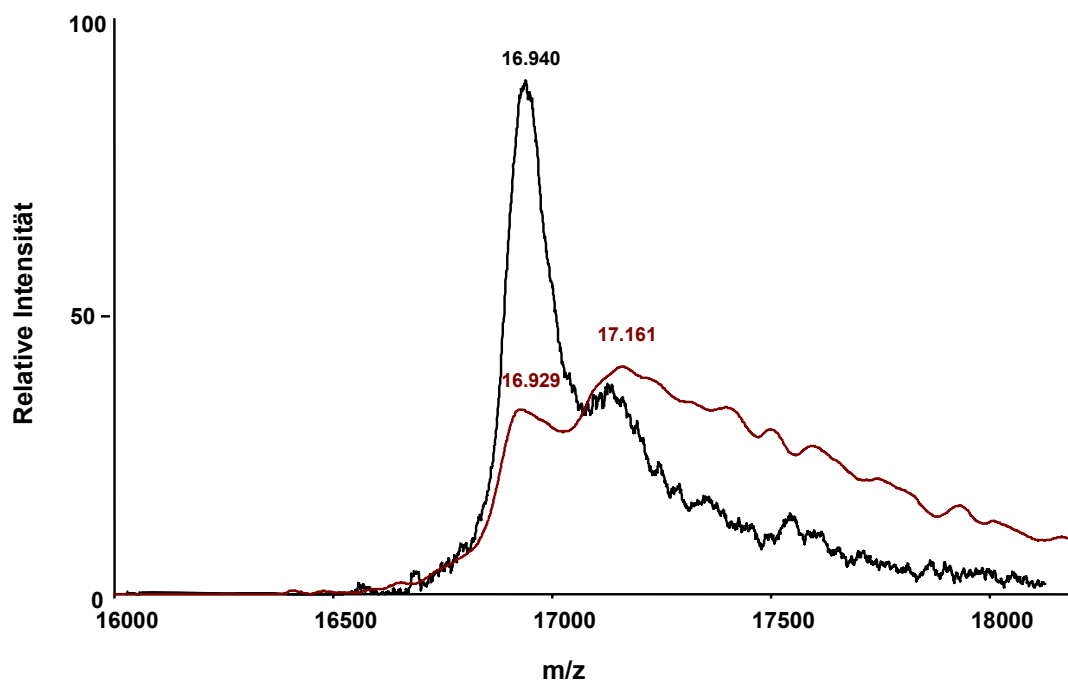


Abbildung 3-29: MALDI-ToF-Spektrum von Myoglobin (schwarz) und der Umsetzung von 250 nmol Caulerpenin (**17**) mit Myoglobin (rot)

Dabei ist zu erkennen, dass freies Myoglobin ($m/z = 16.940$) nach der Umsetzung mit deacetyliertem Caulerpenin (**17**) stark abgereichert ist. In der Reaktionslösung sind eine Reihe relativ unspezifischer Addukte zu erkennen; allerdings lässt sich aufgrund der multiplen Funktionalitäten des Myoglobins nicht feststellen, an welcher Stelle und in welcher Art ein Angriff von Oxytoxin 2 (**46**) stattgefunden hat. Im höheren, nicht mehr dargestellten Massenbereich sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Massenspektren zu beobachten.

Um die Bildung von Artefakten zu unterbinden und eine Aussage über die Reaktion treffen zu können, ist also die Auftrennung der Reaktionsmischung mittels HPLC notwendig. Die Laufeigenschaften der entstehenden Verbindungen werden größtenteils durch den bei allen Produkten identischen Proteinteil bestimmt, was zu unzureichender Trennung und somit wiederum zu Peaküberlagerung führt. Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem Vorhandensein etlicher Lysingruppen in Proteinen, was in der Ausbildung eines komplexen Produktspektrums resultiert. Eine andere Limitierung stellt das zur Verfügung stehende HPLC-gekoppelte Massenspektrometer mit einem maximal messbaren m/z -Verhältnis von 2000 dar. Die Molmassen schwerer Verbindungen können zwar indirekt durch das Signalmuster der mehrfach geladenen Ionen identifiziert werden, dies setzt wiederum aber eine gute Trennung der entstehenden Produkte voraus. Um diese Probleme zu umgehen, wurde mit einem maßgeschneiderten, synthetischen Oligopeptid ($\text{NH}_2\text{-Ala-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Gly-COOH} \times \text{TFA}$) gearbeitet. Bedingt durch die

geringe Größe des Moleküls werden durch Addition eines unpolaren Oxytoxin 2-Rests die Trennungseigenschaften auf der RP-HPLC-Säule so stark verändert, dass eine Basislinientrennung möglich ist. Des Weiteren ist es durch die relativ geringe Masse des Edukts und der Produkte möglich, diese direkt massenspektrometrisch zu erfassen. In einer Modellreaktion wurde deshalb das Modellpeptid in Gegenwart der immobilisierten Esterase mit Caulerpenin (**17**) umgesetzt. Das synthetische Oligopeptid verfügt durch eine freie Aminfunktion am terminalen Alanin nur über eine nukleophil angreifbare funktionelle Gruppe. Es konnte das Kondensationsprodukt **63** identifiziert werden (Abb.3-30).

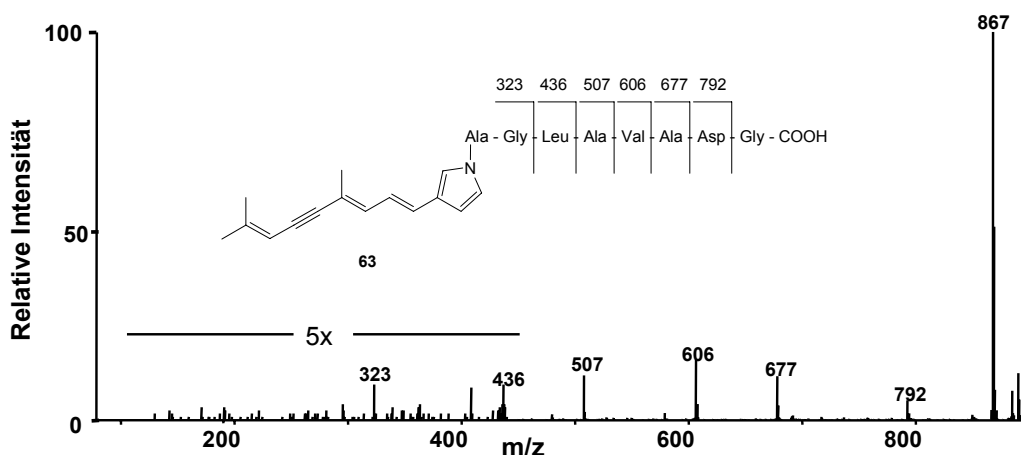


Abbildung 3-30: ESI-MS-Spektrum des Produkts aus der Umsetzung von Caulerpenin (**17**) mit dem synthetischen Peptid $\text{NH}_2\text{-Ala-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Gly-COOH}$ in Gegenwart von immobilisierter PLE

Im Massenspektrum kann das Produkt durch sein Fragmentierungsmuster eindeutig identifiziert werden. Durch hochauflösende Massenspektrometrie nach Auftrennung der Reaktionsmischung mittels HPLC konnte die exakte Masse des Natrium-Addukts ermittelt und die Summenformel von $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_{11}$ bestätigt werden.

Die Struktur des Kondensationsprodukts von Oxytoxin 2 (**46**) mit Aminen bietet allerdings keine hinreichende Erklärung für den in *C. taxifolia* stattfindenden Quervernetzungsprozess. Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist, sowohl unter Zugabe von freien Aminosäuren zu der Alge als auch bei den Modellreaktionen, lediglich das Kondensationsprodukt eines Oxytoxin 2-Moleküls mit der ϵ -Aminfunktion eines Lysinrests unter Ausbildung eines Pyrrolringes (vgl. Abb. 3-24). Durch die Bildung des stabilen Fünfrings wird die durchgehende Konjugation des Moleküls erreicht, wodurch es gegenüber den anderen möglichen Produkten energetisch bevorzugt ist.^[104] So wiesen Guerriero *et al.* ebenfalls nur zyklische Produkte wie z. B. **59** nach, lediglich bei der Derivatisierung der Folgeprodukte der Deacetylierung von Caulerpenin (**17**) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin konnte von Jung das aliphatische Produkt **56** ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{O}_4$)

nachgewiesen werden.^[60, 119] Nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen kann dies aber eher auf die besondere Reaktivität der Hydrazone als auf einen im natürlichen System anzutreffenden Mechanismus zurückgeführt werden. So besitzt Oxytoxin 2 (**46**) trotz zweier Aldehydfunktionalitäten nur die Möglichkeit, in diesem Molekülbereich mit einer Aminfunktion zu reagieren. Und die Verwundung von *C. taxifolia* in Gegenwart von Lysin (**64**) zeigte nur einen sehr geringen Anteil an Reaktionsprodukten, bei denen an der α,β -Doppelbindung des konjugierten Aldehydsystems eine Michael-Addition stattgefunden hat (**65**) (Abb. 3-31). Somit kann auf diesem Weg nicht erklärt werden, weshalb es zu einer Quervernetzung von Proteinen in Folge der Wundreaktion kommt. Im Gegensatz dazu belegen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die Ergebnisse der SDS-PAGE Untersuchungen jedoch eindeutig ein protein crosslinking; die Quervernetzungsreaktion in verwundeter *C. taxifolia* muss also über einen anderen Mechanismus ablaufen.

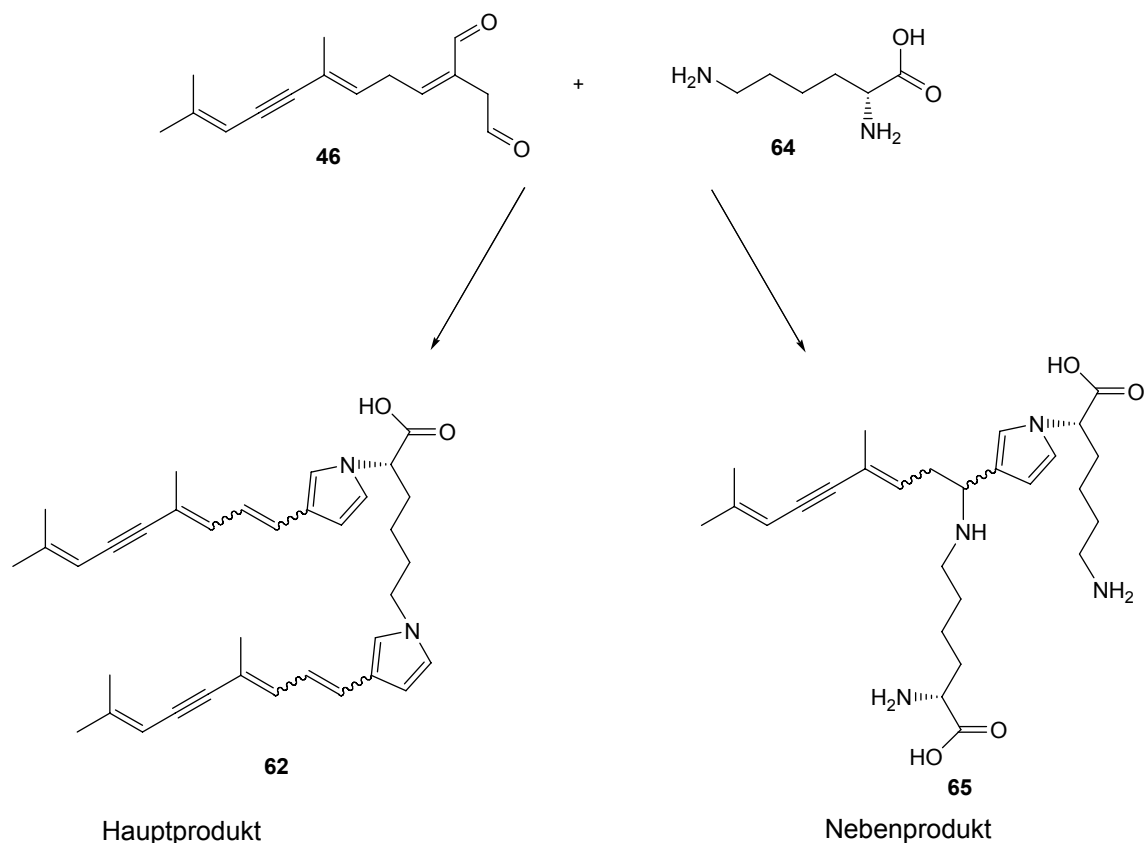


Abbildung 3-31: Strukturvorschläge für die aus der Reaktion von Oxytoxin 2 (**46**) mit Lysin (**64**) entstehende Produkte **62** und **65**

Das Michael-Akzeptorsystem stellt durch die Delokalisierung der π -Elektronenpaare laut dem HSAB-Prinzip nach Pearson wegen der leichten Polarisierbarkeit ein weiches Elektrophil dar, wodurch die Reaktion mit einem relativ harten Nukleophil wie einem Amin nicht bevorzugt stattfindet.^[104] Die ebenfalls proteinogene Aminosäure Cystein (**81**) hingegen verfügt über eine freie Thiolfunktion und Schwefel stellt ein wesentlich

weicherer Nukleophil dar. Somit wird eine bessere Überlappung zwischen den Orbitalen des Schwefels und dem β -Kohlenstoff des Michael-Akzeptors erreicht, wodurch die nukleophile 1,4-Addition von Cystein (**73**) wesentlich leichter verlaufen sollte als die des Lysins (**64**). Dass freie Thiole einen Einfluss auf die Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* haben, wurde bereits von Dreher *et al.* gezeigt. Sie zeigten, dass die Alge nach Zugabe von Mercaptoethanol (**70**), das als Reduktionsmittel zur Unterdrückung oxidativer Prozesse verwendet wurde, nicht in der Lage ist, den Wundverschluss auszubilden.^[97] Bei der Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* ist es aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente und den oben angeführten Argumenten wahrscheinlich, dass es zu einem nukleophilen Angriff der Thiofunktion an das Michael-Akzeptorsystem des Caulerpenins (**17**) kommt und die Ausbildung des Wundpfropfes auf diese Art verhindert wird. Um zu überprüfen, ob diese Reaktion die Quervernetzung von Proteinen im Wundverschluss erklärt, wurde die für Lysin (**64**) entwickelte Modellreaktion mit Cystein (**73**) als freier Aminosäure durchgeführt. Dazu wurden 500 μmol Cystein (**73**) mit 75 μmol Caulerpenin (**17**) und 2,8 g immobilisierter Esterase in 25 ml Pufferlösung umgesetzt. Der HPLC/MS-Lauf der erhaltenen Probe ist in Abb. 3-32 zu sehen.

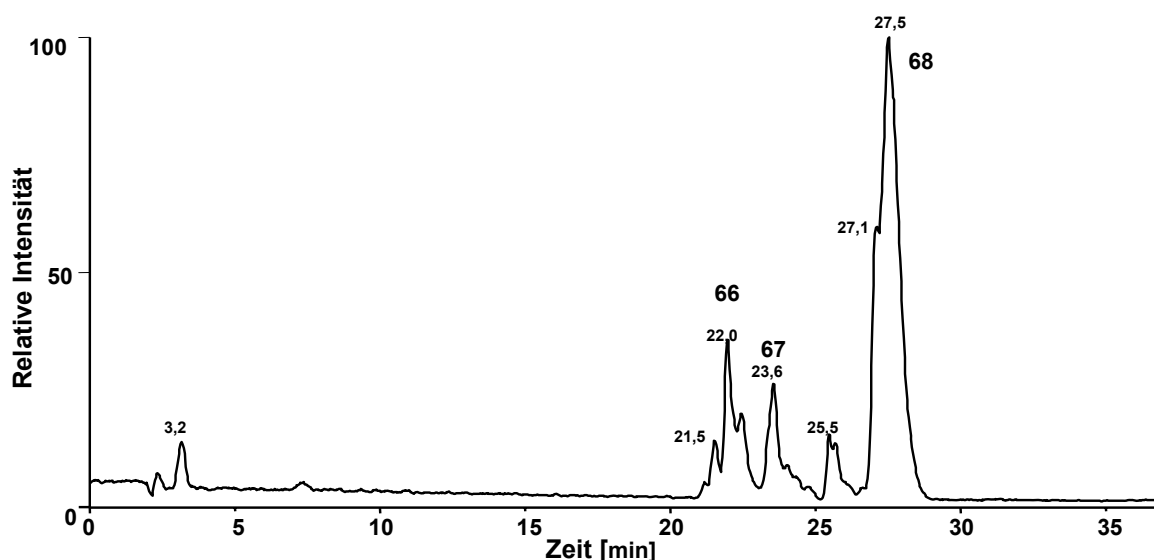


Abbildung 3-32: RP-HPLC/APCI-MS-Chromatogramm der Produkte aus der Modellreaktion von Cystein (**73**) und in situ hergestelltem Oxytoxin 2 (**46**)

Das bei dieser Reaktion erhaltene Produktspektrum ist deutlich breiter als bei der Umsetzung mit Lysin (**64**), bei der fast ausschließlich **62** erhalten wurde. Durch die hier angewandte chemische Ionisierung (APCI) sind neben den Pseudomolekülonen zusätzlich Fragmente der Analyten nachweisbar, woraus sich die in Abb. 3-33 dargestellten Strukturvorschläge ableiten lassen.

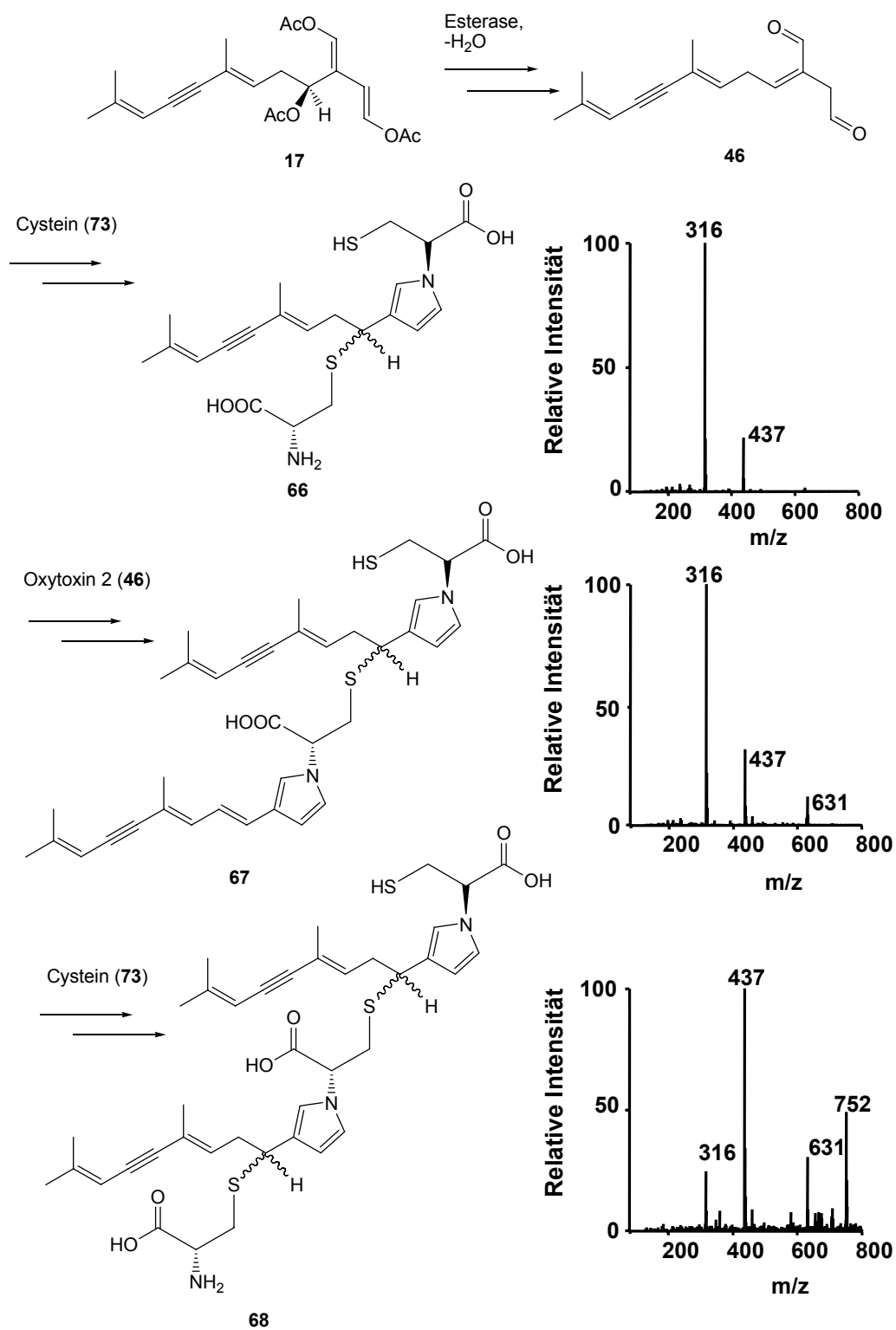


Abbildung 3-33: Quervernetzungsprodukte der Modellreaktion von Cystein (73) mit Oxytoxin (46)

Die aus der Reaktion von *in situ* dargestelltem Oxytoxin 2 (**46**) mit Cystein (**73**) hervorgehenden Verbindungen enthalten ebenso wie die Lysin-abgeleiteten mono- und di-Kondensationsprodukte **60-62** ein Pyrrolsystem. Im Gegensatz zu ihnen fand bei **66-68** vor der Bildung des Pyrrols die Addition des S-Nukleophils an der C4-Position des Oxytoxins 2 (**46**) statt. Im Gegensatz zu den Kondensations- und Additionsprozessen von Lysin (**64**) mit Oxytoxin 2 (**46**) ist das Kondensations-/Additionsprodukt **66**, das formal die Quervernetzung erklären würde, nicht ein Neben-, sondern das Hauptprodukt der Reaktion. Dies erklärt die Ergebnisse aus den Versuchen mit SDS-PAGE- und Fluoreszenzmikroskopie, bei denen die Proteine fast vollständig vernetzt vorliegen. Das caulerpeninabgeleitete Oxytoxin 2 (**46**) erfüllt somit die Kriterien für einen Quervernetzer, da es unter physiologischen Bedingungen durch die Kombination von Kondensations- und Michaelreaktion in der Lage ist, mit proteinogenen Aminosäureresten kovalente Bindungen einzugehen. Der Reaktionsverlauf folgt dabei möglicherweise dem bereits beschriebenen, von Jung postulierten Mechanismus (vgl. Abb. 3-22).^[60] Dass die Modellreaktion dem natürlichen System nahekommt, lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass sie nicht auf der ersten Stufe stehenbleibt, sondern eine weitere Fortsetzung der Vernetzung zu beobachten ist (Abb. 3-33). So wurden massenspektrometrisch die Produkte **66-68** nachgewiesen, bei denen die Reaktionskaskade weiterläuft und andere Cysteinmoleküle (**73**) mit Oxytoxin 2 (**46**) vernetzt wurden. Um den aus dem Pseudomolekülion und Massenfragmenten erhaltenen Strukturvorschlag zu beweisen, wurde das Hauptprodukt **66** mittels präparativer HPLC isoliert und mit zweidimensionalen NMR-Methoden eingehend untersucht; das HMQC-Spektrum ist in Abb.3-34 zu sehen. Durch die Addition der freien Thiolgruppe des Cysteins (**73**) an die Michael-Akzeptorposition entstehen Diastereomere, was zur Überlagerungen einiger Signale im MNR-Spektrum führt. Trotz dieses Effektes konnte die vorgeschlagene Struktur durch HMQC- und HMBC-Experimente bestätigt werden. Darüber hinaus konnten die Spinsysteme (1-H) (2-H), (4-H) (5-H) (6-H), (2'-H) (3'-H) und (2''-H) (3''-H) durch H-H-COSY-Messungen nachvollzogen und damit der Strukturbeweis von **66** erbracht werden.

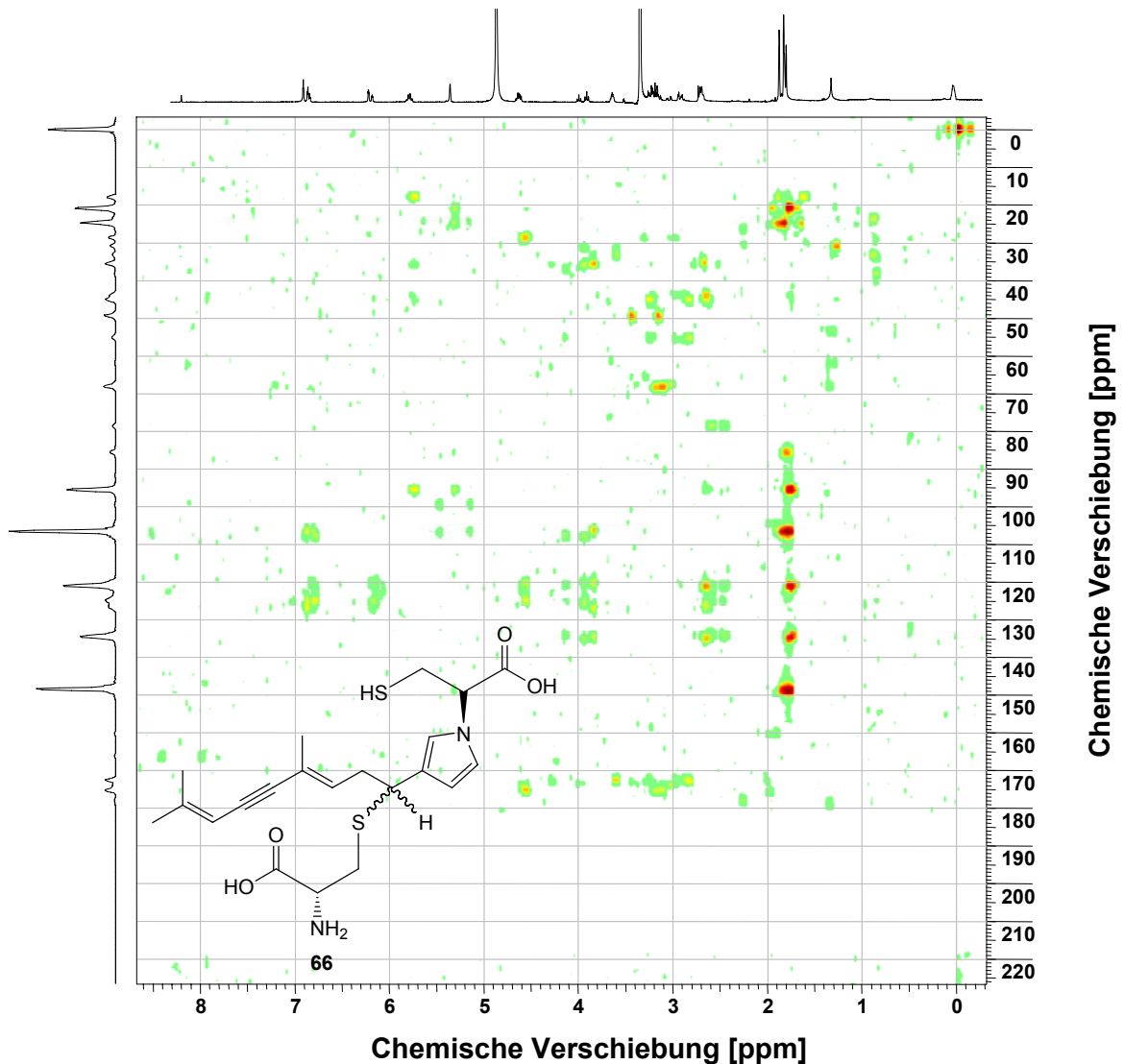


Abbildung 3-34: HMQC-Spektrum des Quervernetzungsprodukts **66**

Zur Überprüfung, ob die bei der Modellreaktion gebildeten Quervernetzungsprodukte auch unter physiologischen Bedingungen nachweisbar sind, wurde *C. taxifolia* in Analogie zu den schon beschriebenen Experimenten in Gegenwart von freiem Cystein (**73**) verwundet und die Algenprobe direkt mittels RP-HPLC/MS vermessen. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Verbindungen **66-68** auch unter nahezu natürlichen Bedingungen direkt von der Alge gebildet werden. Durch diese Modellreaktion und den Vergleich mit dem natürlichen System der Alge konnte nun eindeutig gezeigt werden, dass lediglich Caulerpenin (**17**), eine Esterase und ein primäres Amin sowie eine Thiolgruppe notwendig sind, um die Wundverschluss von *C. taxifolia* in Gang zu setzen. Diese Fähigkeit, durch mechanischen Stress verursachte Gewebeerletzungen innerhalb kürzester Zeit effektiv zu verschließen, ist nicht nur für das einzelne Individuum von immenser Bedeutung, sondern auch für die Verbreitung der gesamten Spezies. Die Alge

vermehrt sich in den Ökosystemen, in die sie eingeschleppt wurde, durch ungeschlechtliche Vermehrung (vgl. Kapitel 1.4.1 Ökologische Relevanz von *C. taxifolia*). Der asexuelle Verbreitungserfolg von *C. taxifolia* basiert also zum Großteil auf der Fähigkeit zur Ausbildung des Wundverschlusses. Das Verständnis der Wundverschlussreaktion könnte in Zukunft dazu beitragen, durch neue Strategien die Alge in den betroffenen Habitaten zu bekämpfen.

3.1.5 Einfluss der Verwundung auf die Aminosäure-zusammensetzung

Die starke Fraßresistenz von *C. taxifolia* gegenüber nicht spezialisierten Herbivoren wurde im Literaturkontext auf Caulerpenin (**17**) als aktive Verbindung zurückgeführt.^[37, 57, 131, 132] So zeigten Paul und Fenical in vergleichenden Studien mit verschiedenen Herbivoren, dass Kontrollfutter im Vergleich zu caulerpenindotiertem Futter bevorzugt gefressen wird.^[57] Lemée *et al.* wiesen in einem Bioassay mit Seeigeln nach, dass die Alge in Monaten, in denen ihr Caulerpeningehalt besonders hoch ist, überhaupt nicht befressen wird. In Monaten, in denen der Caulerpeningehalt niedriger ist, wird sie zwar befressen, stellt aber keine gute Nahrungsquelle für die Tiere dar, so dass es zu einem deutlichen Rückgang der allgemeinen Fitness der Seeigel kommt.^[131] Die toxikologischen Eigenschaften von Caulerpenin (**17**) gegenüber Spermien, Eiern und Larven einiger Seeigelarten sowie seine fungizide und antibakterielle Wirkung sind relativ gut bekannt.^[57, 133-135] Es bleibt bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten offen, ob die beobachteten Effekte durch Caulerpenin (**17**) selbst ausgelöst werden oder die entstehenden reaktiven Folgemetabolite **18** und **41-46** dafür verantwortlich sind. Diese können nicht nur bei der Verletzung der Alge entstehen, sondern, wie in Kapitel 3.1.4. (Modellreaktionen zur Untersuchung der Wundverschlussreaktion) gezeigt wurde, auch durch Aktivität von in den Testorganismen vorhandenen unspezifischen Esterasen *in situ* freigesetzt werden. Ein spezifischer Bioassay auf die Wirksamkeit der freien Aldehyde Oxytoxin 1 (**18**) und 2 (**46**) gestaltet sich aufgrund der Reaktivität jedoch schwierig. Von Gavagnin *et al.* wurde das Verteidigungssekret mariner Schnecken, das die beiden Aldehyde **18** und **46** enthält, im Fraßassay mit karnivoren Süß- und Salzwasserfischen gegen die Kontrolle Caulerpenin (**17**) getestet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die freien Aldehyde aktiver waren als **17**. Allerdings wurde während und nach dem Assay nicht der Gehalt an verbleibendem Oxytoxin 1 (**18**) und 2 (**46**) kontrolliert, so dass nicht klar ist, ob die Verbindungen trotz hoher Reaktivität und der daraus resultierenden kurzen Halbwertszeit über den Untersuchungszeitraum stabil waren.^[136]

Des Weiteren müssen die Auswirkungen der freigesetzten Substanzen auf die Algenproteine berücksichtigt werden. Die durch die Verwundung der Alge in Gang

gesetzte Quervernetzung von Proteinen könnte zu einer grundlegenden Veränderung des Nährwerts von *C. taxifolia* führen. In den bereits erwähnten Experimenten (vgl. Kapitel 3.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopie) von Konno *et al.* an Liguster wurde gezeigt, dass es durch Proteinquervernetzung zur Abreicherung essentieller Aminosäuren kommt, so dass der Liguster eine unzureichende Nahrungsquelle für Herbivoren dargestellt. Mit aus Liguster extrahiertem Oleuropein (**50**) und der ebenfalls isolierten Enzymfraktion wurden Modellversuche angestellt, um den Einfluss der Proteinquervernetzung auf den Anteil der nach Verwundung noch verfügbaren Aminosäuren zu untersuchen. Dem Oleuropein (**50**) wurden die Enzyme und als Modellpeptid Ovalbumin zugesetzt. Nach der Reaktion wurde das erhaltene Protein-Oleuropein-Copolymer mit Salzsäure hydrolytisch gespalten und die entstehenden Aminosäuren mit Hilfe eines Aminosäureanalysators quantifiziert. Dabei wurde neben der zu erwartenden starken Verarmung an Lysin (**64**) ebenfalls eine Abnahme von Cystein (**73**), Histidin und Tyrosin beobachtet. Diese Verarmung an für die Herbivoren verwertbaren Aminosäuren führt zur Verminderung der Nahrungsqualität der Pflanze und somit zur Verminderung des Fraßdrucks.^[115, 116]

Um den Einfluss der Gewebeverletzung auf den Aminosäuregehalt bei *C. taxifolia* zu untersuchen, wurden intakte und verwundete Algenproben vollständig hydrolysiert. Dazu wurden Algenfragmente mit 12 molarer Salzsäure (1 µl pro mg Algengewicht) behandelt und 22 Stunden im verschlossenen Vial auf 110°C erhitzt. Da für die Untersuchungen kein Aminosäureanalysator zur Verfügung stand, wurde in Anlehnung an bestehende Literatur eine entsprechende RP-HPLC-Methode entwickelt. Die Grundlage dieser Methode stellt die Derivatisierung der Aminosäuren nach dem von Lindroth und Mopper publizierten Protokoll dar.^[137] Dazu wird eine Derivatisierungslösung aus 50 mg *ortho*-Phthaldialdehyd (**75**) und 11,7 mg Polyoxyethylenlaurylether gelöst in 1,25 ml MeOH, 50 µl Mercaptoethanol (**69**) und 11,2 ml 0,4 molarer Boratpuffer (pH = 9,5) hergestellt. 5 µl dieser Lösung werden dann im gleichen Volumenverhältnis mit dem Hydrolysat versetzt und nach einer Minute Reaktionszeit mit 150 µl 0,1 molaren Natriumacetatpuffer (pH = 7,0) gequenscht. Von dieser Reaktionsmischung werden 20 µl direkt zur HPLC-Trennung aufgegeben. Die bei der Derivatisierung entstehenden fluoreszenten 1-Mercaptoethanol-2-alkyl-isoindole sind in guter Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit mittels Fluoreszenzdetektion nachweisbar (Abb. 3-36). Durch die Anregung bei 330 nm und die Detektion bei 450 nm wird die Matrix ausgeblendet und der störungsfreie Nachweis im Algengewebe ist möglich. In diesem Fall war es nicht notwendig auf ein Modellsystem auszuweichen, sondern der Prozess konnte direkt im Organismus verfolgt werden.

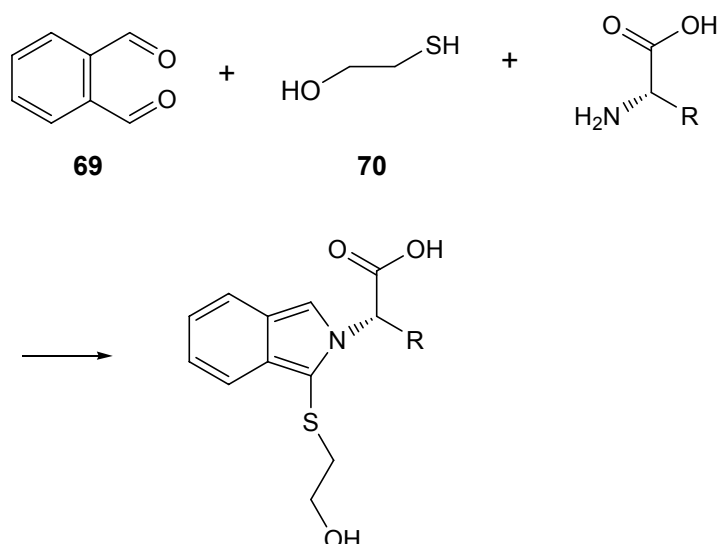


Abbildung 3-35: Derivatisierung von Aminosäuren mit ortho-Phthaldialdehyd (**69**) und Mercaptoethanol (**70**) nach Lindroth und Mopper^[137]

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass durch den Derivatisierungsmechanismus nur primäre Aminosäuren erfassbar sind, somit ist Prolin auf diesem Wege nicht detektierbar. Wegen der sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften der Aminosäurederivate ist eine aufwändige Trennmethode notwendig, um die Basislinientrennung der Peaks und somit die Auswertbarkeit der Chromatogramme zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Jones und Gilligan mit einem Laufmittelgemisch von 0,1 M Natriumacetat in H₂O/MeOH/THF (900/95/5) als wässrigem und Methanol als organischem Laufmittel gearbeitet.^[138] Durch den Einsatz mehrerer isokratischer Stufen im HPLC-Lauf (Abb. 3-34) war es möglich, auch ähnlich eluierende Aminosäurederivate zu trennen und einen Gehaltsvergleich durchzuführen. (Abb. 3-36 und 3-37).

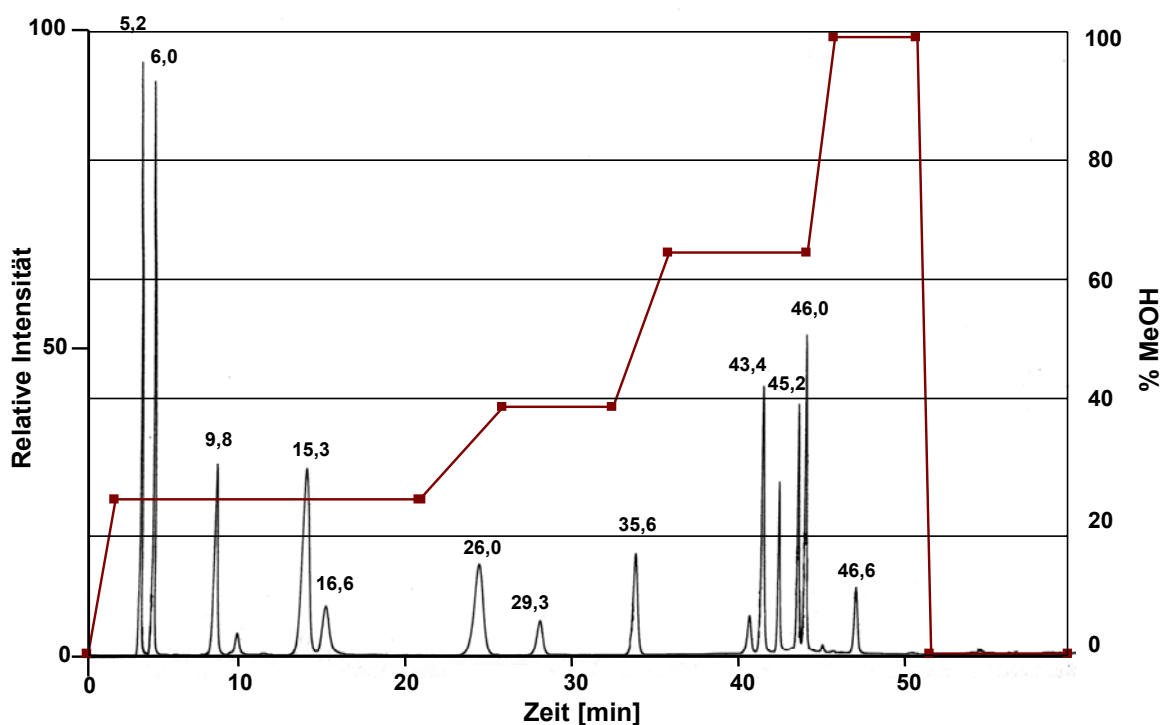


Abbildung 3-36: Eluentenzusammensetzung und Chromatogramm der mit ortho-Phthaldialdehyd (69) derivatisierten Aminosäuren in einer Algenprobe

Die Identität der Aminosäuren wurde durch Retentionszeitvergleich mit reinen derivatisierten Aminosäuren als Referenz überprüft; Aminoethanol diente bei den Algenproben als Retentionszeitmarker (35,6 min). Der absolute Aminosäuregehalt für intakte *C. taxifolia* ist aus der Literatur bekannt,^[123] deshalb wurde lediglich die Änderung des Aminosäuregehalts in der verwundeten Alge im Vergleich zur intakten Alge bestimmt. Die Verhältnisse sind relativ zu Alanin angegeben.

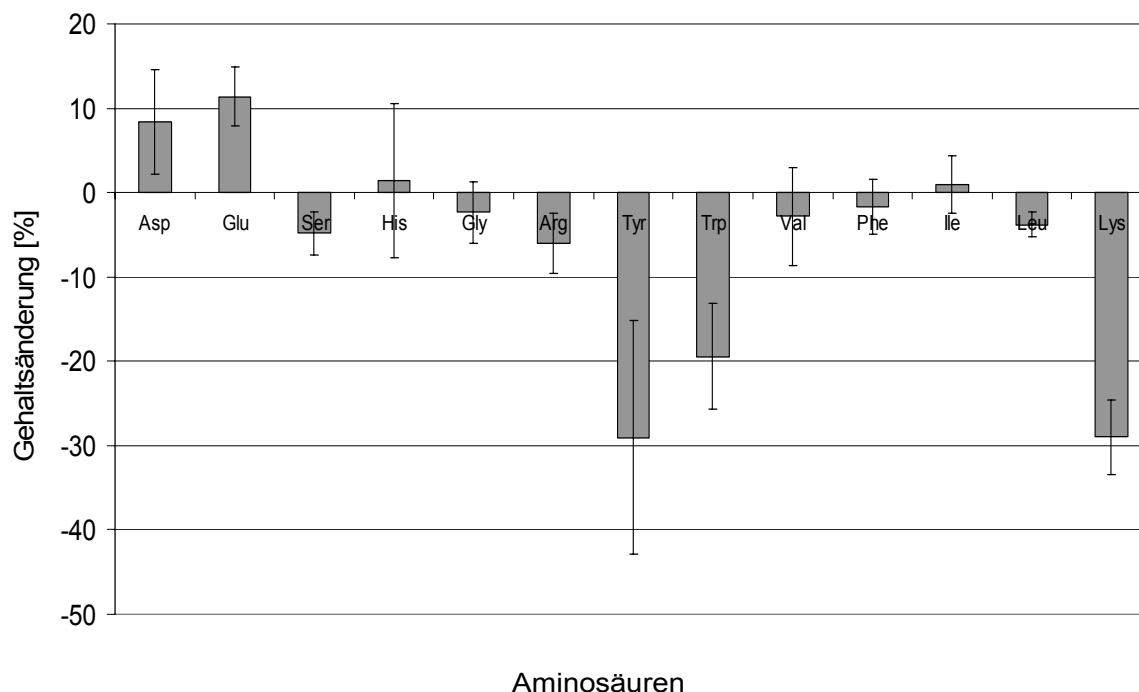


Abbildung 3-37: Relative Änderung der Aminosäurezusammensetzung von verwundeter zu intakter Alge [%].

Nach Verwundung kommt es zu einer sehr deutlichen Abreicherung von Lysin (**64**), Tyrosin und Tryptophan im Algengewebe. Der Verlust an Lysin (**64**) ist durch die Einbindung in den Wundverschluss über kovalente Proteinquervernetzung zu erklären; die Abnahme von Tyrosin und Tryptophan ist dadurch jedoch nicht erklärbar. In Analogie zur der bereits diskutierten Modellreaktion von Caulerpenin (**17**) in Gegenwart von PLE mit Lysin (**64**) wurde versucht, diese Aminosäuren ebenfalls mit *in situ* dargestelltem Oxytoxin 2 (**46**) reagieren zu lassen (vgl. Kap. 3.1.4 Modellreaktionen zur Untersuchung der Wundverschlussreaktion). Allerdings konnten über RP-HPLC/UV/MS-Kopplung keine Folgeprodukte identifiziert werden, durch die eine Absenkung des Tyrosin/Tryptophan-Gehalts erklärbar werden würden. Es ist anzumerken, dass Konno *et al.* in dem von ihnen verwendeten Modellsystem aus Oleuropein (**50**), aktiver Enzymfraktion und dem tryptophanfreien Protein Ovalbumin bei der durchgeführten Aminosäureanalyse ebenfalls die Abreicherung von Tyrosin nachgewiesen haben, ohne die molekularen Grundlagen dafür aufklären zu können.^[116]

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie sich der Anteil von Cystein (**73**) im Algengewebe durch die Ausbildung des Wundverschlusses ändert. Bei der Derivatisierung von Cystein (**73**) mit *ortho*-Phthaldialdehyd (**69**) entsteht die gewünschte fluoreszente 2-(1-(2-Hydroxyethylthio)-isoindol-2-yl)-3-mercaptopropionsäure (**71**) nur als Nebenprodukt. Das Hauptprodukt der Derivatisierungsreaktion ist die nicht fluoreszente 5-(2-Hydroxyethylthio)-2,3-dihydrothiazolo[2,3-a]isoindol-3-carbonsäure (**72**).^[139-142]

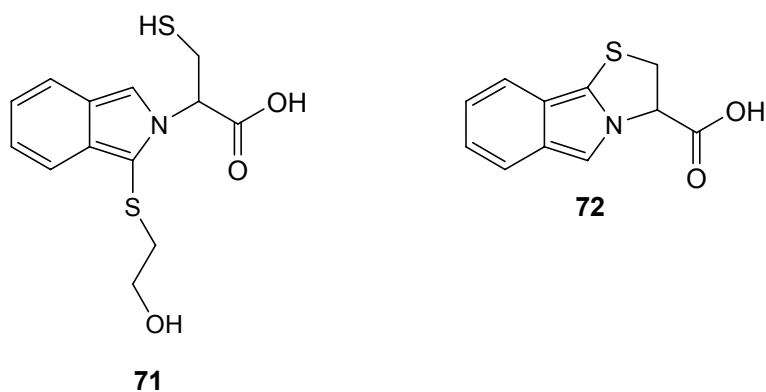


Abbildung 3-38: Reaktionsprodukte von ortho-Phthaldialdehyd (**69**) und Mercaptoethanol (**70**) mit Cystein (**73**) nach Mana^[143]

Aufgrund dieses Reaktionswegs wurde bei in der Literatur beschriebenen Quantifizierungsversuchen lediglich eine Cystein-Wiederfindungsrate von 5 % erreicht.^[143] Um die Veränderung des Cysteingehalts im Algengewebe trotzdem untersuchen zu können, wurde auf die von Hirs beschriebene Umwandlung von Cystein (**73**) zu Cysteinsäure (**76**) zurückgegriffen (Abb. 3-39).^[144]

Dabei wird die Alge einer Mischung aus Ameisensäure und Wasserstoffperoxid (**4**) ausgesetzt. Durch die *in situ* entstehende Perameisensäure (**75**) wird Cystein (**73**) zu Cysteinsäure (**76**) oxidiert. Diese ist nicht in der Lage, das fluoreszenzauslöschende Thiazols (**72**) auszubilden, wodurch sich die Wiederfindung stark verbessert. Nachteilig ist, dass bei dieser Methode auch das in den Proteinen vorliegende Cystin (**74**) zu Cysteinsäure (**76**) umgewandelt wird, weshalb nur die Bestimmung eines Summenparameters möglich ist.

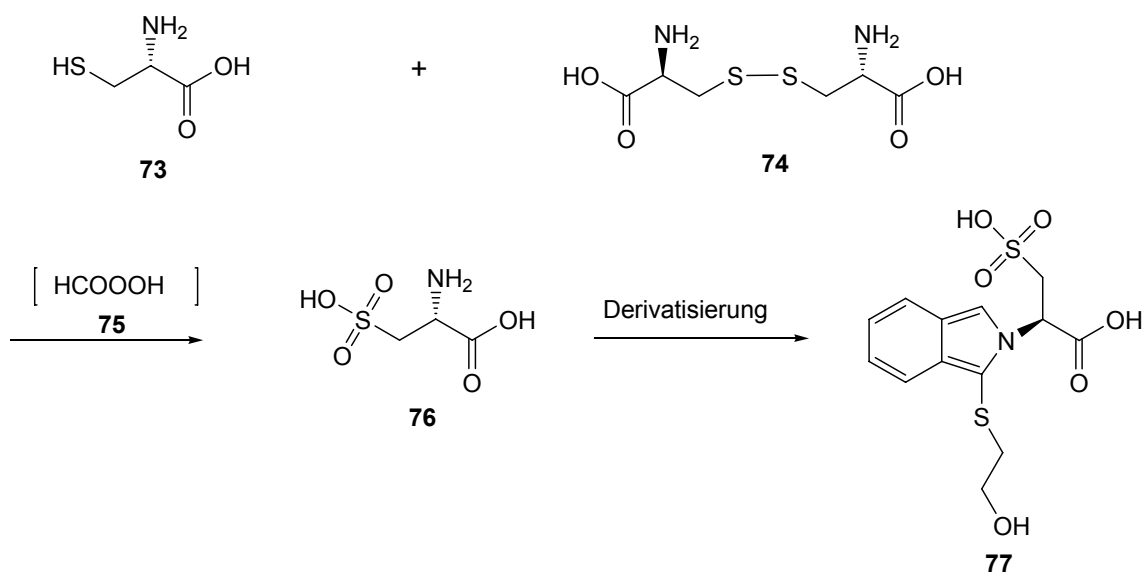


Abbildung 3-39: Umwandlung von Cystein (**73**) und Cystin (**74**) zu Cysteinsäure (**76**) und anschließende Derivatisierung nach Lindroth und Mopper^[137] sowie Hirs^[144]

Bei dem Vergleich von verwundeter und intakter Alge konnte jedoch keine signifikante Veränderung des Cysteingehalts nachgewiesen werden. Da aber in den Modellreaktionen das Quervernetzungsprodukt von *in situ* deacetyliertem Caulerpenin (**17**) und Cystein (**73**) eindeutig nachgewiesen wurde und dessen Struktur aufgeklärt werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Konstanz an Cystein (**73**) / Cystin (**74**) in *C. taxifolia* vor und nach Verwundung durch andere Faktoren, wie das dominante Vorhandensein von Schwefelbrückenbindungen, die Cystein nicht zugänglich machen, erklärbar ist. Um die Stabilität der aus Cystein (**73**) / Lysin (**64**) und Oxytoxin 2 (**46**) entstehenden Vernetzungs- bzw. Kondensationsprodukte unter den jeweilig angewendeten Hydrolysebedingungen zu überprüfen, wurden die zur Strukturaufklärung verwendeten Verbindungen **62** und **66** unter den gleichen Bedingungen wie die Alge hydrolysiert und anschließend mittels HPLC/MS untersucht. Es konnten dabei weder das Lysin-Kondensationsprodukt (**62**) noch das vernetzte Cysteinprodukt (**66**) nachgewiesen werden. Jedoch sind weder freies Lysin (**64**) noch Cystein (**73**) / Cysteinsäure (**76**) massenspektrometrisch detektierbar. Die Proben wurden mittels Massen- und nicht durch Fluoreszenzdetektion untersucht, um zusätzlich Aufschluss über charakteristische Abbauprodukte erhalten zu können. Die Reaktionsprodukte **62** und **66** sind somit zwar unter den Hydrolysebedingungen nicht stabil, bei ihrem Abbau werden jedoch die enthaltenen Aminosäuren oder diesen ähnliche Verbindungen nicht wieder freigesetzt, so dass sie keinen Beitrag zu dem gemessenen Aminosäuregehalt leisten.

3.1.6 Einfluss der Verwundung auf den pH-Wert

Die verwundungsaktivierte Umwandlung von Caulerpenin (**17**) im Falle der Gewebeerstörung durch einen Fraßangriff führt nicht nur zu reaktiven Folgeprodukten wie z. B. den Oxytoxinen **18** und **46**, sondern auch zur Freisetzung von drei Äquivalenten Essigsäure (**10**) pro Mol Caulerpenin (**17**). Um zu überprüfen, wie stark sich der pH-Wert in den von der Verwundung betroffenen Gewebeteilen verändert, wurde dieser bei verwundeter und intakter *C. taxifolia* bestimmt. Zur Bestimmung des pH-Wertes von intakter *C. taxifolia* wurde die Enzymaktivität durch Kochen ausgeschaltet.

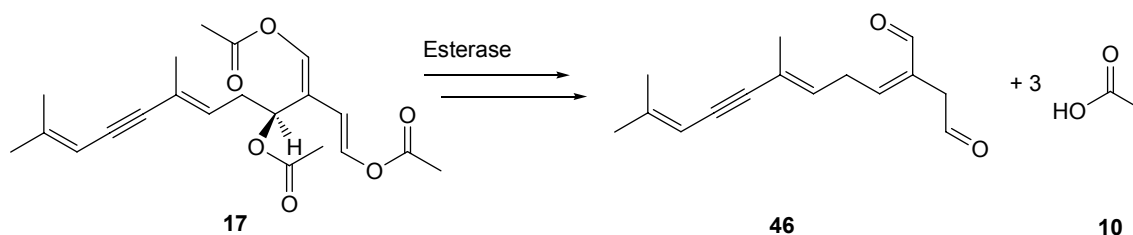


Abbildung 3-40: Freisetzung von Essigsäure (**10**) durch verwundungsaktivierte Umwandlung von Caulerpenin (**17**)

In der intakten Alge wurde so ein Wert von pH = 7,1 nachgewiesen, in verwundetem Gewebe betrug dieser hingegen pH = 4,9.

3.1.7 Bioassays

Aus der Literatur sind Beispiele von höheren Pflanzen und Algen bekannt, deren chemische Verteidigung auf niedrigen pH-Werten beruht. Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.2.1 Konstitutive chemische Verteidigung) erwähnt, setzten Braunalgen der Gattung *Desmarestia* bei Herbivorie in Vakuolen gespeicherte Schwefelsäure frei.^[15] Aber auch Abwehrmechanismen, die auf Proteinvernetzung durch reaktive Stoffe basieren, sind bekannt. Beim Liguster wird nach Verwundung die Nahrungsqualität durch Proteinquervernetzung soweit herabgesetzt, dass sich nur wenige Herbivoren, die ein geeignetes Abwehrsystem entwickelt haben, durchsetzen können.^[115, 116]

Lange Zeit wurde das Sesquiterpen Caulerpenin (**17**) als einziger chemischer Verteidigungsmetabolit von *C. taxifolia* angesehen. Allerdings weist diese Verbindung nur in hohen Konzentrationen biologische Aktivität, wie die Inhibierung der Zellteilung von Tumorzellen^[52] sowie die Beeinflussung der Mikrotubuliasbildung^[145] und der DNA-Vervielfältigung^[146] sowie der Aktivität regulatorisch wirkender Proteine von Seeigelembryonen^[147], auf. Auch kann Caulerpenin (**17**) die Vermehrung von Mikroalgen verlangsamen oder – in höheren Konzentrationen – blockieren.^[148]

Bei anderen Algen der Gattung *Caulerpa* wurde von Paul und Fenical^[57] gezeigt, dass die aus der Speicherform des 1,4-bis-Enoylacetats **34** abgeleiteten, reaktiven freien Aldehyde **35** und **36** eine stärker fraßhemmende Wirkung zeigen als die Ausgangsverbindungen (vgl. Kapitel 1.2.2.2 Aktivierte chemische Verteidigung). Dieses Resultat wurde von Gavagnin *et al.* 1994 experimentell bestätigt.^[136]



Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals untersucht, inwieweit die Endprodukte der Caulerpeninumwandlung, also das entstehende Polymer und die freigesetzte Essigsäure (**10**), einen Einfluss auf das Fraßverhalten von Herbivoren haben. Dazu wurden Bioassays mit Amphipoden, von denen die Art *Elasmopus levis* in Abb. 3-41 zu sehen ist, durchgeführt.

Abbildung 3-41: *Elasmopus levis*
mit künstlichem Futter

Die Futterpräferenz der Amphipoden wurde mittels eines Choice-Assays untersucht, bei welchem dem Versuchstier jeweils zwei verschiedene Algenproben als Futter angeboten wurden. Da die Nahrungsaufnahme der Flohkrebse sehr gering ist, kann in dem Versuchszeitraum von 90 Minuten keine quantitative Aussage darüber getroffen werden, welche Algenmenge tatsächlich gefressen wurde. In der Literatur wird daher auch der Aufenthaltsort der Flohkrebse mit der Futterwahl in Verbindung gesetzt.^[149, 150] Auch bei den hier durchgeführten Choice-Assays wurde deshalb davon ausgegangen, dass das Futter, auf dem sich die Amphipoden befinden, auch befressen wird. Für diese Art des Assays standen drei verschiedene Flohkrebsarten (*Elasmopus levis*, *Dulichella* spp. sowie *Paracereis caudata*) zur Verfügung. Diese sind an der nordamerikanischen Atlantikküste heimisch und kommen bevorzugt mit der Braunalge *Dictyota menstrualis* assoziiert vor.^[151-153] Da die eingesetzten Herbivoren somit nicht in denselben Habitaten vorkommen wie *C. taxifolia*, wurde überprüft, ob die Flohkrebsarten, das in der Literatur zur Kontrolle verwendete, künstliche Futter auf Basis der Grünalge *Ulva* spp.^[11] bevorzugen oder aus intakter *C. taxifolia* hergestelltes Futter ebenfalls akzeptieren. Pro Versuch wurden jeweils 12 Individuen eingesetzt.

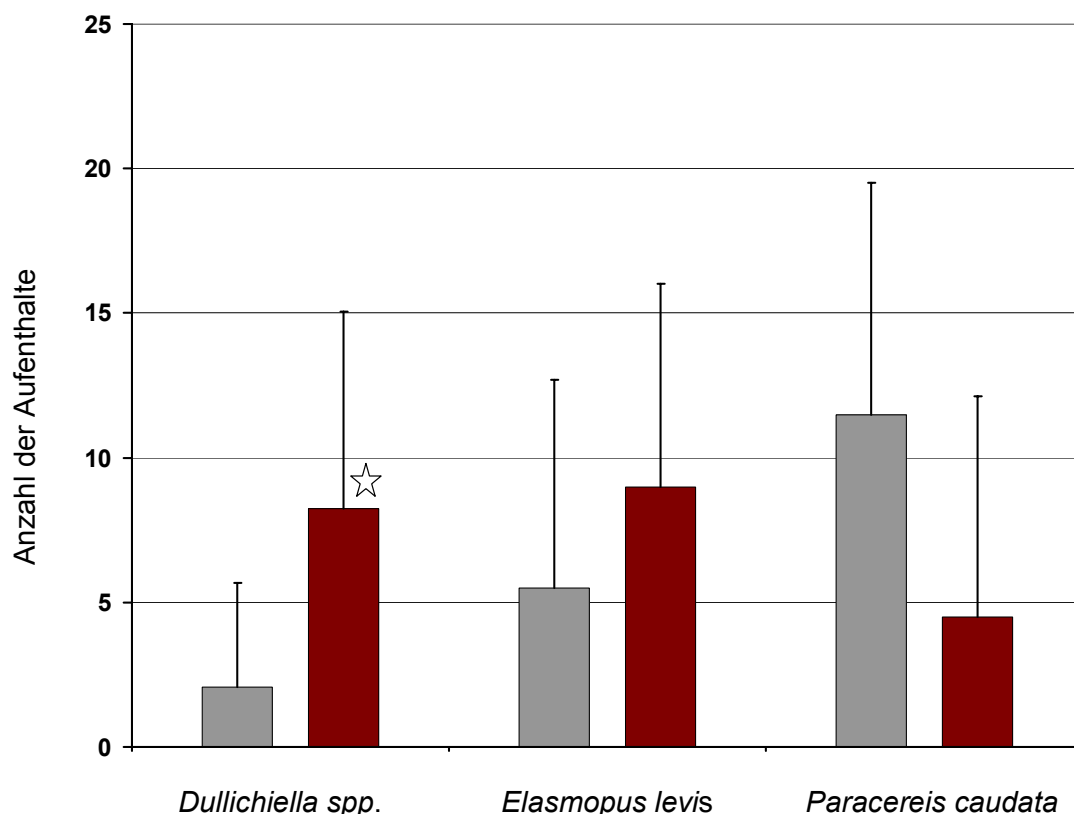


Abbildung 3-42: Futterpräferenz von *Dulichella* spp., *Elasmopus levis* und *Paracereis caudata* bei Choiceassays zwischen künstlichem Futter aus *Ulva* spp. (grau) und *C. taxifolia* (rot)

Dabei stellte sich heraus, dass zwei der eingesetzten Flohkrebsarten keine signifikante Präferenz für eine Algenart zeigen und die Amphipodenart *Dulichella* spp. *C. taxifolia* leicht bevorzugt (Abb. 3-42). Da alle getesteten Arten Futter auf der Basis von *C. taxifolia* ebenso wie das literaturbeschriebene Kontrollfutter^[11] akzeptieren, sind diese drei Arten für den Vergleich von intakter und verwundeter *C. taxifolia* geeignet. Die Futterexperimente wurden mit der Amphipodenart *E. levis* durchgeführt. Von Cruz-Rivera und Hay wurden mit *E. levis* Bioassays durchgeführt, in denen den Versuchstieren Futter von hoher und niedriger Nahrungsqualität angeboten wurde. Das qualitativ hochwertigere Futter verfügte im Vergleich zum nährstoffstoffarmen Futter über einen 21-fach höheren Anteil an Proteinen, die dreifache Menge an organisch gebundenem Stickstoff und doppelt soviel gesamt organisch gebundenen Kohlenstoff (TOC). Die Flohkrebse der Art *E. levis* zeigten eine signifikante Bevorzugung des hochwertigen Futters, wodurch gezeigt wurde, dass diese Art zwischen verschiedenen Futterqualitäten unterscheidet.^[149] Da intakte und verwundete *C. taxifolia* durch die verwundungsaktivierte Abreicherung einzelner Aminosäuren potentiell sehr unterschiedliche Futterqualitäten aufweist, ist die Art *E. levis* für diese Bioassays besonders geeignet.

Um eine Beeinflussung der Futterwahl durch Textur und Struktur der intakten bzw. verwundeten Alge zu vermeiden, wurde künstliches Futter auf Agarbasis hergestellt. Dazu wurde die verwendete intakte und verwundete *C. taxifolia* gefriergetrocknet und zu einem feinen Pulver zermörsert; 2 g dieses Pulvers wurden in 16 ml Wasser suspendiert. Parallel wurden 720 mg Agar in 20 ml Wasser gelöst, in der Mikrowelle erhitzt und die beiden Lösungen vereinigt. Durch diese Vorgehensweise konnte Futter von konstanter Zusammensetzung, Konzentration und Konsistenz hergestellt werden (vgl. Hay *et al.* 1994^[154]).

Die Futterexperimente wurden mit 31 Individuen der Art *E. levis* über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt, wobei in Abständen von 5 Minuten der Aufenthaltsort des jeweiligen Individuums festgehalten wurde. Dabei zeigte sich deutlich eine Präferenz für das aus intakten Algen gewonnene Futter, wie in Abb. 3-43 zu sehen ist.

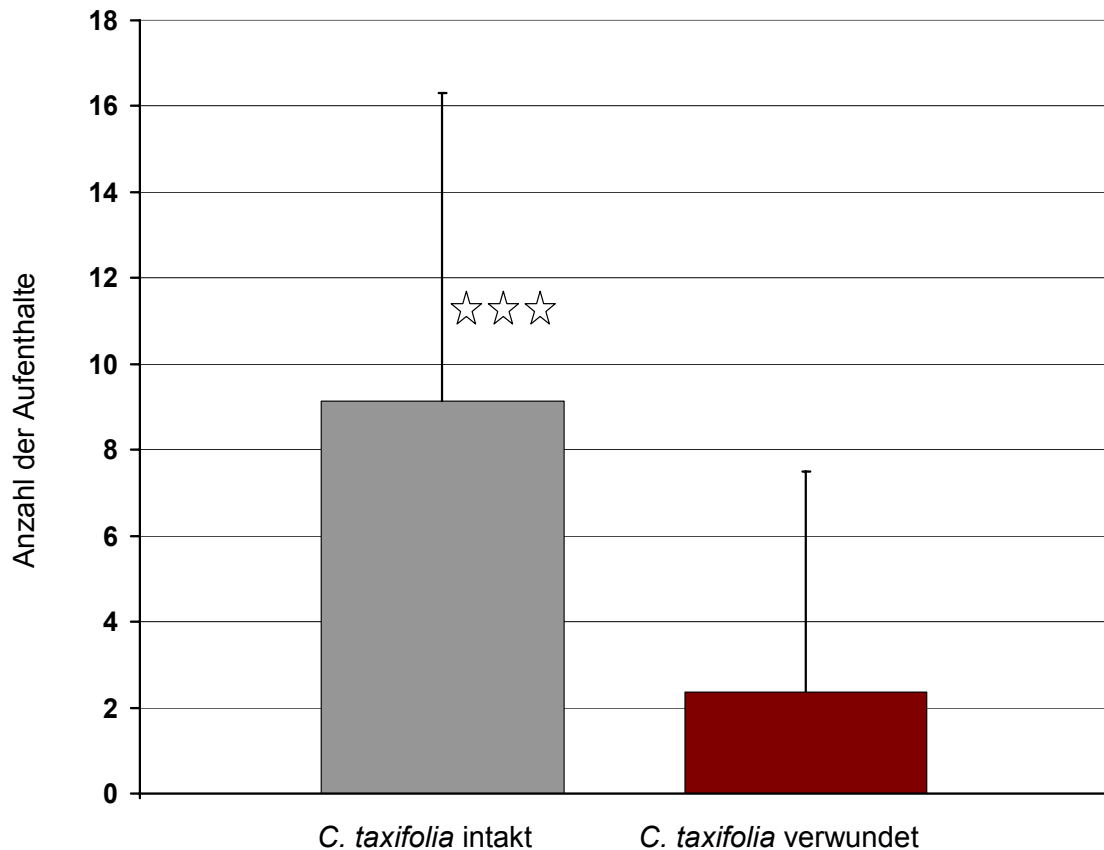


Abbildung 3-43: Aufenthalt von *E. levis* auf intakter bzw. verwundeter *C. taxifolia*

Diese Ergebnisse zeigen, dass Caulerpenin (**17**), entgegen der bisher in der Literatur vorherrschenden Meinung,^[132, 133] nicht als Verteidigungsmetabolit von *C. taxifolia* wirkt, da von *E. Levis* die Algenprobe bevorzugt wird, welche Caulerpenin (**17**) enthält. Wie durch die Quantifizierungsuntersuchungen des Abbauprodukts Oxytoxin 2 (**46**) (als Halbacetal **48**) gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.3 Verwundung in Gegenwart von freien Aminosäuren), sind diese 5 Minuten nach der Verwundung der Alge nur noch in Spuren nachweisbar. Ein Einfluss der Substanzen **17** und **46** kann daher ausgeschlossen werden. Die Resistenz verwundeter *C. taxifolia* gegenüber Fraßfeinden kann somit auf die abnehmende Futterqualität der Alge zurückgeführt werden.

Um zu verifizieren, dass Caulerpenin (**17**) keine signifikante Abwehrwirkung gegenüber Herbivoren aufweist, und um einen möglichen Einfluss der Beschaffenheit der Algenproben ausschließen zu können, wurde die als Futter verwendete Grünalge *Ulva* spp. mit Caulerpenin (**17**) versetzt. Dazu wurde der künstlichen Futteralgenmischung **17** in einem Gehalt von 0,5 Massenprozent zugesetzt und als Kontrolle reine Futteralgenmischung angeboten. Der Choiceassay mit 29 Organismen der Art *E. Levi* zeigte keine signifikante Bevorzugung einer der beiden Futterproben (Abb. 3-44). Folglich hat Caulerpenin (**17**) in dieser Konzentration bei der verwendeten Amphipodenart keinen Einfluss auf die Futterwahl. Das Ergebnis aus dem vorherigen Versuch, dass Caulerpenin

(17) nicht zur Fraßhemmung beiträgt, konnte auch an diesem Modellsystem bestätigt werden.

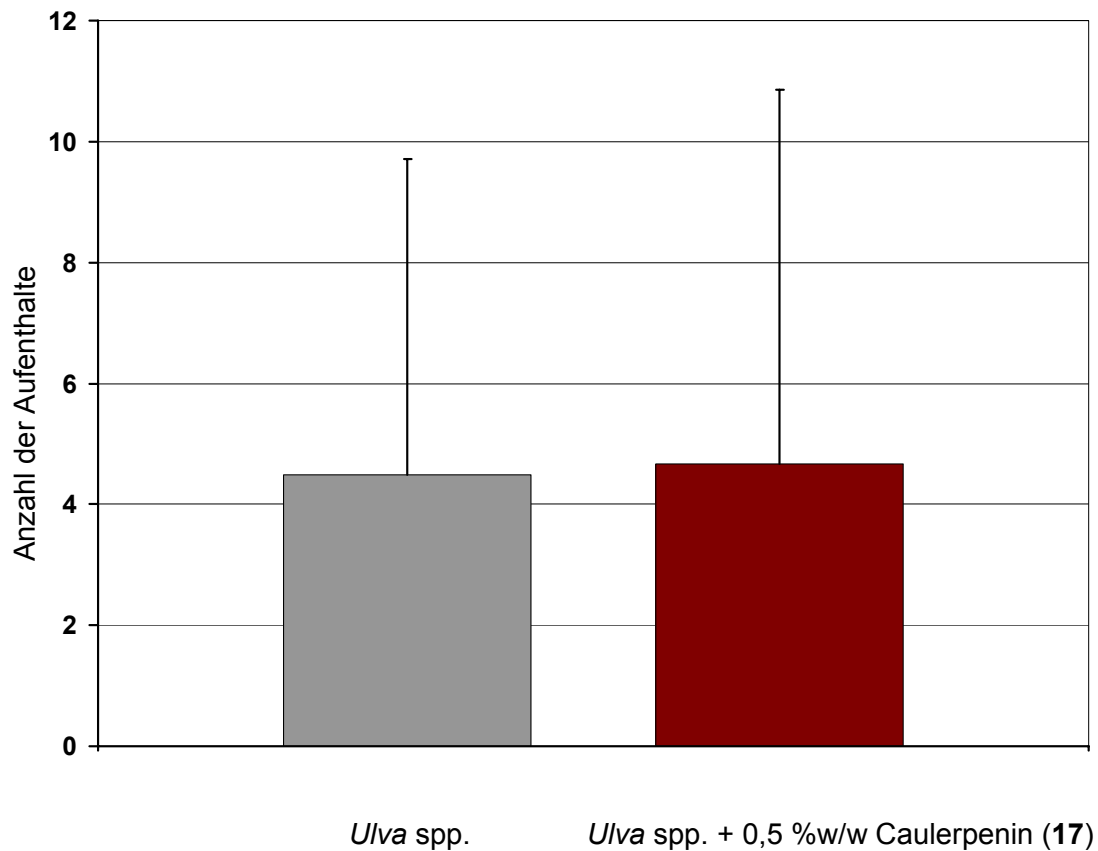


Abbildung 3-44: Vergleich der Futterwahl von *E. levis* zwischen *Ulva* spp. und *Ulva* spp. + 0,5 %w/w Caulerpenin (17)

Offensichtlich führt vielmehr die nach dem Angriff auf die Alge einsetzende Wundverschlussreaktion zur Abwehr der Fraßfeinde. Durch die Freisetzung von hochreaktiven Oxytoxin 2 (46) durch enzymatische Umwandlung von Caulerpenin (17) sinkt der pH-Wert des betroffenen Gewebes ab und es verarmt an essentiellen Aminosäuren, welche durch die stattfindende Quervernetzung nicht mehr für die Herbivoren nutzbar sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wundverschlussreaktion neben der Zellreparatur nach Gewebefragmentierung auch zur Abwehr von Herbivoren dient. Da geschützte 1,4-Dialdehyde in der Klasse der siphonalen Grünalgen sehr häufig nachgewiesen wurden, ist es denkbar, dass diese Reaktion des Wundverschlusses mit daraus resultierender Herbivorenabwehr ebenfalls bei anderen Vertretern dieser Gattung zu finden ist und somit möglicherweise ein weit verbreitetes Prinzip darstellt.

3.2 Aktivierte chemische Verteidigung von Diatomeen

3.2.1 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Aldehyde als Verteidigungsmetabolite

Nicht nur bei einzelligen Makro-, sondern auch bei einzelligen Mikroalgen ist eine verwundungsaktivierte Veränderung des Metabolitenspektrums zu beobachten. Hier dient sie jedoch nicht der Zellreparatur, sondern stellt eine Form der aktivierten chemischen Verteidigung dar (vgl. Kap. 1.2.2.2 Aktivierte chemische Verteidigung).

Nach der mechanischen Zerstörung dieser einzelligen Mikroalgen werden beispielsweise von *T. rotula* u. a. die in Abb. 3-45 dargestellten $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyde 2E,4E/Z,7Z-Decatrienal (**78**), 2E,4E/Z-Decadienal (**7**), 2E,4E/Z-Heptadienal (**79**) und 2E,4E/Z,7-Octatrienal (**80**) freigesetzt.^[30, 155] Diese Aldehyde sind in der Lage, den Fortpflanzungserfolg der Hauptfressfeinde der Diatomeen, den Copepoden, zu verringern.^[26, 30, 33]

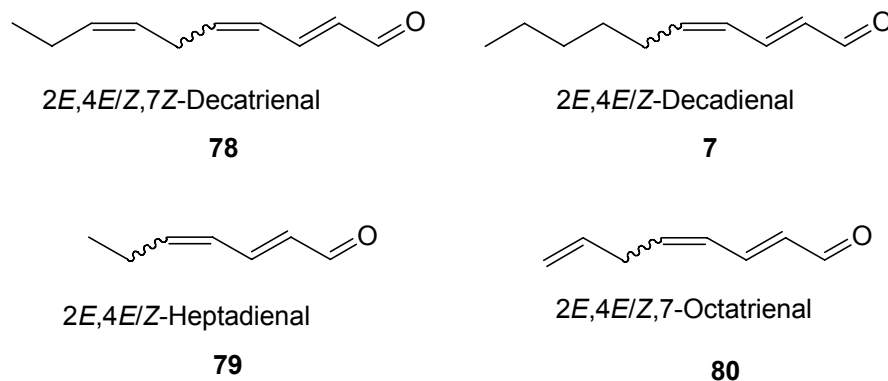


Abbildung 3-45: Von *T. rotula* nach Verwundung produzierte, ungesättigte Aldehyde

Die Biosynthese der Aldehyde **78** und **79** ist in Abb. 3-46 dargestellt. Direkt nach Verwundung der Kieselalge werden aus Phospho- (**81**) und Glykolipiden (**82**) ungesättigte Fettsäuren freigesetzt. Bei der Diatomeenart *T. rotula* kommt es durch die mechanische Zerstörung der Zelle zur Freisetzung von Phospholipase A₂ und einer noch nicht näher spezifizierten Glykolipase. Diese Enzyme katalysieren die schnelle Hydrolyse der Lipide **81** und **82** zu den korrespondierenden freien Fettsäuren.^[28, 29] Ausgehend von der freigesetzten 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure (**83**) und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird durch verschiedene Lipoxygenasen an unterschiedlichen Positionen des homokonjugierten Doppelbindungssystems zunächst eine Hydroperoxidgruppe eingeführt, wodurch z. B. **84** und **85** entstehen. Die dadurch bedingte Umordnung des Doppelbindungssystems und die anschließende Spaltung des Moleküls durch Lyasen führen zur Bildung der ungesättigten Aldehyde **78** und **79**.^[156, 157] Durch

vergleichende Studien mit synthetisierten Standards konnte gezeigt werden, dass lediglich eine $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Aldehydfunktion und eine hohe Lipophilie vorliegen muss, damit biologische Aktivität, in diesem Fall die Störung der Entwicklung von Seeiglembryonen, zu beobachten ist.^[158]

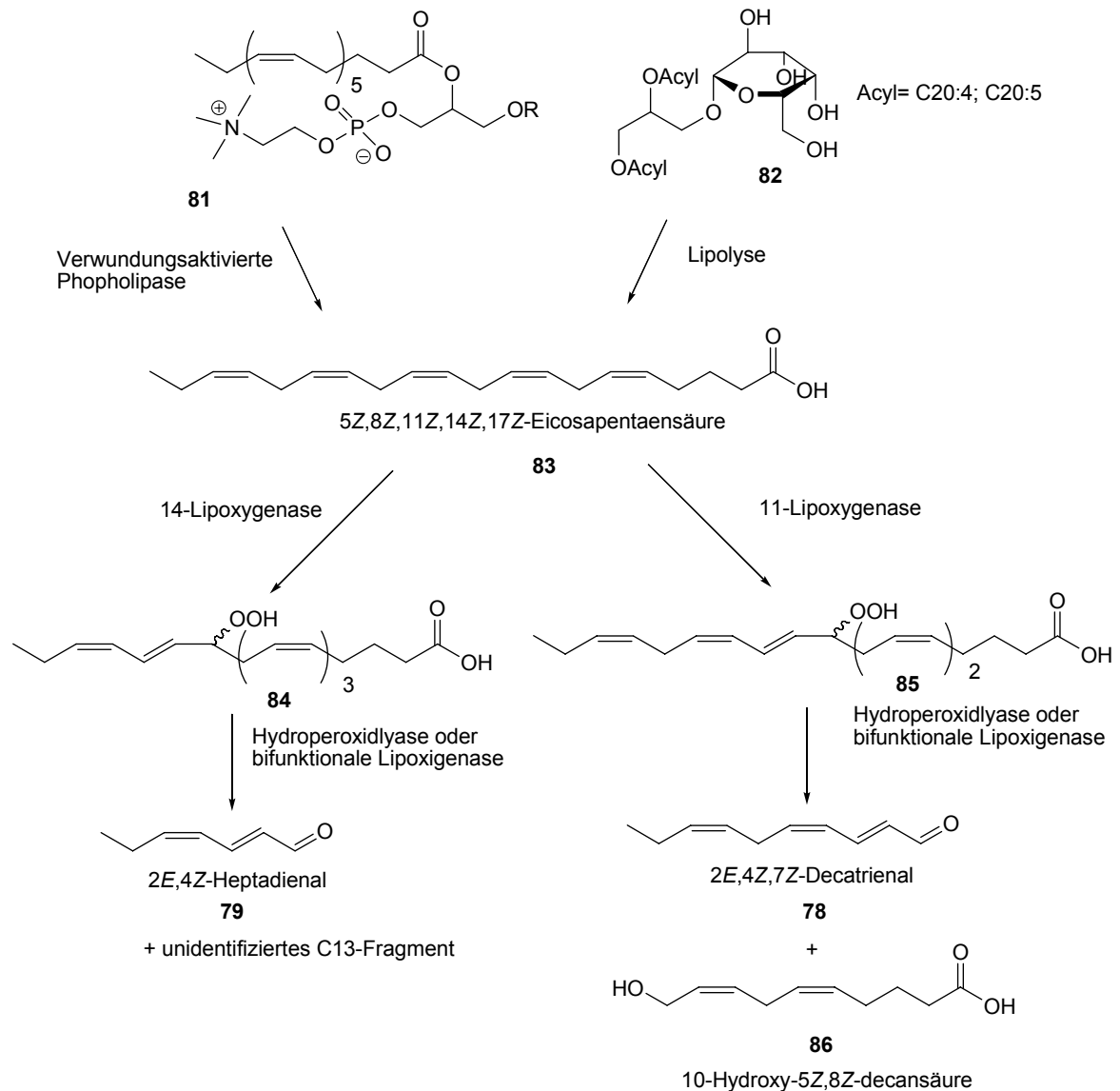


Abbildung 3-46: Postulierte Biosynthese von 2E,4Z-Heptadienal (**79**) und 2E,4Z,7Z-Decatrienal (**78**) in *T. rotula* nach Pohnert^[30] sowie Barofsky und Pohnert^[159]

Durch diesen Biosyntheseweg kann die Herkunft eines Großteils der bei *T. rotula* nach Verwundung freigesetzten Aldehyde erklärt werden. Durch Umsetzung von Eicosapentaen- (**83**) bzw. Eicosatetraensäure (**6**) werden die Oxylipine **7**, **78** und **79** freigesetzt. Der Beweis, dass der Metabolit **7** von Eicosatetraensäure (**6**) abgeleitet ist, konnte durch die Applikation von [5,6,8,9,11,12,14,15-²H₈]-Arachidonsäure (**d₈-6**) zu zerstörten *T. rotula*-Zellen erbracht werden. Durch die enzymatische Aktivität der

Diatomeenzellfragmente wurde der deuterierte Aldehyd [1,2,4,5-²H₄]-**7** produziert und konnte anschließend mittels GC/MS nachgewiesen werden.^[27]

Der Ursprung von *2E,4E/Z,7*-Octatrienal (**80**) ist durch die Biosynthese (Abb. 3-46) nicht zu erklären, da dieser Metabolit aus keiner bekannten ungesättigten C₂₀-Fettsäure abgeleitet werden kann. Nimmt man für das freigesetzte *2E,4E/Z,7*-Octatrienal (**80**) einen analogen Entstehungsmechanismus zu den Aldehyden **7**, **78** und **79** an, so muss es sich bei dem Fettsäurevorläufer um *6Z,9Z,12Z,15*-Hexadecatetraensäure (**96**) handeln, da dies die einzige in Diatomeen nachgewiesene ω-1 Fettsäure ist. Die ungewöhnliche Fettsäure **96** wurde 1954 zum ersten Mal in Fischöl nachgewiesen.^[160] Sie wird ausschließlich von Diatomeen biosynthetisiert und kann deshalb als Biomarker genutzt werden, mit dessen Hilfe die Beziehungen in Nahrungsnetzen nachvollzogen werden können.^[161] Die Vermutung, dass *2E,4E/Z,7*-Octatrienal (**80**) von *6Z,9Z,12Z,15*-Hexadecatetraensäure (**96**) abgeleitet ist, wird durch Ergebnisse von d'Ippolito *et al.* unterstützt, die zeigen, dass die Diatomeenart *Skeletonema costatum* verwundungsaktiviert *2E,4E/Z*-Octadienal aus *6Z,9Z,12Z*-Hexadecatriensäure freisetzt.^[162] Trotz der Bedeutung von **96** gab es keinen synthetischen Zugang zu dieser Verbindung, vermutlich, da die Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren vorwiegend durch Kopplung von mehreren Alkinelementen realisiert wird.^[163] Dabei ist eine lange Sequenz von Kopplungsschritten und Schutzgruppenoperationen durchzuführen, welche die Darstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren sehr aufwändig machen.

3.2.2 Synthese von *6Z,9Z,12Z,15*-Hexadecatetraensäure (**96**)

Um den Zugang zu markierten Fettsäuren zu vereinfachen und nachzuweisen, dass *2E,4E/Z,7*-Octatrienal (**80**) biosynthetisch aus *6Z,9Z,12Z,15*-Hexadecatetraensäure (**96**) hervorgeht, wurde eine Syntheseroute geplant, die eine, in unserer Arbeitsgruppe entwickelte, dissymmetrisierende bis-Wittig-Reaktionssequenz nutzt. Letztere diente ursprünglich zur Herstellung von homokonjugierten Di- und Trienen.^[164]

Durch diesen neuen Syntheseweg können die Fettsäure **96** und das deuteriummarkierte Analogon zur Untersuchung der Biosynthese von ungesättigten Aldehyden in Diatomeen in wenigen Reaktionsschritten hergestellt werden (Abb. 3-47).^[31]

Das Edukt dieser Syntheseroute stellt mono-THP-geschütztes Hex-3-in-1,6-diol (**87**) dar, welches nach einer Vorschrift von *Eya et al.* in zwei Stufen aus kommerziell erhältlichem But-3-in-1-ol dargestellt werden kann.^[165]

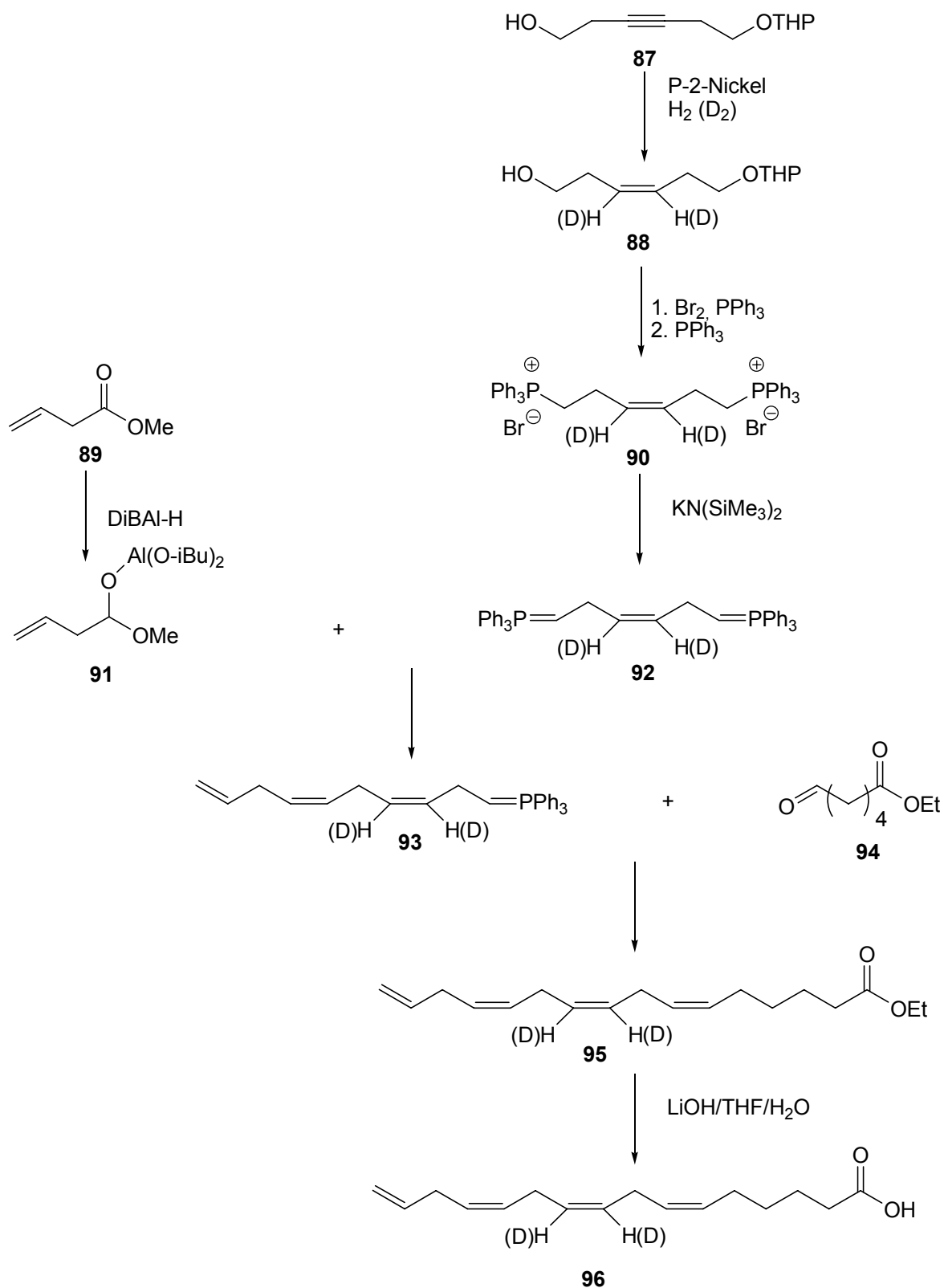


Abbildung 3-47: Synthese von 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (96) und [9,10-²H₂]-6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (d₂-96)

Das Edukt **87** wird mit P-2-Nickel als Katalysator mit Wasserstoff bzw. Deuterium hydriert. Der Katalysator P-2-Nickel wird *in situ* durch die Reduktion von Ni(OAc)₄ x (H₂O)₄ mit

einer äquimolaren Menge an NaBH_4 in Ethanol und Wasserstoff bzw. Deuteriumatmosphäre hergestellt. Die dabei entstehende kolloidale Nickel/Bor-Legierung wird durch die Zugabe von Ethylendiamin partiell vergiftet. P-2-Nickel weist, ebenso wie der sonst standardmäßig verwendete Lindlar-Katalysator, als heterogener Katalysator eine hohe *cis*-Selektivität bei der Monohydrierung von Dreifachbindungen auf, ist aber gerade bei Propagylalkoholen besonders aktiv. Eine Überhydrierung zum entsprechenden Alkan ist nicht zu beobachten.^[166, 167]

Im nächsten Schritt wurde die Verbindung **88** ohne die Entschützung des Alkohols durch Umsetzung mit Brom/Triphenylphosphin in die Zwischenstufe 1,6-Dibromhex-3-in überführt, welche ohne Aufarbeitung durch die erneute Zugabe von Triphenylphosphin direkt weiter zu dem korrespondierenden Wittig-Salz **90** umgesetzt wurde. Dadurch wurde die schwierige Aufreinigung des polaren Hex-3-in-1,6-diols umgangen und eine eventuell reduzierte Ausbeute durch nicht vollständige Entschützung im Reaktionsverlauf in Kauf genommen.

Die so erhaltenen und durch Umkristallisation aufgereinigten Wittig-Salze **90** können über längere Zeiträume stabil gelagert werden und stellen einen idealen Grundbaustein für die Synthese markierter und unmarkierter Fettsäuren dar. Das Startmaterial **90** ermöglicht einen sehr flexiblen Zugang zu dieser Substanzklasse. So ist es leicht möglich, in einer zweistufigen Reaktion eine breite Varianz an mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder fettsäureabgeleiteten Strukturen zur Aufklärung biosynthetischer Prozesse herzustellen. Im Gegensatz zu den meisten literaturbeschriebenen, aktuellen Synthesen von Fettsäuren^[157, 163] bietet dieser Syntheszugang den Vorteil, nur eine zentrale Doppelbindung zu markieren und nicht alle vorhandenen Dreifachbindungen simultan in deuterierte Doppelbindungen zu überführen. Dies vereinfacht massenspektrometrische Untersuchungen, da im Gegensatz zu einer uniformen Markierung charakteristischere Fragmente entstehen, wodurch detaillierte Aussagen über die ablaufende Biosynthese getroffen werden können. Abb. 3-48 zeigt die Fettsäurezusammensetzung der Diatomee *T. rotula* vor und nach Verwundung. Daraus geht eindeutig hervor, dass in der intakten Zelle nur gesättigte Fettsäuren der Kettenlänge C_{14} - C_{18} nachweisbar sind. Erst nach mechanischer Zerstörung der Zelle werden ungesättigte Fettsäuren, welche die biosynthetischen Vorläufer der zur chemischen Verteidigung genutzten $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -ungesättigten Aldehyde sind, freigesetzt. Durch den Vergleich mit dem synthetisch hergestellten Standard **96** konnte gezeigt werden, dass sich unter diesen auch die ungewöhnliche 16:4 ω -1 Fettsäure **96** befindet.

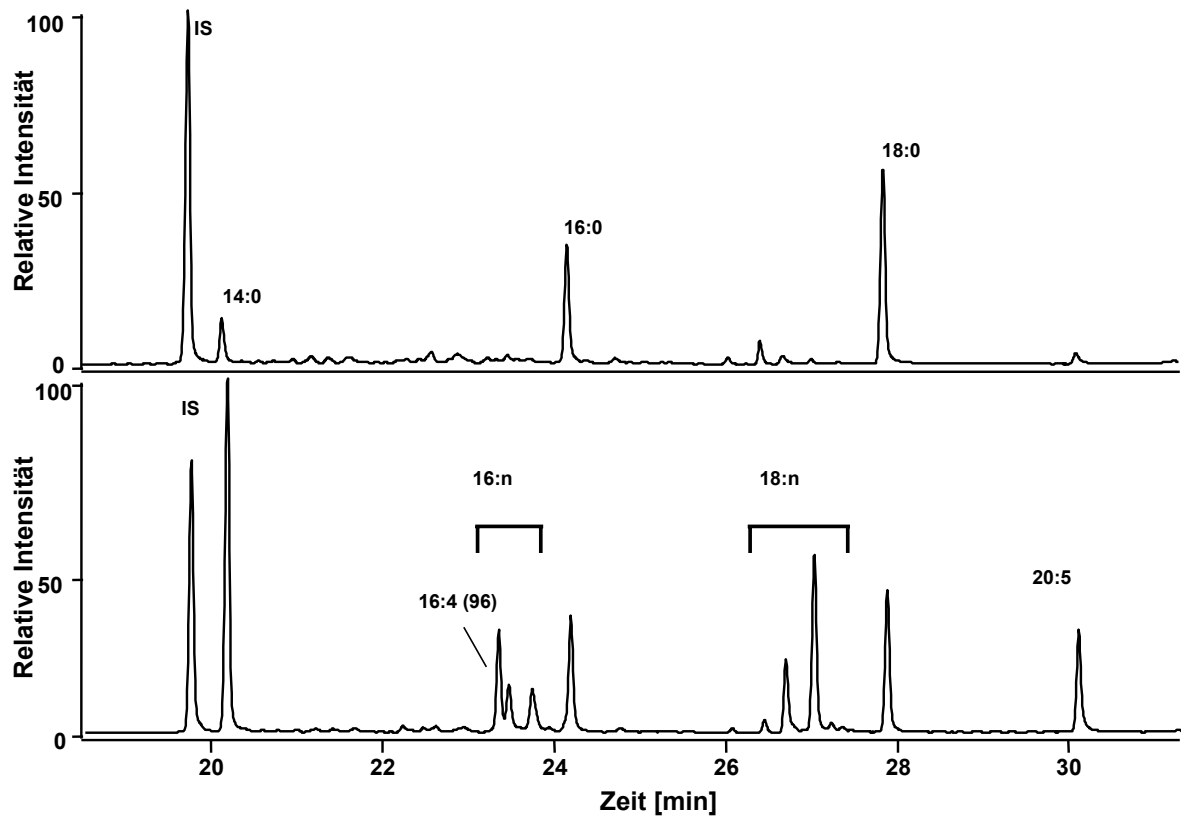


Abbildung 3-48: Freie Fettsäuren in intakter (oben) und verwundeter (unten) *T. rotula*. IS=[$^2\text{H}_{27}$]-Myristinsäure

Für die Aufklärung der Biosynthese wurde nun die deuteriummarkierte Fettsäure d_2 -**96** genutzt und direkt vor Verwundung der Zellen dem Seewassermedium zugesetzt. Abb. 3-49 zeigt eine starke Freisetzung von [1,2- $^2\text{H}_2$]2*E*,4*E*/*Z*,7-Octatrienal (d_2 -**80**) nach Verwundung der Mikroalge, was bedeutet, dass die extern zugegebene Verbindung **96** der biosynthetische Vorläufer von 2*E*,4*E*/*Z*,7-Octatrienal (**80**) bei *T. rotula* ist.

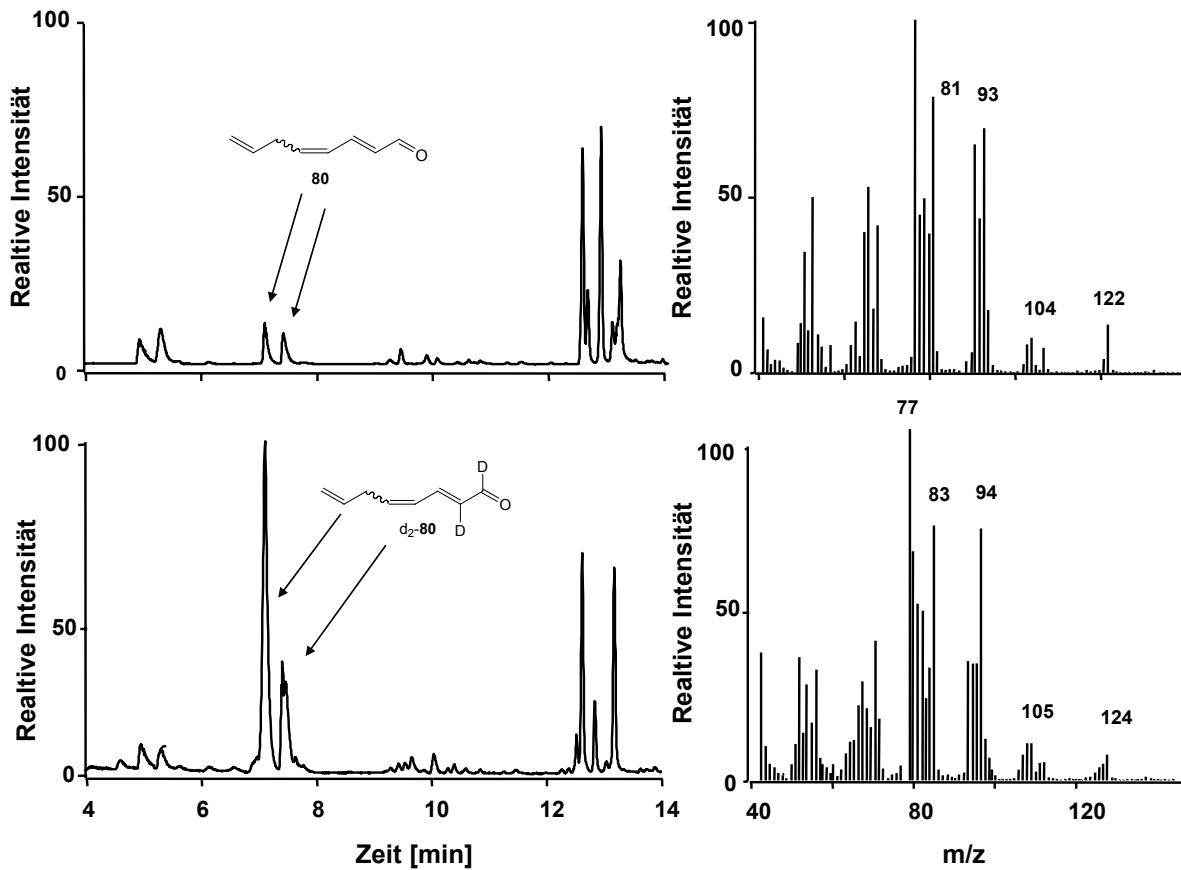


Abbildung 3-49: GC/MS-Chromatogramme der Aldehydproduktion von *T. rotula* ohne (oben) bzw. mit (unten) Zugabe von $[9,10-^2\text{H}_2]$ -6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (d_2 -**96**)

Anhand des Fragmentierungsmusters kann aus den Massenspektren des deuterierten Folgemetaboliten die Biosynthese von **80** abgeleitet werden (Abb.:3-50). Nachdem in d_2 -**96** durch eine Lipoxygenase molekularer Sauerstoff zwischen Position C8 und C9 eingeführt wurde, wird das entstehende Hydroperoxid **97** durch Lyaseaktivität gespalten, da die Isotopenmarkierung ausschließlich an den Positionen C1 und C2 von **80** zu finden ist und somit der intakte C9-C16-Terminus von $[9,10-^2\text{H}_2]$ -6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (d_2 -**96**) im Produkt **80** wiederzufinden ist.

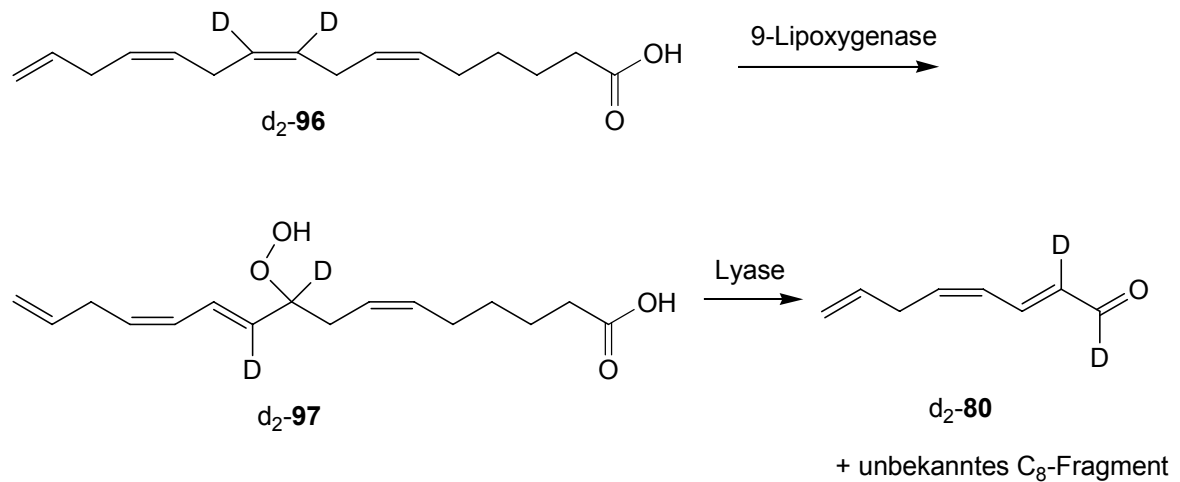


Abbildung 3-50: Biosynthese von $[1,2\text{-}^2\text{H}_2]\text{-}2\text{E},4\text{E}/\text{Z},7\text{-Octatrienal}$ ($\text{d}_2\text{-80}$)

Durch den Einsatz von $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]\text{-}6\text{Z},9\text{Z},12\text{Z},15\text{-Hexadecatetraensäure}$ ($\text{d}_2\text{-96}$) als Marker wurde bewiesen, dass die Bildung der als Verteidigungsmetabolite eingesetzten, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyde stark von dem Angebot an freien Fettsäuren abhängt. Durch die Entwicklung eines kurzen und leicht zugänglichen Syntheseweges von $\text{d}_2\text{-96}$ und dessen Applikation zu verwundeten Zellen konnte die Biosynthese von Verteidigungsmetaboliten der Diatomeenart *T. rotula* aufgeklärt werden. Des Weiteren ermöglicht die entwickelte, einfache und flexible Synthesestrategie einen breiten Zugang zu di-deuteriummarkierten Fettsäuren und fettsäureabgeleiteten Verbindungen aus dem zentralen Vorläufermolekül **90**.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die bisher nur unvollständig erforschte Wundverschlussreaktion von *C. taxifolia* wurde eingehend untersucht. Der grundlegende Reaktionsablauf der Polymerbildung sowie die für die Wundheilung notwendigen Faktoren konnten ermittelt werden.

- Nach Zerstörung der Zellintegrität wird Caulerpenin (**17**) enzymatisch in reaktive Aldehyde (**18, 41–46**) überführt, die nur über einen Zeitraum von wenigen Minuten im Algengewebe nachweisbar sind. Dieser Abbau stimmt zeitlich mit der Ausbildung des Wundverschlusses der Alge überein.
- Die Verwundungsreaktion von *C. taxifolia* führt zur Abreicherung von Proteinen mit einer molekularen Masse zwischen 15 und 100 kDa. An ihre Stelle treten Polymere mit einem deutlich höheren molekularen Gewicht. Durch den Einsatz eines fluoreszent markierten Histons konnte sowohl in gelelektrophoretischen als auch in *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden, dass Proteine in den hochmolekularen Wundverschluss der Alge rekrutiert werden.
- Da eine eingehende Untersuchung der im Zuge der Wundverschlussreaktion entstehenden Produkte in der komplexen Algenmatrix nicht möglich war, wurde zur Vereinfachung eine Modellreaktion entwickelt. Dabei wurde Caulerpenin (**17**) durch eine immobilisierte Esterase in Gegenwart freier Aminosäuren oder eines Oligopeptids umgesetzt. Die erhaltenen Verbindungen zeigen, dass das *in situ* entstehende Oxytoxin 2 (**46**) mit freien Amin- und Thiolgruppen reagiert. Die Proteinvernetzung, die einen wesentlichen Teil der Wundverschlussreaktion darstellt, basiert daher auf dem Zusammenwirken von Caulerpenin (**17**), Esterase und nukleophilen Gruppen. Die in den Modellreaktionen identifizierten Produkte konnten nach Zugabe der entsprechenden Aminosäure auch in der Alge nachgewiesen werden.

Führt man diese Fakten zusammen, lässt sich daraus folgender Ablauf der Wundreaktion ableiten:

Nach der Zerstörung der Zellintegrität wird in der Alge gespeichertes Caulerpenin (**17**) verwundungsaktiviert zu Oxytoxin 2 (**46**) umgewandelt. Dieser reaktive Dialdehyd wirkt als Quervernetzer, der die in der Alge vorhandenen Proteine in ein Co-Polymer einbindet. Dieses Polymer entsteht bereits wenige Sekunden nach der Verwundung der Alge und bildet den primären Wundverschluss aus, der die Alge gegenüber dem sie umgebenden Medium schützt. Dadurch werden das Überleben und die gleichzeitige ungeschlechtliche Verbreitung der Alge gewährleistet. Bei zahlreichen siphonalen Algen wurden 1,4-bis-Enoylacetate nachgewiesen; durch die Aufklärung des Reaktionsprinzips ist es nun möglich, zu überprüfen, ob die Wundschlussreaktionen anderer siphonaler Algen auf den gleichen Grundlagen basieren. Das erweiterte Verständnis der Wundreaktion könnte darüber hinaus dazu beitragen, die weitere Ausbreitung der Alge in zahlreichen marinen Ökosystemen durch die Entwicklung spezifischerer Vernichtungsmethoden einzudämmen.

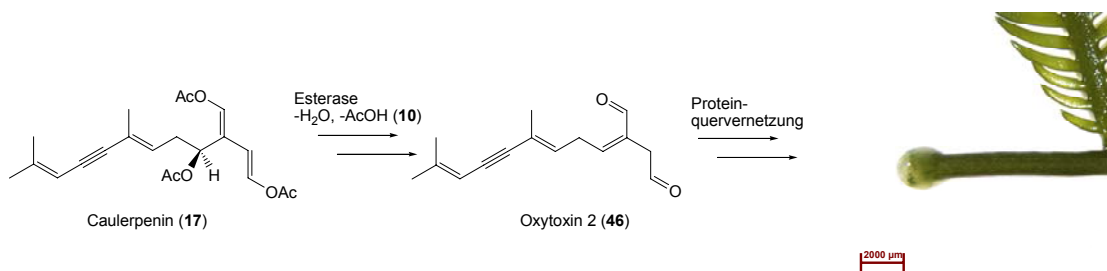


Abbildung 4-1: Ablauf der Wundverschlussreaktion bei *C. taxifolia*

Aus diesem Ablauf ergeben sich neue Fragestellungen zur Verteidigung von *C. taxifolia* gegenüber Fraßfeinden. Bisher wurde angenommen, dass Caulerpenin (**17**) oder die abgeleiteten Aldehyde **18** und **41–46** für die hohe Fraßresistenz verantwortlich sind. Die gewonnenen Ergebnisse legen jedoch nahe, dass durch die Verwundung in Gang gesetzte Prozesse ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde der Gehalt an Aminosäuren in intakter und verwundeter *C. taxifolia* miteinander verglichen. Dabei wurde gezeigt, dass die Wundreaktion zu einer deutlichen Abreicherung der Aminosäuren Lysin (**64**), Tryptophan und Tyrosin führt. Darüber hinaus wird bei der Umwandlung von Caulerpenin (**17**) zu Oxytoxin 2 (**46**) Essigsäure (**10**) freigesetzt, wodurch der pH-Wert des verwundeten Algengewebes von 7,1 auf 4,9 absinkt.

Um die ökologische Relevanz der Wunderverschlussreaktion im Bezug auf Herbivorie einordnen zu können, wurden entsprechende Bioassays mit verschiedenen Flohkrebsarten durchgeführt.

Dabei zeigt sich, dass Caulerpenin (**17**) keine fraßhemmende Wirkung besitzt, verletzte Algen hingegen gemieden werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die eigentliche Abwehr von Fraßfeinden nicht durch das Sesquiterpen **17** hervorgerufen wird, sondern auf der verminderten Nahrungsqualität der Alge basiert. In einer weiterführenden Arbeit könnte an diesem Punkt angeknüpft werden, um die Frage zu klären, welcher der beiden Faktoren den Ausschlag für die Fraßhemmung gibt: der reduzierte pH-Wert oder die Abreicherung von Aminosäuren und/oder Proteinen.

Einen weiteren Themenkomplex dieser Arbeit stellte die aktivierte chemische Verteidigung von Mikroalgen dar. Diatomeen der Art *T. rotula* produzieren verwundungsaktiviert Octatrienal (**80**), dessen potenzieller biosynthetischer Vorläufer 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (**96**) ist. Um diese Fettsäure in Diatomeen zweifelsfrei nachweisen und biosynthetische Studien durchführen zu können, wurde eine Syntheseroute zur Darstellung von **96** entwickelt. Das zentrale Syntheton stellt dabei das Wittig-Salz (Z)-Hex-3-en-1,6-di-yl-bis((triphenylphosphonium)bromid) (**90**) dar, welches in einer vierstufigen Synthese aus But-3-in-1-ol hergestellt werden kann. Durch die Reduktion der Dreifachbindung ist es möglich, an dieser Position selektiv eine Isotopenmarkierung einzuführen, wodurch die dargestellte Fettsäure zur Untersuchung von Biosynthesen verwendet werden kann. Der weitere Aufbau des Zielmoleküls **96** erfolgt über dissymmetrisierende bis-Wittig-Reaktion, wodurch 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (**96**) in einer sechsstufigen Synthesesequenz dargestellt werden kann. Durch enzymatische Umsetzungen wurde nachgewiesen, dass Octatrienal (**80**) aus 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (**96**) gebildet wird. Darüber hinaus steht mit der beschriebenen Syntheseroute ein simpler und universeller Zugang zu spezifisch markierten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Verfügung. Ausgehend von dem zentralen Vorläufer **90** können innerhalb von zwei Stufen eine Vielzahl von ungesättigten Fettsäuren dargestellt werden. Dies stellt eine erhebliche Vereinfachung und Flexibilisierung des Zugangs zu dieser Verbindungsklasse dar, welcher bislang vorwiegend auf der sequenziellen Verknüpfung von Alkinbausteinen beruhte.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
APCI	Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization)
APS	Ammonium Persulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin (2)
Asp	Asparaginsäure
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
Caul. int.	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>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
d	Dublett
Da	Dalton
DAD	Diodenarray
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dubletts
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt	Dublett von Tripletts
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisierung
eV	Elektronenvolt
h	Stunde(n)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
Hz	Hertz

Ile	Isoleucin
IS	interner Standard
Kon.	künstlichem Futter auf Basis der Kontrollalge <i>Ulva</i> spp.
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
Leu	Leucin
Lys	Lysin (64)
m	Multipllett
M	molar
MALDI	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (matrix-assisted laser desorption ionisation)
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholin)-ethansulfonsäure
Met	Methionin
min	Minuten
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NP	Normalphase
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC
ox.	oxidiert
Phe	Phenylalanin
PLE	Esterase aus Schweineleber (porcine liver esterase)
ppm	Teile pro Million (parts per million)
q	Quartett
quin.	Quintett
rt	Raumtemperatur
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RT	Retentionszeit (retention time)
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serin
SIM	Extraktion einzelner Ionen aus MS-Chromatogrammen (single ion monitoring)
STD	Standardabweichung

t	Triplett
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
Thr	Threonin
TIC	Anzeige sämtlicher Ionen in MS-Chromatogrammen (total ion count)
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
TMS	Tetramethylsilan
ToF	Flugzeit (time of flight)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
ÜD	Überlagerung mit dem in geringeren Mengen auftretenden Diastereomer
UV	Ultraviolett
Val	Valin
vgl.	vergleiche

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Geräte

6.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance DRX 500 bzw. Bruker AV 400 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
$[\text{}^2\text{H}_8]\text{-THF}$	1,73	25,5
	3,58	67,7
TMS	0	0

6.1.2 pH-Wertbestimmung

Die Messungen wurden mit einem WTW inoLab pH Level 2-Gerät mit einer SeTix 20-Messkette durchgeführt

6.1.3 Hochauflösende Massenspektrometrie

Alle Messungen wurden auf einem hochauflösenden Sektorfeldgerät MAT 95 von Thermo-Finnigan durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte durch MicroESI nach Direkteinlass, als Standard diente Lincomycin.

6.1.4 Mikroskopie

6.1.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzmessungen wurden mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop durchgeführt und mit einem AT slider und einem spot-advanced interface dokumentiert. Die Konfokalmikroskopaufnahmen wurden mit einem Axiovert 200 M/LSM 510 META mit einem Plan-Neofluar 10 x /0,3 Ph1-Objektiv aufgenommen.

6.1.4.2 Auflichtmikroskopie

Auflichtmikroskopische Messungen wurden mit einem Zeiss Stemi 2000-C Mikroskop durchgeführt und mit einer Zeiss MC 80 DX-Kamera dokumentiert.

6.1.5 Chromatographische Trennmethode

6.1.5.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

EI-Spektren wurden bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV mit Helium als Trägergas auf folgenden Geräten aufgenommen:

- Thermo-Finnigan Trace MS; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke
- Finnigan MAT Magnum; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke
- Finnigan ITS; GC-Säule: Alltech EC5 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke

6.1.5.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Für die Messungen wurden folgende Geräte verwendet:

- Finnigan LCQ mit APC- und ES-Ionenquelle
- Hewlett Packard 1100 HPLC System mit Diodenarraydetektor

und

- MicroMass Q-TOF micro mit ES- und APC-Ionenquelle
- Water Acquity UPLC System mit 2996 PDA Detektor

Die HPLC-Trennungen unter Normalphasenbedingungen erfolgten auf einer Nucleosil 50-5, CC 125/2 Säule, Partikelgröße 5 µm (Macherey-Nagel) und unter Umkehrphasenbedingungen auf einer Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 125 x 2 mm Säule, Partikelgröße 3 µm (Grom). Alle Säulen wurden mit einer entsprechenden Vorsäule ausgestattet.

Die UPLC-Trennungen wurde auf einer BEH C₁₈ Säule (2,1 x 50 mm), Partikelgröße 1,7 µm (Waters), durchgeführt.

Eluenten Normalphase: Hexan, HPLC grade
 Ethylacetat, HPLC grade

Eluenten Umkehrphase: Acetonitril, HPLC grade
 Wasser, quartzdestilliert

Bei der Umkehrphasenchromatographie mit jeweils 0,5 % (HPLC) bzw. 0,1 % (UPLC) Essigsäure im Eluenten.

6.1.5.3 **Präparative HPLC**

Die präparative Aufreinigung von Proben wurde mit einer Gilson 321 Pumpe in Verbindung mit einem Gilson 115 UV Detektor bzw. einem Waters 600 Controller und einem Waters 2487 Dual λ Absorbance Detektor durchgeführt.

Die Aufreinigung erfolgte unter RP-Bedingungen auf einer LiChroCART 250-10 Purospher STAR RP-18 endcapped Säule mit 5 μ m Korngröße (Merck), die mit einer Vorsäule ausgestattet wurde.

Eluenten: Wasser, quartzdestilliert
 Acetonitril, HPLC grade

Mit jeweils 0,1 % Ameisensäure im Eluenten.

6.1.5.4 **HPLC mit Fluoreszenzdetektion**

Die Untersuchungen wurden auf einem HP 1100 System mit einem Jasco FP-1520 Intelligent Fluorescence Detektor in Verbindung mit einem Varian 4290 Integrator auf einer LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18 Säule mit 5 μ m Korngröße (Merck) durchgeführt. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 330 nm, die Emission wurde bei 450 nm gemessen.

Eluenten: THF/MeOH/0,1 molare Natriumacetatlösung in H₂O (pH = 7,2) (5/95/900)
 MeOH

Detektorparameter:

Response:	3 s
Anregungswellenlänge:	330 nm
Emissionswellenlänge:	450 nm
Gain:	10
Attenuation:	S

Integratorparameter:

Attenuation:	256
Chart Speed:	0,5

6.1.5.5 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm (Merck) verwendet. Die Detektion erfolgte nach UV-Anregung (254 nm und 366 nm) und/oder Anfärbung durch Erhitzen nach Behandlung im Tauchbad mit Molybdätophosphorsäure/Cer(IV)sulfat.

Herstellung des Molybdätophosphorsäure/Cer(IV)sulfat Tauchbades:

2,5 g Molybdätophosphorsäure und 1 g Cer(IV)sulfat wurden in 65 ml Wasser gelöst und es wurden vorsichtig unter Rühren 6 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben.

6.1.5.6 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde an Kieselgel (ICN) oder an Florisil (aktiviertes Magnesiumsilikat, 100-200 mesh, Aktivierungstemperatur 1200°F, Sigma-Aldrich) als Flash-Chromatographie durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel Diethylether, Ethylacetat und Petrolether wurden vor Gebrauch unter Vakuum destilliert.

6.1.5.7 Gelelektrophorese

Die SDS-Gele wurden mit einer OWL Gelgießapparatur hergestellt und die Elektrophorese in einem OWL Doppelgel-Elektrophoresesystem durchgeführt.

Herstellung eines 12 % Acrylamidgels:

Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS-HCl pH = 9,1
0,4 % SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS-HCl pH = 6,8
0,4 % SDS

TEMED-Lösung (0,4 bzw. 2 %ig)

APS-Lösung (10 %ig)

Rotiphorese 40-Lösung (39 % Acrylamid, 1 % bis-Acrylamid)

Für das Trenngel wurden 6 ml Rotiphorese 40-Lösung mit 5 ml Trenngelpuffer und 4 ml destilliertem Wasser gemischt. Unter Rühren wurden 2,5 ml 0,4 %ige TEMED-Lösung als Quervernetzer und 2 ml APS-Lösung als Radikalstarter zugegeben. Etwa 5 ml der Mischung wurden in die Kammer der Gelgießapparatur gefüllt und mit *iso*-Propanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (20 min) wurde das *iso*-Propanol abgegossen und für das Sammelgel 2 ml Rotiphorese 40-Lösung mit 5 ml Sammelgelpuffer und 8 ml Wasser gemischt. Dann wurden unter Rühren 2,5 ml 0,4 %ige TEMED-Lösung und 2 ml APS-Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde dann auf das Trenngel geschichtet und der Kamm für die Taschen eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in ihren Platten aus der Apparatur genommen, in feuchte Tücher eingeschlagen und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank (jedoch nicht länger als 2 Wochen) aufbewahrt.

Herstellung des Ladepuffers:

3 ml Glycerin

0,9 g SDS

3 mg Bromphenolblau

3,75 ml Sammelgelpuffer

mischen und mit destilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen. Der Ladepuffer wurde unverdünnt verwendet.

Herstellung des Proteinstandards:

Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis von Amersham wurde nach Vorschrift verdünnt und vorbereitet.

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase B	97.000 Da
Albumin	66.000 Da
Ovalbumin	45.000 Da
Carbonanhydrase	30.000 Da
Trypsin Inhibitor	20.100 Da
α -Lactalbumin	14.400 Da

Alternativ wurde auch Roti-mark-Standard (Roth) verwendet

Protein	Molekulargewicht
Myosin	200.000 Da
β -Galactosidase	119.000 Da
Serumalbumin	66.000 Da
Ovalbumin	43.000 Da
Carboanhydrase	29.000 Da
Trypsin Inhibitor	20.000 Da
Lysozym	14.500 Da

Laufpuffer:

3 g TRIS

14,4 g Glycin

0,1% SDS

in 1 l destilliertem Wasser lösen.

Herstellung der Coomassie Blau Färbelösung

Eine wässrige Lösung aus 0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 40 % Methanol und 7 % Essigsäure wurde für eine Stunde gerührt.

Herstellung der Coomassie Blau Entfärbelösung:

Hierfür wurde eine wässrige Lösung mit 30 % Methanol und 10 % Essigsäure (10) hergestellt.

6.2 Kulturbedingungen der Versuchsorganismen

6.2.1 Herstellung von künstlichem Seewasser

6.2.1.1 Herstellung von künstlichem Seewasser mit Instant Ocean

Für 5 l künstliches Seewasser wurden 165 g Instant Ocean (Aquarium Systems) in 5 l entionisiertem Wasser so lange gerührt, bis das Salz vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1,1 ml Lösung 3 und 2,95 ml Lösung 4 (siehe unten) wurde das Medium nach Temperaturgleich an die Kulturbedingungen verwendet.

6.2.1.2 Herstellung von künstlichem Seewasser nach Maier und Calenberg^[168]

Für 5 l Seewasser wurden 120 g NaCl, 40 g MgSO₄ x 7 H₂O, 3,75 g KCl, 7,5 g CaCl₂ x 2 H₂O, 6 g HEPES und 200 mg NaHCO₃ in ein 5 l Becherglas eingewogen und in ca. 4,5 l quartzdestilliertem Wasser gelöst. Dazu wurden folgende, mit quartzdestilliertem Wasser hergestellte, Lösungen gegeben:

Lösung 3	1,1 ml	K ₂ HPO ₄	1,79 g/200 ml
Lösung 4	2,45 ml	NaNO ₃	17,9 g/200 ml
Lösung 11	50 ml	Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O mit HCl auf pH = 3 eingestellt	3,5 g/500 ml
Lösung 16	5 ml	Na ₂ -Glycerophosphat x 5 H ₂ O	12 g/500 ml
Lösung 17	5 ml	AlCl ₃ x 6 H ₂ O	60,5 mg/500 ml
		KI	83 mg/500 ml
		RbCl	90 mg/500 ml
		LiCl	530 mg/500 ml
		SrCl x 6 H ₂ O	13,35 mg/500 ml
		KBr	29,76 mg/500 ml
		vor dem Auffüllen mit 10 M NaOH auf pH = 10-12 eingestellt	

Lösung 19	5 ml	Thiamin HCl	50 mg/500 ml
		Biotin (Vitamin H)	0,5 mg/500 ml
		Cyanocobalmin (Vitamin B12)	0,5 mg/500 ml
		Nicotinsäureamid	0,1 mg/500 ml

Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,8 eingestellt und die gelösten Salze mit quartzdestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt; das Seewasser in autoklavierbare 1-Liter-Flaschen überführt und 20 min bei 121°C (mit Medienfühler) autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde je 1 ml der separat autoklavierten Lösung 18 zugegeben.

Lösung 18	1 ml	Na ₂ EDTA	18,61 g/500 ml
		(NH ₄)Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	4,9 g/500 ml
		H ₃ BO ₃	3,09 g/500 ml
		MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,99 g/500 ml
		ZnCl ₂	0,68 g/500 ml
		Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,24 g/500 ml
		CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg/500 ml
		CoCl ₂ x 6 H ₂ O	12 mg/500 ml
		NaVO ₃	6 mg/500 ml
		Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	1,3 mg/500 ml

Alle Lösungen werden mit der angegebenen Menge quartzdestilliertem Wasser angesetzt.

6.2.2 Kultivierung von *C. taxifolia*

6.2.2.1 In Aquarienkulturen

Frische *C. taxifolia* wurden in Villefranche-sur-mer gesammelt und per Express nach Jena geschickt. Kulturen aus Aquarienhaltung wurden von Aqua Marine Senior, Berlin oder KN Aquaristik, Nordhorn bezogen. Sie wurden in belüftete Aquarien überführt, die je nach Größe 5-15 l künstliches Seewasser enthielten. Die Aquarien wurden mit einer Photoperiode 14 h Licht / 10 h Dunkelheit beleuchtet und bei einer Außentemperatur von 23-25°C gehalten.

14-tägig wurden die kompletten Kulturen gewechselt und in ein sauberes Aquarium mit frischem, temperiertem, künstlichem Seewasser (Instant Ocean) überführt. Bei Bedarf wurden die Algen vorher mechanisch von äußeren Kontaminationen gesäubert.

6.2.2.2 In unialgalen Kulturen

Eine unialgale *C. taxifolia* Kultur wurde aus Bruchstücken des Mittelmeerisolats von Prof. Müller in Konstanz hergestellt (D.G. Müller, persönliche Mitteilung). Die Algen wurden in stehender Kultur in 250 ml Glasschalen bei einer Temperatur von 20-23°C mit einer Photoperiode 14 h Licht / 10 h Dunkelheit gehalten. Alle zwei Wochen wurden die Thalli zur Vermeidung von Kontaminationen unter der Sterilbank in ein frisches Seewassermedium nach Maier und Calenberg (Kapitel 6.2.1.2 Herstellung von künstlichem Seewasser nach Maier und Calenberg) umgesetzt. Die benötigten Glasschalen wurden vor Gebrauch hitzesterilisiert (ca. 5 h bei 220°C). Skalpell und Pinzette wurden durch Abflammen mit Ethanol sterilisiert.

6.2.3 Haltung der Flohkrebse

Die Flohkrebsarten *Elasmopus levis*, *Dulichella* spp. und *Paracereis caudata* wurden vom Institute of Marine Science in Morehead City, North Carolina USA, per Luftfracht verschickt und im Labor in künstliches Seewasser bei ca. 20°C überführt. Bei einer Photoperiode von 14 h Licht / 10 h Dunkelheit wurden die Krebse jeden zweiten Tag in ein Aquarium mit frischem Seewasser überführt.

6.3 Isolierung von Caulerpenin (17) aus *C. taxifolia*

Die Isolierung und Aufreinigung wurde nach folgendem Protokoll, welches auf der Dissertation von V. Jung^[60] basiert, durchgeführt.

Die Alge wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend fein gemörsert. In noch gefrorenem Zustand wurden die Fragmente in Ethylacetat (ca. 2 ml pro g Alge) suspendiert und unter Rühren 1 Stunde extrahiert. Anschließend wurden die Algenfragmente durch Zentrifugation (2 min bei 5200 g) abgetrennt. Die Fragmente wurden dann noch einmal mit der gleichen Menge Ethylacetat gemäß demselben Protokoll extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Entfernung von Fettsäuren mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung 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. Das so erhaltene Rohprodukt wurde dann nochmals an Florisil mit Petrolether/Diethylether 8/2 gesäult, um die noch enthaltene Sterole zu entfernen. Nach der Elution der Sterole wurde mit Petrolether/Diethylether 5/5 weiter eluiert, um reines Caulerpenin (17) zu gewinnen.

6.4 Verletzungsaktivierte Prozesse bei *C. taxifolia*

6.4.1 Mikroskopische Experimente

6.4.1.1 Stereomikroskopie

Zur Untersuchung der Verwundungsreaktion von *C. taxifolia* auf der Ebene des gesamten Organismus wurde die Alge in künstlichem Seewasser oder in künstlichem Seewasser, welches 100 mg/ml Lysin enthielt, mit einer Rasierklinge verwundet. In definierten Zeitabständen wurden Aufnahmen gemacht, um die Wundreaktion zu dokumentieren.

6.4.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Von dem fluoreszenzmarkierten Protein Alexa Fluor Histon H1 wurde eine wässrige Stammlösung von 10 mg/ml hergestellt. Von dieser Stammlösung wurden 2 µl auf 1 ml künstliches Seewasser gegeben und die Alge in dieser Lösung mit einer Rasierklinge verletzt. 1 h (Epifluoreszenzmikroskopie) bzw. 16 h (konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie) nach dieser Verletzung wurde die Alge mit entionisiertem Wasser gewaschen und mikroskopisch untersucht.

6.4.2 pH-Wertbestimmung in *C. taxifolia*

Zur Überprüfung des pH-Werts wurden verwundete Algen oder Algen, deren Enzymaktivität durch 2-minütiges Kochen deaktiviert wurde, verwendet. Beide wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, abgetrocknet und dann nach Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Nachdem die Probe Raumtemperatur erreicht hatte (15 min) wurde der pH-Wert direkt mittels pH-Meter bestimmt.

Pro Behandlung wurden drei voneinander unabhängige Proben vermessen.

Probennummer	pH-Wert intakte <i>C. taxifolia</i>	pH-Wert verwundete <i>C. taxifolia</i>
1	7,0	4,8
2	7,1	5,0
3	7,2	4,8
Mittelwert	7,1	4,9
Standardabweichung	0,1	0,1

6.4.3 Gelelektrophorese

10-100 mg intakte (für 1 min gekochte) oder unbehandelte *C. taxifolia* wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 5 min gemörsert. Bei der Zugabe von Lysin (**64**) bzw. Cystein (**73**) wurden 0,2 µl einer 1 molaren Lösung der entsprechenden Aminosäure vor der Zerstörung des Algengewebes zugegeben. Zur Applikation des fluoreszent markierten Histons wurden 0,05 µl einer 10 mg/ml wässrigen Lösung pro mg Algengewicht vor der Zerstörung des Gewebes zugegeben. Nach dem Mörsern wurden ca. 40 µl mit einer Pipette entnommen, in ein ausgewogenes 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die exakte Einwaage der Probe bestimmt. Für eine Einwaage von 40 mg wurden dann 40 µl Ladepuffer und 12 µl 0,2 molarer DTT-Lösung zugegeben und mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 120 µl aufgefüllt, kräftig geschüttelt und die Probe für 1 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf das Gel bei -20°C gelagert, vor dem Laden durch erneutes Erhitzen für 1 min im siedenden Wasserbad aufgetaut und anschließend für 10 min im Ultraschallbad behandelt, um eventuell vorliegende wasserunlösliche Polymere zu suspendieren.

Es wurden jeweils 15 µl der Proben auf das Gel geladen, wenn die Algeneinwaage 40 mg betrug, bei abweichender Probeneinwaage wurde die Zugabe angepasst, so dass jeweils der gleiche Gehalt an Probe im Gel vorlag. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bis zum Erreichen des Trenngels mit 80 V, dann mit 150 V durchgeführt. Das Gel wurde bei Verwendung des fluoreszenten Proteins mit einem Gelscanner bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm gescannt. Alle Gele wurden über Nacht mit Coomassie Blau Färbelösung angefärbt und mit Coomassie Blau Entfärbelösung über einen Zeitraum von 1-2 h partiell wieder entfärbt. Nach dem Waschen mit entionisiertem Wasser wurden die Gele gescannt und anschließend getrocknet.

6.4.4 Untersuchungen zur Caulerpeninumwandlung

6.4.4.1 Caulerpeninumwandlung in Gegenwart von Lysin (**64**) / Cystein (**73**)

Fragmente von intakter oder verwundeter *C. taxifolia* (100-400 mg) wurden in einem Eppendorfgefäß nach Zugabe von 0,2 µl entionisiertem Wasser oder Aminosäurelösungen (100 mg Lysin (**64**) pro ml Wasser oder 100 mg Cystein (**73**) pro ml Wasser) pro mg Alge gemörsert, um die Verwundung zu simulieren. In definierten Zeitintervallen wurde die Alge dann mit Dichlormethan (120 µl pro 100 mg Alge (0,1 mg 4'-Methoxyacetophenon pro ml Dichlormethan)) durch 30-sekündiges, kräftiges

Schütteln extrahiert. Der Algenrückstand wurde durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 g) von der organische Phase getrennt und von dieser 10 µl direkt per GC/MS vermessen. Um die Caulerpeninkonzentration der intakten Alge zu bestimmen, wurde diese vor der Extraktion 2 min lang in kochendem Wasser behandelt. Die Integration von Caulerpenin (**17**) wurde bei $m/z = 212,5-214,5$ $[M-2 \text{ CH}_3\text{COOH} -\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$ relativ zum internen Standard 4'-Methoxyacetophenon bei $m/z = 135$ $[M-\text{CH}_3]^+$ durchgeführt. Die Flächen der Massenspur von Caulerpenin (**17**) sind relativ zum internen Standard angegeben. Pro Behandlung wurden fünf voneinander unabhängige Proben vermessen. GC-Programm: 100°C (2 min) – 280°C (20°C/min) – 280°C (4 min).

6.4.4.2 Quantifizierung von Caulerpenin (**17**) und Oxytoxin 2 (**46**)

Um den Gehalt an Caulerpenin (**17**) und Oxytoxin 2 (**46**) in *C. taxifolia* zu untersuchen, wurden Algenfragmente mit einem Gewicht von 250-550 mg in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einem Pistill zerstört. Der ursprüngliche Gehalt an Caulerpenin (**17**) wurde nach Zugabe von 0,33 µl 1 molarer HCl pro mg Alge vor der Verwendung bestimmt. In definierten Zeitintervallen wurden die Algenproben mit 0,25 ml Hexan (mit 20 µg *trans*-Stilben pro ml Hexan als internem Standard) pro g Alge durch 5-sekündiges, kräftiges Schütteln extrahiert, die Probe zur Phasentrennung 15 s bei 12.000 g zentrifugiert und die organische Phase umgehend mit NP-HPLC/APCI-MS analysiert. Der Gehalt von Oxytoxin 2 (**46**) wurde dabei durch die Quantifizierung von dessen Halbacetal **48** bestimmt. Zur Integration der Peaks wurde für das deacetylierte Produkt **48** die Ionenspur von $m/z = 231-232$ $[M+H]^+$ und $m/z = 255-256$ $[M+H -2 \text{ HOAc}]^+$ für Caulerpenin (**17**) verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Stärke dieser SIM-Signale wurden diese ins Verhältnis zum Basepeak $m/z = 50-376$ gesetzt, um eine vergleichbare relative Intensität zu erhalten. Die Messergebnisse wurden durch Integration des internen Standards im UV bei 296 +/- 4 nm normiert. Aufgrund der hohen Reaktivität der Deacetylierungsprodukte **46** und **48** konnten keine absoluten Gehalte bestimmt werden, da keine Standards zur Verfügung standen. Pro Messpunkt wurden drei voneinander unabhängige Messwerte ermittelt.

NP-HPLC Parameter:

Eluenten: Hexan (A)
Ethylacetat (B)

Flussrate: 0,5 ml/min

Zeit	% B
0 min	0
0-10 min	0-20
10-10,5 min	20-0
10,5-15 min	0

APCI-MS Parameter:

Vaporizer temperature: 450°C
Sheath gas flow: 25 arb
Auxilliary gas flow: 6 arb
Discharge current: 5 µA
Capillary temperature: 150°C
Capillary voltage: 13 V
Tube lens offset: 25 V

6.4.4.3 Verwundung von *C. taxifolia* in Gegenwart von Lysin (64) / Cystein (73)

100-400 mg schwere Fragmente von *C. taxifolia* wurden mit 0,1 µl Cystein- bzw. Lysinlösung (100 mg pro ml H₂O) pro mg Alge in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt und die Alge durch 5-minütiges Mörsern zerstört. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (1 min bei 13.000 g) und der wässrige Überstand direkt per LC/MS analysiert.

6.5 Modellreaktionen

6.5.1 Reaktion von Caulerpenin (17) mit Aminosäuren in Gegenwart einer Esterase

Zur Untersuchung der Quervernetzungseigenschaften verschiedener Aminosäuren wurden deren Stammlösungen (68,4 µmol Lysin (64)/ml Wasser bzw. 82,5 µmol Cystein (73)/ml Wasser) mit 10 mmol/l TRIS/TFA-Puffer, pH = 7,5 auf einen Gehalt von 4 µmol Lysin (64)/ml und 4 µmol Cystein (73)/ml verdünnt. Dieser Lösung wurde dann

Caulerpenin (**17**) (26,7 $\mu\text{mol/ml}$ MeOH) in einem Gehalt von 3 $\mu\text{mol/ml}$ zugesetzt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 mg Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U/g, Sigma-Aldrich) pro mg Caulerpenin (**17**). Diese Reaktionsmischung wurde anschließend für 1 h kräftig geschüttelt, die Esterase per Zentrifugation (2 min bei 16.200 g) abgetrennt und die überstehende Pufferlösung direkt per RP-HPLC/ESI-MS vermessen.

RP-HPLC Parameter:

Eluenten: 0,1 % Essigsäure in Wasser (A)
0,1 % Essigsäure in Acetonitril (B)

Flussrate: 0,2 ml/min

Zeit	% B
0 min	0
0-2 min	0
2-32 min	0-100
32-42 min	100
42-43 min	100-0
43-53 min	0

APCI-MS Parameter:

Vaporizer temperature: 470°C
Sheath gas flow: 50 arb
Auxilliary gas flow: 15 arb
Discharge current: 4 μA
Capillary temperature: 150°C
Capillary voltage: 33 V
Tube lens offset: 10 V

6.5.2 Reaktion von Caulerpenin (**17**) mit einem Oligopeptid in Gegenwart einer Esterase

Für die Untersuchung des Quervernetzungsverhaltens wurde eine Stammlösung des Oligopeptids $\text{NH}_2\text{-Ala-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Gly-COOH}$ x TFA (Iris Biotech, 12,7 $\mu\text{mol/ml}$ Wasser) mit 100 mmol/l TRIS/TFA-Puffer, pH = 7,5 auf einen Gehalt von 1 $\mu\text{mol/ml}$ verdünnt. Dieser Lösung wurde Caulerpenin (**17**) (10 mg/ml MeOH) bis zu einem Gehalt von 6 $\mu\text{mol/ml}$ zugesetzt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 mg

Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U/g, Sigma-Aldrich) pro mg Caulerpenin (**17**). Diese Reaktionsmischung wurde anschließend für 1 h kräftig geschüttelt, die Esterase per Zentrifugation (2 min bei 16.200 g) abgetrennt und die überstehende Pufferlösung direkt per RP-HPLC/ESI-MS vermessen.

HPLC Parameter:

Siehe Kapitel 6.5.1 Reaktion von Caulerpenin (**17**) mit Aminosäuren in Gegenwart einer Esterase

ESI-MS Parameter:

Sheath gas flow:	50 arb
Auxilliary gas flow:	15 arb
Spray voltage:	7 kV
Capillary temperature:	200°C
Capillary voltage:	6 V
Tube lens offset:	40 V

6.5.3 Reaktion von Caulerpenin (17**) mit Myoglobin in Gegenwart einer Esterase**

Für die Untersuchung des Quervernetzungsverhaltens wurde eine Stammlösung von Myoglobin (Sigma-Aldrich, 0,6 µmol/ml Wasser) mit 100 mmol/l TRIS/TFA-Puffer, pH = 7,5 auf einen Gehalt von 0,1 µmol/ml verdünnt. Dieser Lösung wurde Caulerpenin (**17**) (10 mg/ml MeOH) bis zu einem Gehalt von 0,5 µmol/ml zugesetzt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 mg Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U/g, Sigma-Aldrich) pro mg Caulerpenin (**17**). Diese Reaktionsmischung wurde anschließend für 1 h kräftig geschüttelt, die Esterase per Zentrifugation (2 min bei 16.200 g) abgetrennt und die überstehende Pufferlösung direkt per Maldi-ToF vermessen.

6.5.4 Synthese und Aufreinigung von 62

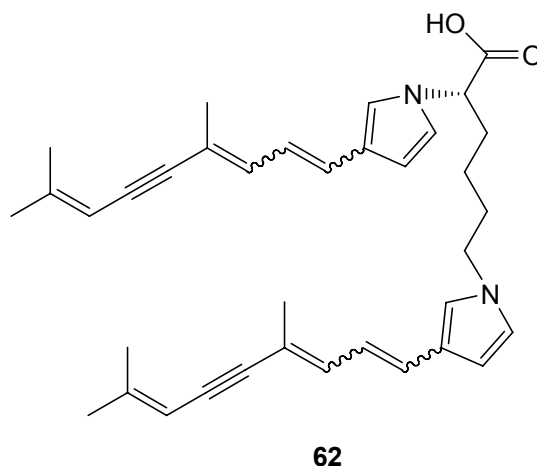


Abbildung 6-1: di-Kondensationsprodukt **62** aus Oxytoxin 2 (**46**) und Lysin (**64**)

22,4 mg Caulerpenin (**17**) (10 mg pro ml MeOH) wurden mit 2,24 g Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U/g, Sigma-Aldrich) in 14,8 ml 10 mM TRIS/TFA-Puffer, pH = 7,5 in Gegenwart von 29,2 mg Lysin (10 mg/ml Wasser) umgesetzt. Die Suspension wurde bei RT für 1 h heftig geschüttelt, anschließend erfolgte die Abtrennung der Esterase durch Filtration. Die immobilisierte Esterase wurde dann mit Methanol ausgewaschen. Das methanolische Extrakt und die wässrige Pufferlösung wurden direkt mit RP-HPLC/APCI-MS (Parameter: siehe Kapitel 6.5.1 Reaktion von Caulerpenin (**17**) mit Aminosäuren in Gegenwart einer Esterase) analysiert. Die vereinigten Phasen wurden dann im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand im Methanol gelöst und mittels präparativer RP-HPLC aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 340 nm. Das gewünschte Produkt wurde dann durch Gefriertrocknung aus den vereinigten Fraktionen isoliert.

HPLC Parameter:

Eluenten: 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A)
0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B)

Injektionsvolumen 2 ml; Fluss = 6,6 ml/min

Zeit	% B
0-2 min	0
2-12 min	0-90
12-15min	90
15-20 min	90-100
20-25 min	100
25-26 min	100-0
26-31min	0

Hochaufgelöstes ESI-MS: $m/z = 533,3171 [M-H]^-$; berechnet $C_{36}H_{41}N_2O_2$ $m/z = 533,3163$

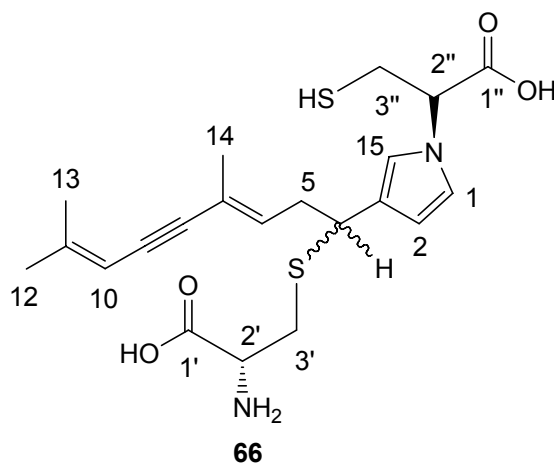
6.5.5 Synthese und Aufreinigung von 66

Abbildung 6-2: Quervernetzungsprodukt **66** aus Oxytoxin 2 (**46**) und Cystein (**73**)

28 mg Caulerpenin (**17**) (10 mg pro ml MeOH) wurden mit 2,8 g Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U/g, Sigma-Aldrich) in 16,1 ml 100 mM TRIS/TFA-Puffer, pH = 7,5 in Gegenwart von 60,6 mg Cystein (**73**) (10 mg/ml Wasser) umgesetzt. Die Suspension wurde für 1 h bei RT heftig geschüttelt, anschließend erfolgte die Abtrennung der Esterase durch Filtration. Der Überstand wurde mit RP-HPLC/APCI-MS

(Parameter: siehe Kapitel 6.5.1 Reaktion von Caulerpenin (**17**) mit Aminosäuren in Gegenwart einer Esterase) analysiert und mittels präparativer RP-HPLC aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 340 nm. Das gewünschte Produkt wurde durch Gefriertrocknung aus den vereinigten Fraktionen isoliert.

HPLC Parameter:

Eluenten: 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A)
0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B)

Injektionsvolumen 2 ml; Fluss = 6,25 ml/min

Zeit	% B
0-20 min	20-60
20-24 min	60-100
24-25 min	100-20
25-35 min	20

Daten für das überwiegende Diastereomer des ersten Quervernetzungsprodukts:

^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): δ = 1,29 (s, 3H, H-C14); 1,79 (s, 3H, H-C12); 1,84 (s, 3H, H-C13); 2,66 (2H, H-C5 Überlagerung mit dem in geringeren Mengen auftretenden Diastereomer (ÜD)); 2,85 (dd J = 15,0; 4,1 1H H-C3'b); 3,15 (2H, H-C3'', ÜD); 3,24 (dd J = 15,0; 5,6 1H H-C3'a); 3,60 (dd J = 5,6, 4,1; 1H H-C2'); 3,85 (dd J = 7,4; 7,4 1H H-C4); 4,57 (m, 1H, H-C2'', ÜD); 5,31 (s, 1H H-C10); 5,74 (m, 1H H-C6, ÜD); 6,17 (m, 1H H-C2, ÜD); 6,82 (m, 1H H-C1, ÜD); 6,87 (m, 1H H-C15, ÜD).

^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): δ = 18,3 (C14); 21,3 (C13); 25,1 (C12); 28,0 (C3''); 32,8 (C3'); 36,0 (C5); 45,3 (C4); 55,2 (C2'); 68,2 (C2''); 85,7 (C9); 95,8 (C8); 106,5 (C2); 106,9 (C10); 120,4 (C15); 121,3 (C7); 125,1 (C1); 127,1 (C3); 134,7 (C6); 148,8 (C11); 172,5 (C1'); 175,4 (C1''). Die chemischen Verschiebungen wurden mittels HMBC- und HMQC-Korrelation zugeordnet, die Spinsysteme H(C1)-H(C2), H(C4)-H(C6), H(C2')-H(C3') und H(C2'')-H(C3'') konnten in H-H-COSY-Experimenten nachvollzogen werden.

Hochaufgelöstes ESI-MS: m/z = 437,1583 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_4$
 m/z = 437,1569 Da

6.6 Aminosäureanalytik

6.6.1 Aminosäureanalytik nach Hydrolyse mit HCl

in Anlehnung an Lindroth und Mopper^[137]

sowie Jones und Gilligan^[138]

Derivatisierungsreagenz:

50 mg *ortho*-Phthaldialdehyd (**69**) wurden in 1,25 ml reinem MeOH gelöst, dann erfolgte die Zugabe von 50 µl Mercaptoethanol (**70**) und 11,2 ml Boratpuffer (0,4 M, pH = 9,5) und 0,8 mg/ml Polyoxyethylenlaurylether. Diese Lösung ist eine Woche bei 4°C stabil.

Probenbehandlung:

Zu 100 mg frischer oder gekochter Alge wurden 100 µl konzentrierte Salzsäure (37%, 12 M) geben und 22 h lang bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe im Hochvakuum getrocknet, der Rückstand in 1 µl Wasser pro mg Alge aufgenommen, 20 s kräftig geschüttelt, und unlösliche Anteile mittels Zentrifugation (2 min bei 16.200 g) abgetrennt. Die so erhaltene Lösung wurde 1:100 mit entionisiertem Wasser verdünnt und mit 1 µl Ethanolaminlösung (10 nmol/ml) als Retentionszeitmarker gemischt. Von der so erhaltenen Probe wurden 5 µl abgenommen, mit 5 µl Derivatisierungsreagenz versetzt und nach 1 min Reaktionszeit 150 µl 0,1 molarer Natriumacetatpuffer (pH = 7,0) zugeben. Sofort danach wurden 20 µl dieser Lösung auf die HPLC aufgegeben. Pro Behandlung wurden fünf voneinander unabhängige Werte ermittelt. Der Gehalt der einzelnen Aminosäuren wurde relativ zu Alanin angegeben.

Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte gemäß den Retentionszeiten der reinen derivatisierten Aminosäuren:

Elutionsreihenfolge	Aminosäure	Retentionszeit [min]
1	Asparaginsäure (Asp)	5,25
2	Glutaminsäure (Glu)	6,05
3	Asparagin (2) (Asn)	8,04
4	Serin (Ser)	9,98
5	Glutamin (Gln)	10,79
6	Histidin (His)	11,37
7	Glycin (Gly)	15,25
8	Threonin (Thr)	15,45
9	Arginin (Arg)	16,58
10	Alanin (Ala)	25,93
11	Tyrosin (Tyr)	29,70
12	Ethanolamin (RT-Marker)	35,59
13	Methionin (Met)	40,87
14	Tryptophan (Trp)	42,77
15	Valin (Val)	43,49
16	Phenylalanin (Phe)	44,42
17	Isoleucin (Ile)	45,61
18	Leucin (Leu)	46,05
19	Lysin (64) (Lys)	49,22

HPLC Parameter:

Eluenten: THF/MeOH/0,1 M Natriumacetat in H₂O (pH 7,2) (5/95/900) (A)
MeOH (B)

Flussrate: 1 ml/min

Zeit	% B
0 min	0
0-2 min	0-25
2-24 min	25
24-30 min	25-40
30-38 min	40
38-42 min	40-65
42-52 min	65
52-54 min	65-100
54-60 min	100
60-61 min	100-0
61-71 min	0

6.6.2 Aminosäureanalytik nach Oxidation mit Perameisensäure (75) und anschließender Hydrolyse mit HCl in Anlehnung an Lindroth und Mopper^[137], Jones und Gilligan^[138] sowie Hirs^[144]

Zur Bestimmung von Cystein (**73**) als Cysteinsäure (**76**) wurde ein Oxidationsreagenz aus 100 µl H₂O₂ (**4**) und 1,9 ml Ameisensäure angesetzt, welches 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde.^[144]

Die Alge wurde in 100 %iger Ameisensäure suspendiert (1 ml pro 100 mg Alge), auf 0°C eingekühlt, mit dem Oxidationsreagenz (2 ml pro 100 mg Alge) gemischt und bei 0°C für 2,5 h stehen gelassen. Danach wurde die Probe in Wasser aufgenommen (40 ml pro 100 mg Alge), eingefroren und durch Gefriertrocknung bis zur Trockne eindampft.

Die so behandelte Probe wurde in Wasser aufgenommen (90 µl pro 100 mg Alge) und dem oben ausgeführten Salzsäurehydrolyseprotokoll (siehe Kapitel 6.6.1 Aminosäureanalytik nach Hydrolyse mit HCl) unterzogen. Die so erhaltene Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt, nach dem beschriebenen Protokoll derivatisiert und auf die HPLC aufgegeben.

HPLC Parameter:

Eluenten: THF/ MeOH/0,1 M Natriumacetat in H₂O (pH 7,2) (5/95/900) (A)
MeOH (B)

Flussrate: 1 ml/min

Zeit	% B
0 min	0
0-2 min	0-10
2-4 min	10
4-28 min	10-25
28-50 min	25
50-56 min	25-40
56-64 min	40
64-68 min	40-65
68-78 min	65
78-80 min	65-100
80-86 min	100
86-87 min	100-0
87-97 min	0

Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte gemäß den Retentionszeiten der reinen oxidierten und derivatisierten Aminosäuren:

Elutionsreihenfolge	Aminosäure	Retentionszeit [min]
1	Cysteinsäure (76)	9,40
2	Asparaginsäure (Asp)	10,20
3	Glutaminsäure (Glu)	15,97
4	Asparagin (2) (Asn)	27,46
5	Methionin oxidiert	41,80
6	Alanin (Ala)	58,41
7	Ethanolamin (RT-Marker)	67,78

6.7 Bioassays

6.7.1 Herstellung des künstlichen Futters

Um ein homogenes Futter für die Durchführung der Bioassays zu erhalten, wurde jeweils ein standardisiertes Futter aus gefriergetrockneten Algen hergestellt. Zur Herstellung von Futter mit intakter *C. taxifolia* wurde die enzymatische Aktivität der Alge durch 2-minütiges Kochen ausgeschaltet. Zur Simulation der Verwundung wurde die Alge 5 min gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Als Kontrollfutter diente gefriergetrocknete *Ulva* spp. Zur Herstellung des künstlichen Futters wurden 72 mg Agar-Agar (Fluka) mit 2 ml Wasser vermischt und in einer Mikrowelle für ca. 30 s erhitzt, bis die homogene Lösung aufkochte. Zu dieser Mischung wurden 200 mg getrocknete Alge, welche vorher in 1,6 ml Wasser suspendiert wurden, gegeben und gut vermischt. Die so erhaltene Masse wurde in eine 8 x 8 cm große und 0,5 cm tiefe Wägeschale gegossen und erkalten lassen. Anschließend wurden daraus mit einer Rasierklinge ca. 0,6 cm² große Stücke geschnitten. In jeweils einen Eiswürfelbehälter (Volumen 20 ml) wurde eine Amphipode der Art *E. levis*, *Dulichella* spp. oder *P. caudata* gegeben und anschließend je ein Stück des künstlich hergestellten Futters (behandelt und Kontrolle) zugefügt. Bei diesem Versuchsaufbau wurde dann für 90 min im Abstand von 5 min der Aufenthaltsort (Kontrollalge, behandelte Alge oder keine von beiden) der Amphipode bestimmt.

6.7.2 Untersuchung der Präferenz der Versuchsorganismen für mit *C. taxifolia* bzw. mit *Ulva* spp. zubereitetem Futter

In einem ersten Experiment wurde mit jeweils 12 Individuen jeder Art getestet, ob künstliches Futter auf der Basis von *Ulva* spp. gegenüber dem aus intakter *C. taxifolia* von verschiedenen Flohkrebsarten (*Dulichella* spp., *E. levis*, *P. caudata*) bevorzugt wurde.

Ergebnis *Dulichella* spp.

Aufenthaltshäufigkeit von *Dulichella* spp. auf der entsprechenden künstlichen Nahrung:

Ulva spp.: Mittelwert = 2,08 Standardabweichung = 3,73

C. taxifolia intakt: Mittelwert = 8,25 Standardabweichung = 7,10

Die Signifikanz der erhaltenen Resultate wurde mit dem Wilcoxon-matched pairs signed-ranks test bestimmt. Für 12 Testorganismen beträgt der kritische Wert für $p = 0,1$ bei einer beidseitigen Verteilung 17.^[169] Da der für dieses Experiment ermittelte Wert bei 64 lag und damit größer war als der kritische Wert, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

Ergebnis *E. levis*

Aufenthaltshäufigkeit von *E. levis* auf der entsprechenden künstlichen Nahrung:

Ulva spp.: Mittelwert = 5,5 Standardabweichung = 7,51

C. taxifolia intakt: Mittelwert = 9 Standardabweichung = 7,3

Die Signifikanz der erhaltenen Resultate wurde mit dem Wilcoxon-matched pairs signed-ranks test bestimmt. Für 11 Testorganismen beträgt der kritische Wert für $p = 0,1$ bei einer beidseitigen Verteilung 14.^[169] Da der für dieses Experiment ermittelte Wert bei 43 lag und damit größer war als der kritische Wert, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

Ergebnis *P. caudata*

Aufenthaltshäufigkeit von *P. caudata* auf der entsprechenden künstlichen Nahrung:

Ulva spp.: Mittelwert = 11,5 Standardabweichung = 8,35

C. taxifolia intakt: Mittelwert = 4,5 Standardabweichung = 7,95

Die Signifikanz der erhaltenen Resultate wurde mit dem Wilcoxon-matched pairs signed-ranks test bestimmt. Für eine Probenmenge von 12 Testorganismen beträgt der kritische Wert für $p = 0,1$ bei einer beidseitigen Verteilung 24,5.^[169] Da der für dieses Experiment ermittelte Wert bei 43 lag und damit größer ist als der kritische Wert, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

6.7.3 Bevorzugung von intakter oder verwundeter *C. taxifolia* durch *E. levis*

In diesem Experiment wurde an dem Testorganismus *E. levis* getestet, ob künstliches Futter aus verwundeter oder intakter *C. taxifolia* bevorzugt befressen wurden.

Ergebnis

Aufenthaltshäufigkeit der Amphipoden auf dem entsprechenden künstlichen Futter:

C. taxifolia intakt: Mittelwert = 9,14 Standardabweichung = 7,27

C. taxifolia verwundet: Mittelwert = 2,36 Standardabweichung = 5,19

Die Signifikanz der erhaltenen Resultate wurde mit dem Wilcoxon-matched pairs signed-ranks test bestimmt. Für 31 Testorganismen beträgt der kritische Wert für $p = 0,01$ bei einer beidseitigen Verteilung 118.^[169] Da der für dieses Experiment ermittelte Wert bei 85,5 lag und damit kleiner war als der kritische Wert, ist dieses Ergebnis signifikant.

6.7.4 Einfluss von Caulerpenin (17) auf *E. levis*

In diesem Experiment wurde überprüft, ob Caulerpenin (17), welches in einem Gehalt von 0,5 %w/w (10 mg/ml MeOH) dem Kontrollfutter auf der Basis von *Ulva* spp. zugesetzt wurde, das Fraßverhalten von *E. levis* beeinflusst.

Aufenthaltshäufigkeit der Amphipoden auf dem entsprechenden künstlichen Futter:

Ulva spp.: Mittelwert = 4,48 Standardabweichung = 5,31

Ulva spp. +
Caulerpenin (17): Mittelwert = 4,67 Standardabweichung = 6,28

Die Signifikanz der erhaltenen Resultate wurde mit dem Wilcoxon-matched pairs signed-ranks test bestimmt. Für eine Probenmenge von 29 Testorganismen beträgt der kritische Wert für $p = 0,1$ bei einer beidseitigen Verteilung 141.^[169] Da der für dieses Experiment ermittelte Wert bei 214 lag und damit größer war als der kritische Wert, ist diese Ergebnis nicht signifikant.

6.8 Chemische Synthesen

6.8.1 Herstellung von [3,4-²H₂]-(*Z*)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-hex-3-en-6-ol (**d₂-88**)

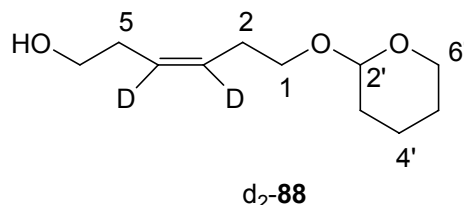


Abbildung 6-3: Herstellung von [3,4-²H₂]-(*Z*)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hex-3-en-6-ol (**d₂-88**)

2,5 g (10,1 mmol) Ni(OAc)₄ × 4 H₂O wurden in 81 ml Ethanol (95 %vol) suspendiert, der Reaktionskolben mit Deuterium gespült und anschließend unter Deuteriumatmosphäre gehalten. Dann erfolgte die Zugabe von 382 mg (10,1 mmol) NaBH₄ in 10 ml Ethanol (95 %vol). Nachdem die Reaktionsmischung 1 min bei Raumtemperatur gehalten wurde, erfolgte die Zugabe von 2 ml (30,3 mmol) Ethylendiamin, Zu dieser Katalysatormischung wurden 16 g (80,7 mmol) 1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-hex-3-en-6-ol (**87**) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht unter Deuteriumatmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (GC-Kontrolle) wurde über Celite filtriert, die Reaktionsmischung mit Wasser verdünnt und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Silicagel aufgereinigt.

Es wurden 13,4 g (66,2 mmol) [3,4-²H₂]-(*Z*)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-hex-3-en-6-ol (**d₂-88**) erhalten; das entspricht einer Ausbeute von 82,1 %.

¹H-NMR (400 MHz, [²H₈-THF]): δ = 1,40-1,65 (m, 5H, H-C2', 2H-C3', 2H-C4'); 1,75-1,85 (m, 1H, H-C2'); 2,24 (t, *J* = 6,42 Hz, 2H, H-C5); 2,32 (t, *J* = 6,79 Hz, 2H, H-C2); 3,28-3,45 (m, 2H, H-C1); 3,45-3,52 (m, 2H, H-C5'); 3,58 (s, 1H, -OH); 3,63-3,82 (m, 2H, H-C6); 4,55 (t, *J* = 3,21 Hz, 1H, H-C1')

¹³C-NMR (100 MHz, [²H₈-THF]): δ = 20,16 (C2); 26,64 (C4'); 28,85 (C5'); 31,55 (C5); 32,14 (C3'); 62,00 (C6'); 62,46 (C6); 67,46 (C1, überlagert mit [²H₈-THF]); 99,03 (C2'); 128,05 (t, *J* = 24 Hz, C4); 128,38 (t, *J* = 23 Hz, C3)

EI-MS: 202 (0,1); 172 (1); 101 (8); 85 (100); 82 (10); 67 (7); 57 (11)

6.8.2 Herstellung von [3,4-²H₂]-(*Z*)-Hex-3-enyl-1,6-bis [triphenylphosphoniumbromid] (**d₂-90**)

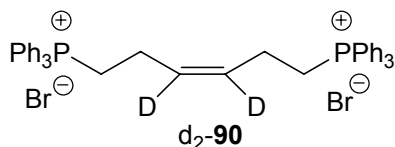


Abbildung 6-4: Herstellung von [3,4-²H₂]-(*Z*)-Hex-3-enyl-6-1,6-bis-[triphenylphosphoniumbromid] (**d₂-90**)

27,3 g (104 mmol) Triphenylphosphin wurden in 300 ml Benzol suspendiert. Bei 0°C wurden dann 16,6 g (104 mmol) Brom langsam zugetropft; anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und nach 10 min erneut auf 0°C eingekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von 10 g (50 mmol) [3,4-²H₂]-(*Z*)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-hex-3-en-6-ol (**d₂-88**). Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde dieser Mischung dann Petrolether zugegeben und das entstandene Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Das entstandene Rohprodukt [3,4-²H₂]-(*Z*)-1,6-dibromo-hex-3-en-6-ol wurde unter Vakuum aufkonzentriert ohne weitere Aufreinigung in eine Lösung von 29 g (110 mmol) Triphenylphosphin in 200 ml Acetonitril überführt. Diese Reaktionslösung wurde fünf Tage lang unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf 500 ml Toluol geschüttet. Das ausfallende bis-Wittigsalz (**d₂-90**) wurde abfiltriert und in Methanol/Diethylether umkristallisiert. Dadurch konnten 14,9 g (19,5 mmol) [3,4-²H₂]-(*Z*)-Hex-3-enyl-1,6-bis-[triphenylphosphoniumbromid] (**d₂-90**) in eine Ausbeute von 39 % isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, [²H₄]-Methanol): δ = 2,33 (m, 4H, H-C2, H-C5); 3,52(m, 4H, H-C1, H-C6); 7,71-7,93 (m, 30H, Phenyl-H)

¹³C-NMR (100 MHz, [²H₄]-Methanol): δ = 21,55 (d, *J* = 15,4 Hz, C2, C5); 22,66 (d, *J* = 15,4 Hz, C1, C6); 119,65 (d, *J* = 86,6 Hz, C1'); 129,70 (d, *J* = 71,9 Hz, C3', C5'); 131,71 (d, *J* = 13,2 Hz, C2', C6') 135,05 (d, *J* = 10,2 Hz, C4'); 136,53 (m, C3, C4)

IR(KBr) v: 2897, 2857, 2751, 1584, 1482, 1434, 1319, 111, 992 cm⁻¹

Das entsprechende unmarkierte Wittigsalz **90** wurde nach der von Pohnert und Boland publizierten Methode hergestellt und stimmt mit den Literaturdaten überein.^[164]

6.8.3 Herstellung von Ethyl-6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraenoat (**95**)

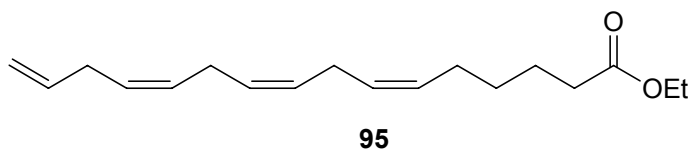


Abbildung 6-5: Herstellung von Ethyl-6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraenoat (**95**)

Unter Argon als Schutzgas wurden 0,5 g (0,65 mmol) (Z)-Hex-3-enyl-1,6-bis-[triphenylphosphoniumbromid] (**90**) in 25 ml THF suspendiert und auf -78°C eingekühlt. Dann erfolgte tropfenweise unter Rühren die Zugabe von 28 ml (1,4 mmol) einer 0,5 molaren Kalium(bis-trimethylsilyl)-amid ($\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$) Lösung in Hexan. Diese Lösung wurde dann auf -20°C erwärmt bis keine weitere Intensivierung der dunkelroten Färbung zu beobachten war (20 min). Anschließend wurde die Mischung wieder auf -78°C gekühlt. Herstellung des Aluminats (**91**): Eine Lösung von 65 mg (0,65 mmol) Methyl-but-2-enoat (**89**) wurde in 3 ml Diethylether auf -78°C eingekühlt. Anschließend wurden tropfenweise 0,65 ml (0,65 mmol) auf -78°C vorgekühlte *di*-Isobutylaluminiumhydrid-Lösung in Hexan (DiBAI-H) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 10 min (Überwachung der Reaktion durch GC/MS-Analyse) wurde diese Lösung mittels einer vorgekühlten Kanüle zu der bis-Ylidlösung (**92**) gegeben. Die entstehende Reaktionsmischung wurde über einen Zeitraum von 60 min unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt und 30 min lang bei Raumtemperatur gehalten. Danach erfolgte die erneute Kühlung auf -78°C und die Zugabe von 110 mg (0,7 mmol) Ethyl-6-oxo-hexanoat (**94**) in 5 ml THF. Diese Mischung wurde ebenfalls auf Raumtemperatur erwärmt und noch 30 min Nachreaktionszeit eingeräumt. Danach wurde die Mischung mit 2 molarer HCl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde dann durch Flashchromatographie an Silica aufgereinigt. Die Ausbeute an Ethyl-6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraenoat (**95**) betrug 45 mg (0,16 mmol), das entspricht 24 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_4]\text{-Methanol}$): $\delta = 1,24$ (t, $J = 7,05$ Hz, 3 H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,38 (quin., $J = 7,7$ Hz, 2H, H-C3); 1,6 (quin. $J = 7,7$ Hz, 2H, H-C4); 2,1 (dt, $J = 7,4$; 7,2 Hz, 2H H-C5); 2,3 (t, $J = 7,5$ Hz; 2H, H-C2); 2,8 (m, 6H, H-C8, H-C11,H-C14); 4,1 (q, $J = 7,1$ Hz, 2 H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$);

5,0 (dd, $J = 10,0$; 1,6 Hz, 1H, H-C16); 5,05 (dq, $J = 17,2$, 1,7 Hz, 1H, H-C16)
 5,30-5,40 (m, 6H, H-C6, H-C7, H-C9, H-C10, H-C12, H-C13); 5,7 (m, 1H, H-C15)

^{13}C -NMR (100 MHz, $[\text{H}_4]$ -Methanol): $\delta = 14,66$ (O-CH₂-CH₃); 25,02 (C3); 25,97 (C4);
 26,03 (C5); 27,28 (C11); 29,49 (C8); 31,92 (C14); 34,66 (C2); 60,60 (O-CH₂-CH₃); 115,15
 (C16); 127,46 (C13); 128,39 (C9); 128,51 (C10); 128,76 (C6); 129,37 (C15); 130,10 (C7);
 137,14 (C12); 174,11 (C1)

Hochaufgelöstes ESI-MS: $m/z = 276,209160 \text{ M}^+$; berechnet $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_2$
 $m/z = 276,208930 \text{ M}^+$

Spektroskopische Daten übernommen aus Pohnert *et al.*^[31]

6.8.4 Herstellung von 6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraensäure (96)

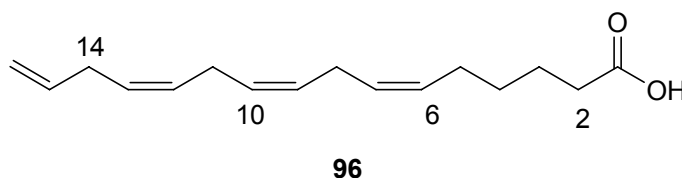


Abbildung 6-5: Herstellung von 6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraensäure (96)

Die freie Fettsäure **96** wurde durch Rühren von 10 mg (0,036 mmol) von Ethyl-6Z,9Z,12Z,15-Hexadecatetraenoat (**95**) in 4 ml THF/Wasser 3:1 nach Zugabe von 2,4 mg (0,1 mmol) LiOH über Nacht bei RT dargestellt. Das THF wurde unter Vakuum entfernt, in der wässrigen Phase mit 2 molarer HCl-Lösung ein pH-Wert von 1 eingestellt und diese dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingedampft und das erhaltene Produkt säulenchromatographisch an Silicagel aufgereinigt. Nach Entfernen des Laufmittels unter Vakuum konnten 7,5 mg (0,03 mmol) der freien Säure isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 84 %.

^1H -NMR (400 MHz, $[\text{H}_4]$ -Methanol): $\delta = 1,32$ (quin., $J = 7,4$ Hz, 2H, H-C3)
 1,51 (quin., $J = 7,7$ Hz, 2H, H-C4); 2,1 (dt, $J = 6,6$; 7,5 Hz, 2H, H-C5)
 2,2 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H-C2); 2,72 (m, 4H, H-C8, H-C11); 2,83 (m, 2H, H-C14)
 5,0 (dd, $J = 10,2$; 2,0 Hz, 1H, H-C16); 5,1 (dd, $J = 16,7$; 2,2 Hz, 1H, H-C16)
 5,2-5,4 (m, 6H, H-C6, H-C7, H-C9, H-C10, H-C12, H-C13); 5,7 (m, 1H, H-C15)

^{13}C -NMR (100 MHz, $[\text{H}_4]$ -Methanol): $\delta = 26,11$ (C3); 28,27 (C4); 30,26 (C5); 30,55 (C11);
 31,3 (C8); 32,88 (C14); 35,2 (C2); 115,47 (C16); 128,42 (C13); 129,09 (C9); 129,6 (C10);
 129,75 (C6); 130,42 (C15); 131,46 (C7); 138,31 (C12); 177,92 (C1)

Spektroskopische Daten übernommen aus Pohnert *et al.*^[31]

7 Literaturverzeichnis

- [1] S. A. Dworjanyn, J. T. Wright, N. A. Paul, R. de Nys, P. D. Steinberg, *Oikos* **2006**, 113, 13.
- [2] V. Smetacek, *Protist* **1999**, 150, 25.
- [3] F. E. Round, R. M. Crawford, D. G. Mann, *The Diatoms*, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**.
- [4] C. E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkojc, C. Maier, K. Prechtel, V. Smetacek, *Nature* **2003**, 421, 841.
- [5] C. E. Hamm, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2005**, 5, 108.
- [6] J. L. C. Wright, R. K. Boyd, A. S. W. Defreitas, M. Falk, R. A. Foxall, W. D. Jamieson, M. V. Laycock, A. W. McCulloch, A. G. McInnes, P. Odense, V. P. Pathak, M. A. Quilliam, M. A. Ragan, P. G. Sim, P. Thibault, J. A. Walter, M. Gilgan, D. J. A. Richard, D. Dewar, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **1989**, 67, 481.
- [7] C. A. Scholin, F. Gulland, G. J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F. P. Chavez, J. Cordaro, R. DeLong, A. De Vogelaere, J. Harvey, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L. J. Lowenstine, R. Marin, P. E. Miller, W. A. McLellan, P. D. R. Moeller, C. L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. Silver, T. Spraker, V. Trainer, F. M. Van Dolah, *Nature* **2000**, 403, 80.
- [8] L. Mos, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2001**, 9, 79.
- [9] M. A. Becerro, G. Goetz, V. J. Paul, P. J. Scheuer, *Journal of Chemical Ecology* **2001**, 27, 2287.
- [10] D. W. Ginsburg, V. J. Paul, *Marine Ecology Progress Series* **2001**, 215, 261.
- [11] M. E. Hay, J. E. Duffy, V. J. Paul, P. E. Renaud, W. Fenical, *Limnology and Oceanography* **1990**, 35, 1734.
- [12] J. A. Lincoln, J. T. Turner, S. S. Bates, C. Leger, D. A. Gauthier, *Hydrobiologia* **2001**, 453, 107.
- [13] S. Bargu, B. Marinovic, S. Mansergh, M. W. Silver, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2003**, 284, 87.
- [14] S. Bargu, K. Lefebvre, M. W. Silver, *Marine Ecology-Progress Series* **2006**, 312, 169.
- [15] R. J. Anderson, B. Velimirov, *Marine Ecology* **1982**, 3, 357.
- [16] F. Weinberger, G. Pohnert, B. Kloareg, P. Potin, *ChemBioChem* **2002**, 3, 1260.
- [17] F. Weinberger, G. Pohnert, M. L. Berndt, K. Bouarab, B. Kloareg, P. Potin, *Journal of Experimental Botany* **2005**, 56, 1317.
- [18] V. J. Paul, M. P. Puglisi, R. Ritson-Williams, *Natural Product Reports* **2006**, 23, 153.
- [19] P. Potin, K. Bouarab, J. P. Salaun, G. Pohnert, B. Kloareg, *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, 5, 308.
- [20] M. Koski, W. Breteler, *Marine Ecology Progress Series* **2003**, 264, 73.
- [21] D. C. Müller-Navarra, M. T. Brett, A. M. Liston, C. R. Goldman, *Nature* **2000**, 403, 74.
- [22] S. H. Jonasdottir, *Marine Biology* **1994**, 121, 67.
- [23] J. G. Stottrup, J. Jensen, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1990**, 141, 87.
- [24] S. A. Poulet, M. Laabir, A. Ianora, A. Miralto, *Marine Ecology-Progress Series* **1995**, 129, 85.
- [25] S. H. Ban, C. Burns, J. Castel, Y. Chaudron, E. Christou, R. Escribano, S. F. Umani, S. Gasparini, F. G. Ruiz, M. Hoffmeyer, A. Ianora, H. K. Kang, M. Laabir, A. Lacoste, A. Miralto, X. R. Ning, S. Poulet, V. Rodriguez, J. Runge, J. X. Shi, M. Starr, S. Uye, Y. J. Wang, *Marine Ecology Progress Series* **1997**, 157, 287.
- [26] A. Miralto, G. Barone, G. Romano, S. A. Poulet, A. Ianora, G. L. Russo, I. Buttino, G. Mazarella, M. Laabir, M. Cabrini, M. G. Giacobbe, *Nature* **1999**, 402, 173.

- [27] G. Pohnert, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, 4352.
- [28] A. Cutignano, G. d'Ippolito, G. Romano, N. Lamari, G. Cimino, F. Febbraio, A. Fontana, *ChemBioChem* **2006**, 7, 450.
- [29] G. Pohnert, *Plant Physiology* **2002**, 129, 103.
- [30] G. Pohnert, *ChemBioChem* **2005**, 6, 946.
- [31] G. Pohnert, S. Adolph, T. Wichard, *Chemistry and Physics of Lipids* **2004**, 131, 159.
- [32] T. Wichard, A. Gerecht, M. Boersma, S. A. Poulet, K. Wiltshire, G. Pohnert, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1146.
- [33] A. Ianora, S. A. Poulet, A. Miralto, *Phycologia* **2003**, 42, 351.
- [34] V. J. Paul, K. L. VanAlstyne, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1992**, 160, 191.
- [35] D. J. Faulkner, *Natural Product Reports* **2001**, 18, 1.
- [36] D. J. Faulkner, *Natural Product Reports* **2002**, 19, 1.
- [37] V. J. Paul, W. Fenical, *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 5017.
- [38] V. J. Paul, H. H. Sun, W. Fenical, *Phytochemistry* **1982**, 21, 468.
- [39] D. Iliopoulou, C. Vagias, C. Harvala, V. Roussis, *Natural Product Letters* **2000**, 14, 373.
- [40] V. J. Paul, W. Fenical, *Phytochemistry* **1985**, 24, 2239.
- [41] H. H. Sun, W. Fenical, *Tetrahedron Letters* **1979**, 685.
- [42] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Vol. 2, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [43] V. J. Paul, M. P. Puglisi, *Natural Product Reports* **2004**, 21, 189.
- [44] J. T. Handley, A. J. Blackman, *Australian Journal of Chemistry* **2005**, 58, 39.
- [45] O. Dumay, G. Pergent, C. Pergent-Martini, P. Amade, *Journal of Chemical Ecology* **2002**, 28, 343.
- [46] A. Guerriero, A. Meinesz, M. Dambrosio, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1992**, 75, 689.
- [47] L. Denapoli, E. Fattorusso, S. Magno, L. Mayol, *Experientia* **1981**, 37, 1132.
- [48] A. Guerriero, F. Marchetti, M. Dambrosio, S. Senesi, F. Dini, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1993**, 76, 855.
- [49] L. Denapoli, S. Magno, L. Mayol, E. Novellino, *Experientia* **1983**, 39, 141.
- [50] V. Smyrniotopoulos, D. Abatis, L. A. Tziveleka, C. Tsitsimpikou, V. Roussis, A. Loukis, C. Vagias, *Journal of Natural Products* **2003**, 66, 21.
- [51] L. Commeiras, J. Bourdron, S. Douillard, P. Barbier, N. Vanthuyne, V. Peyrot, J. L. Parrain, *Synthesis* **2006**, 166.
- [52] P. Barbier, S. Guise, P. Huitorel, P. Amade, D. Pesando, C. Briand, V. Peyrot, *Life Sciences* **2001**, 70, 415.
- [53] L. M. Hodgson, *Botanica Marina* **1984**, 27, 387.
- [54] G. M. Konig, A. D. Wright, *ACS Symposium Series* **1993**, 534, 276.
- [55] J. T. Baker, *Hydrobiologia* **1984**, 116, 29.
- [56] L. Cavas, Y. Baskin, K. Yurdakoc, N. Olgun, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2006**, 339, 111.
- [57] V. J. Paul, W. Fenical, *Marine Ecology Progress Series* **1986**, 34, 157.
- [58] V. J. Paul, M. M. Littler, D. S. Littler, W. Fenical, *Journal of Chemical Ecology* **1987**, 13, 1171.
- [59] S. M. Kupchan, D. C. Fessler, M. A. Eakin, T. J. Giacobbe, *Science* **1970**, 168, 376.
- [60] V. Jung, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2003**.
- [61] T. J. Han, Y. S. Han, J. M. Kain, D. P. Hader, *Journal of Phycology* **2003**, 39, 712.
- [62] D. Menzel, *Protoplasma* **1988**, 144, 73.
- [63] T. Komatsu, A. Meinesz, D. Buckles, in *First international Workshop on Caulerpa taxifolia* (Eds.: C. F. Boudouresque, A. Meinesz, V. Gravez), GIS Posidonie, **1994**, 301.
- [64] L. B. Liddle, N. Carvalho, A. Meinesz, *Phycologia* **1998**, 37, 310.
- [65] F. Takahashi, T. Hishinuma, H. Kataoka, *Plant and Cell Physiology* **2001**, 42, 274.

- [66] NIMPIS, Vol. 2006 (Eds.: C. L. Hewitt, R. B. Martin, C. Sliwa, F. R. McEnulty, N. E. Murphy, T. Jones, S. Cooper), NIMPIS, **2002**, Map of *Caulerpa taxifolia* Distribution.
- [67] D. BellanSantini, P. M. Arnaud, G. Bellan, M. Verlaque, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1996**, *76*, 235.
- [68] P. Fama, O. Jousson, L. Zaninetti, A. Meinesz, F. Dini, G. Di Giuseppe, A. J. K. Millar, J. Pawlowski, *Journal of Evolutionary Biology* **2002**, *15*, 618.
- [69] O. Jousson, J. Pawlowski, L. Zaninetti, A. Meinesz, C. F. Boudouresque, *Marine Ecology Progress Series* **1998**, *172*, 275.
- [70] J. Wiedenmann, A. Baumstark, T. L. Pillen, A. Meinesz, W. Vogel, *Marine Biology* **2001**, *138*, 229.
- [71] I. Meusnier, J. L. Olsen, W. T. Stam, C. Destombe, M. Valero, *Molecular Ecology* **2001**, *10*, 931.
- [72] A. Meinesz, B. Hesse, *Oceanologica Acta* **1991**, *14*, 415.
- [73] A. Occhipinti-Ambrogi, D. Savini, *Marine Pollution Bulletin* **2003**, *46*, 542.
- [74] J. Kaiser, *Science* **2000**, *289*, 222.
- [75] X. Devillele, M. Verlaque, *Botanica Marina* **1995**, *38*, 79.
- [76] M. Verlaque, P. Fritayre, *Oceanologica Acta* **1994**, *17*, 659.
- [77] A. Žuljević, B. Antolic, *Phycologia* **2000**, *39*, 157.
- [78] G. Relini, M. Relini, G. Torchia, *ICES Journal of Marine Science* **2000**, *57*, 1421.
- [79] L. Collado-Vides, *Evolutionary Ecology* **2001**, *15*, 531.
- [80] N. Sant, O. Delgado, C. RodriguezPrieto, E. Ballesteros, *Botanica Marina* **1996**, *39*, 427.
- [81] R. Dalton, *Nature* **2000**, *406*, 447.
- [82] J. R. M. Chisholm, M. Marchioretti, J. M. Jaubert, *Marine Ecology Progress Series* **2000**, *201*, 189.
- [83] B. Schaffelke, N. Murphy, S. Uthicke, *Marine Pollution Bulletin* **2002**, *44*, 204.
- [84] L. W. J. Anderson, *Biological Invasions* **2005**, *7*, 1003.
- [85] T. M. Glasby, R. G. Creese, P. T. Gibson, *Biological Conservation* **2005**, *122*, 573.
- [86] A. Claudel, D. Dupeux, M. Matrat, (Ed.: F. Compagnie des Salins du Midi et des Salines de L Est), France, **1996**, 12.
- [87] J. P. Charrin, F. Antoine, Vol. FR 97-10918 19970828, France, **1999**.
- [88] A. Meinesz, T. Belsher, T. Thibaut, B. Antolic, K. Ben Mustapha, C.-F. Boudouresque, D. Chiaverini, F. Cinelli, J.-M. Cottalorda, A. Djellouli, A. El Abed, C. Orestano, A. M. Grau, L. Ivesa, A. Jaklin, H. Langar, E. Massuti-Pascual, A. Peirano, L. Tunesi, J. De Vaugelas, N. Zavodnik, A. Zuljevic, *Biological Invasions* **2001**, *3*, 201.
- [89] E. Perez-Rodriguez, I. Gomez, U. Karsten, F. L. Figueroa, *Phycologia* **1998**, *37*, 379.
- [90] C. Ross, F. C. Küpper, V. Vreeland, J. H. Waite, R. S. Jacobs, *Journal of Phycology* **2005**, *41*, 531.
- [91] C. Ross, V. Vreeland, J. H. Waite, R. S. Jacobs, *Journal of Phycology* **2005**, *41*, 46.
- [92] D. Menzel, R. Kazlauskas, J. Reichelt, *Botanica Marina* **1983**, *26*, 23.
- [93] G. H. Kim, T. A. Klochkova, K. S. Yoon, Y. S. Song, K. P. Lee, *Journal of Phycology* **2006**, *42*, 86.
- [94] G. H. Kim, T. A. Klotchkova, Y. M. Kang, *Journal of Cell Science* **2001**, *114*, 2009.
- [95] M. Ram, S. B. Babbar, *BioEssays* **2002**, *24*, 588.
- [96] T. W. Dreher, B. R. Grant, R. Wetherbee, *Protoplasma* **1978**, *96*, 189.
- [97] T. W. Dreher, D. B. Hawthorne, B. R. Grant, *Protoplasma* **1982**, *110*, 129.
- [98] V. Jung, G. Pohnert, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7169.
- [99] G. Cimino, A. Crispino, V. Dimarzo, M. Gavagnin, J. D. Ros, *Experientia* **1990**, *46*, 767.
- [100] A. Cutignano, V. Notti, G. d'Ippolito, A. D. Coll, G. Cimino, A. Fontana, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 3167.

- [101] H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics, Vol. 4*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2002**.
- [102] V. Jung, T. Thibaut, A. Meinesz, G. Pohnert, *Journal of Chemical Ecology* **2002**, 28, 2091.
- [103] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Vol. 4*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1991**.
- [104] K. P. C. Vollhardt, *Organische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1990**.
- [105] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1990**.
- [106] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [107] D. W. Sears, J. Mohrer, S. Beychok, *Biochemistry* **1977**, 16, 2031.
- [108] MolecularProbes, *Vol. 2007*, 2001 ed., Molecular Probes, **2001**, Product Information Alexa Fluor 488 Histone H1.
- [109] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie, Vol. 5*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [110] J. M. Luck, P. S. Rasmussen, K. Satake, A. N. Tsvetkov, *Journal of Biological Chemistry* **1958**, 233, 1407.
- [111] E. H. D. Nooij, H. G. K. Westenbrink, *Biochimica et Biophysica Acta* **1962**, 62, 608.
- [112] G. Richter, *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen, Vol. 4*, Thieme, Stuttgart, **1982**.
- [113] W. Zhang, L. Piculell, S. Nilsson, S. H. Knutsen, *Carbohydrate Polymers* **1994**, 23, 105.
- [114] I. M. Yermak, Y. H. Kim, E. A. Titlynov, V. V. Isakov, T. F. Solov'eva, *Journal of Applied Phycology* **1999**, 11, 41.
- [115] K. Konno, C. Hirayama, H. Yasui, M. Nakamura, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 9159.
- [116] K. Konno, H. Yasui, C. Hirayama, H. Shinbo, *Journal of Chemical Ecology* **1998**, 24, 735.
- [117] F. Dal Piaz, A. Casapullo, A. Randazzo, R. Riccio, P. Pucci, G. Marino, L. Gomez-Paloma, *ChemBioChem* **2002**, 3, 664.
- [118] F. Lemiere, *Guide to LC-MS (Supplement to LC-GC)* **2001**, December 2001, 21.
- [119] A. Guerriero, D. Depentori, M. Dambrosio, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1995**, 78, 1755.
- [120] R. Aliya, M. Shameel, *Pakistan Journal of Botany* **2003**, 35, 659.
- [121] R. Aliya, M. Shameel, *Botanica Marina* **1998**, 41, 125.
- [122] R. Valls, J. Artaud, A. Archavlis, N. Vicente, L. Piovetti, *Oceanologica Acta* **1994**, 17, 223.
- [123] R. Qasim, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **1991**, 4, 49.
- [124] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [125] A. M. S. Mayer, V. J. Paul, W. Fenical, J. N. Norris, M. S. Decarvalho, R. S. Jacobs, *Hydrobiologia* **1993**, 261, 521.
- [126] N. Bitou, M. Ninomiya, T. Tsujita, H. Okuda, *Lipids* **1999**, 34, 441.
- [127] A. Randazzo, C. Debitus, L. Minale, P. G. Pastor, M. J. Alcaraz, M. Paya, L. Gomez-Paloma, *Journal of Natural Products* **1998**, 61, 571.
- [128] K. Laumen, E. H. Reimerdes, M. Schneider, H. Gorisch, *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 407.
- [129] SigmaAldrich, *Product detail of 46064 Esterase, immobilized on Eupergit® C from hog liver*, **2007**.
- [130] M. A. Jeannot, J. Zheng, L. Li, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 512.
- [131] R. Lemée, C. F. Boudouresque, J. Gobert, P. Malestroit, X. Mari, A. Meinesz, V. Menager, S. Ruitton, *Oceanologica Acta* **1996**, 19, 245.
- [132] P. Amade, R. Lemée, *Aquatic Toxicology* **1998**, 43, 287.
- [133] R. Lemée, D. Pesando, M. Durandclement, A. Dubreuil, A. Meinesz, A. Guerriero, F. Pietra, *Journal of Applied Phycology* **1993**, 5, 485.
- [134] M. L. Pedrotti, B. Marchi, R. Lemée, *Oceanologica Acta* **1996**, 19, 255.

- [135] I. Galgani, D. Pesando, J. Porthe-Nibelle, B. Fossat, J. P. Girard, *Journal of Biochemical Toxicology* **1996**, *11*, 243.
- [136] M. Gavagnin, A. Marin, F. Castelluccio, G. Villani, G. Cimino, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1994**, *175*, 197.
- [137] P. Lindroth, K. Mopper, *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 1667.
- [138] B. N. Jones, J. P. Gilligan, *Journal of Chromatography* **1983**, *266*, 471.
- [139] P. A. Metz, J. Gehas, J. E. Spriggle, H. Veening, *Journal of Chromatography* **1985**, *330*, 307.
- [140] M. J. M. Hernandez, R. M. V. Camanas, M. C. G. Alvarezcoque, *Microchemical Journal* **1990**, *42*, 288.
- [141] H. Nakamura, Z. Tamura, *Analytical Chemistry* **1981**, *53*, 2190.
- [142] S. Oguri, K. Yokoi, Y. Motohase, *Journal of Chromatography A* **1997**, *787*, 253.
- [143] H. Mana, Dissertation, Martin-Luther-Universität, **1998**.
- [144] C. H. W. Hirs, *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *219*, 611.
- [145] D. Pesando, P. Huitorel, V. Dolcini, P. Amade, J. P. Girard, *European Journal of Cell Biology* **1998**, *77*, 19.
- [146] D. Pesando, R. Lemée, C. Ferrua, P. Amade, J. P. Girard, *Aquatic Toxicology* **1996**, *35*, 139.
- [147] D. Pesando, C. Pesci-Bardon, P. Huitorel, J. P. Girard, *European Journal of Cell Biology* **1999**, *78*, 903.
- [148] R. Lemée, D. Pesando, C. Issanchou, P. Amade, *Marine Environmental Research* **1997**, *44*, 13.
- [149] E. Cruz-Rivera, M. E. Hay, *Ecology* **2000**, *81*, 201.
- [150] E. Cruz-Rivera, M. E. Hay, *Ecological Monographs* **2003**, *73*, 483.
- [151] M. E. Hay, J. E. Duffy, C. A. Pfister, *Ecology* **1987**, *68*, 1567.
- [152] J. E. Duffy, M. E. Hay, *Ecology* **1991**, *72*, 1286.
- [153] J. E. Duffy, M. E. Hay, *Ecology* **1994**, *75*, 1304.
- [154] M. E. Hay, Q. E. Kappel, W. Fenical, *Ecology* **1994**, *75*, 1714.
- [155] T. Wichard, S. A. Poulet, C. Halsband-Lenk, A. Albaina, R. Harris, D. Y. Liu, G. Pohnert, *Journal of Chemical Ecology* **2005**, *31*, 949.
- [156] G. Pohnert, W. Boland, *Natural Product Reports* **2002**, *19*, 108.
- [157] G. d'Ippolito, G. Romano, T. Caruso, A. Spinella, G. Cimino, A. Fontana, *Organic Letters* **2003**, *5*, 885.
- [158] S. Adolph, S. A. Poulet, G. Pohnert, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3003.
- [159] A. Barofsky, G. Pohnert, *Organic Letters* **2007**, *9*, 1017.
- [160] M. H. Silk, H. H. Hahn, *Biochemical Journal* **1954**, *57*, 582.
- [161] E. Klenk, D. Eberhagen, *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1962**, *328*, 189.
- [162] G. d'Ippolito, S. Tucci, A. Cutignano, G. Romano, G. Cimino, A. Miralto, A. Fontana, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* **2004**, *1686*, 100.
- [163] S. Durand, J. L. Parrain, M. Santelli, *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions 1* **2000**, 253.
- [164] G. Pohnert, W. Boland, *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 1821.
- [165] B. K. Eya, T. Otsuka, I. Kubo, D. L. Wood, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2695.
- [166] C. A. Brown, V. K. Ahuja, *Journal of the Chemical Society – Chemical Communications* **1973**, 553.
- [167] C. A. Brown, V. K. Ahuja, *Journal of Organic Chemistry* **1973**, *38*, 2226.
- [168] I. Maier, M. Calenberg, *Botanica Acta* **1994**, *107*, 451.
- [169] W. H. Beyer, *CRC Handbook of Tables for Probability and Statistics*, Second ed., The Chemical Rubber, Cleveland, Ohio, **1968**.

8 Anhänge

8.1 Spektrenanhang

8.1.1 Caulerpeninumwandlung im Gegenwart von Lysin (64) / Cystein (73)

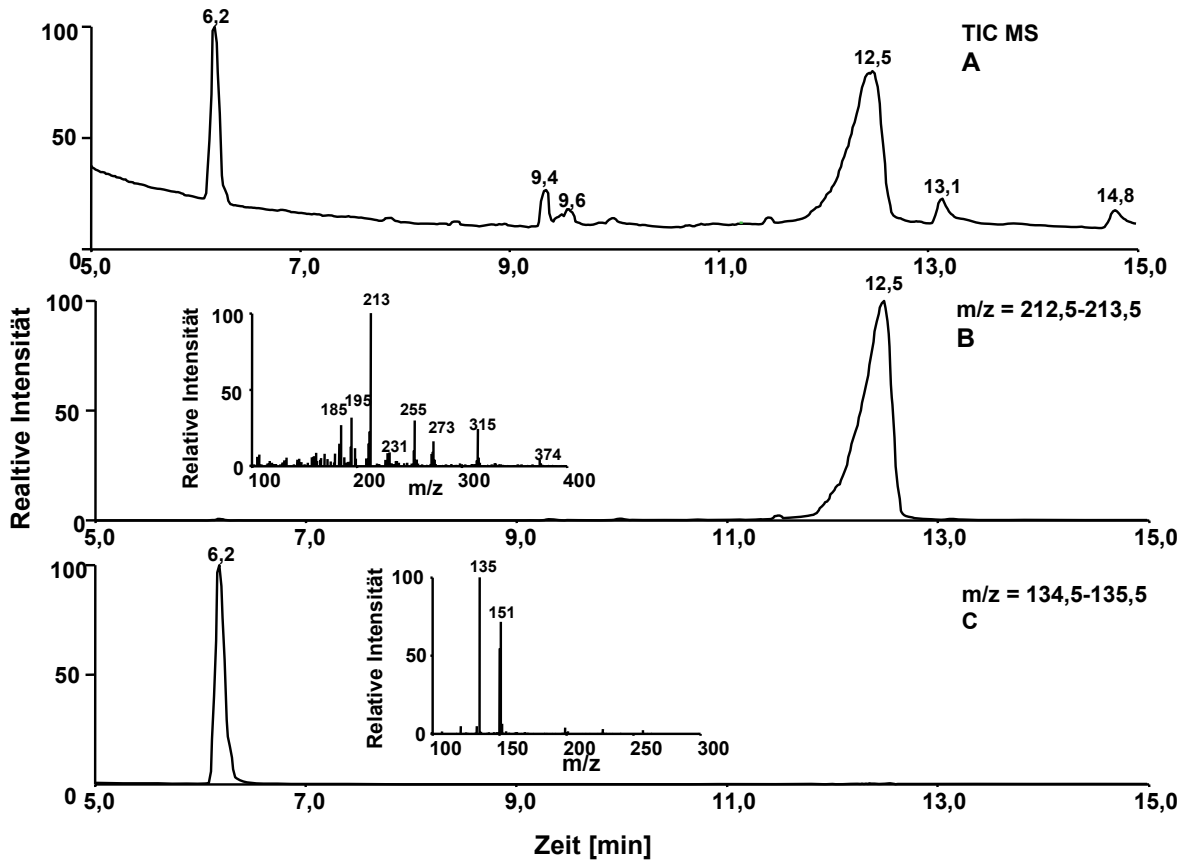


Abbildung 8-1: GC/MS-Läufe der Caulerpenin-Umwandlung von *C. taxofolia* in Gegenwart freier Aminosäuren in der intakten Kontrollprobe
A: Full scan mode; B: SIM: 212,5-213,5 (Caulerpenin (17)) C: SIM 134,5-135,5 4'-Methoxyacetophenon

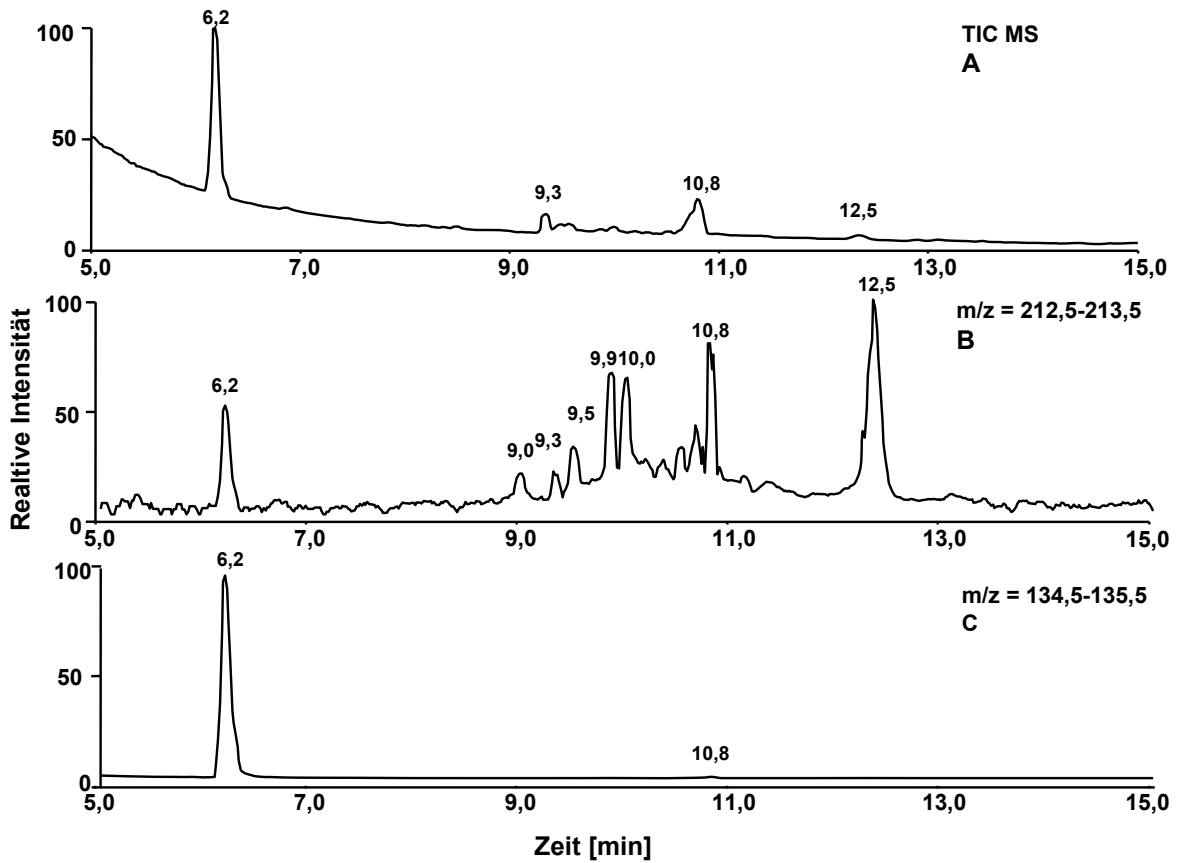
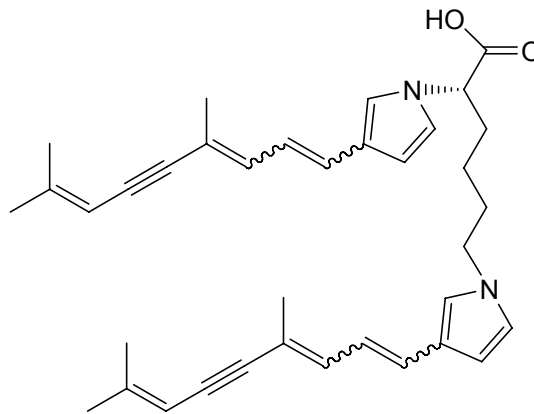
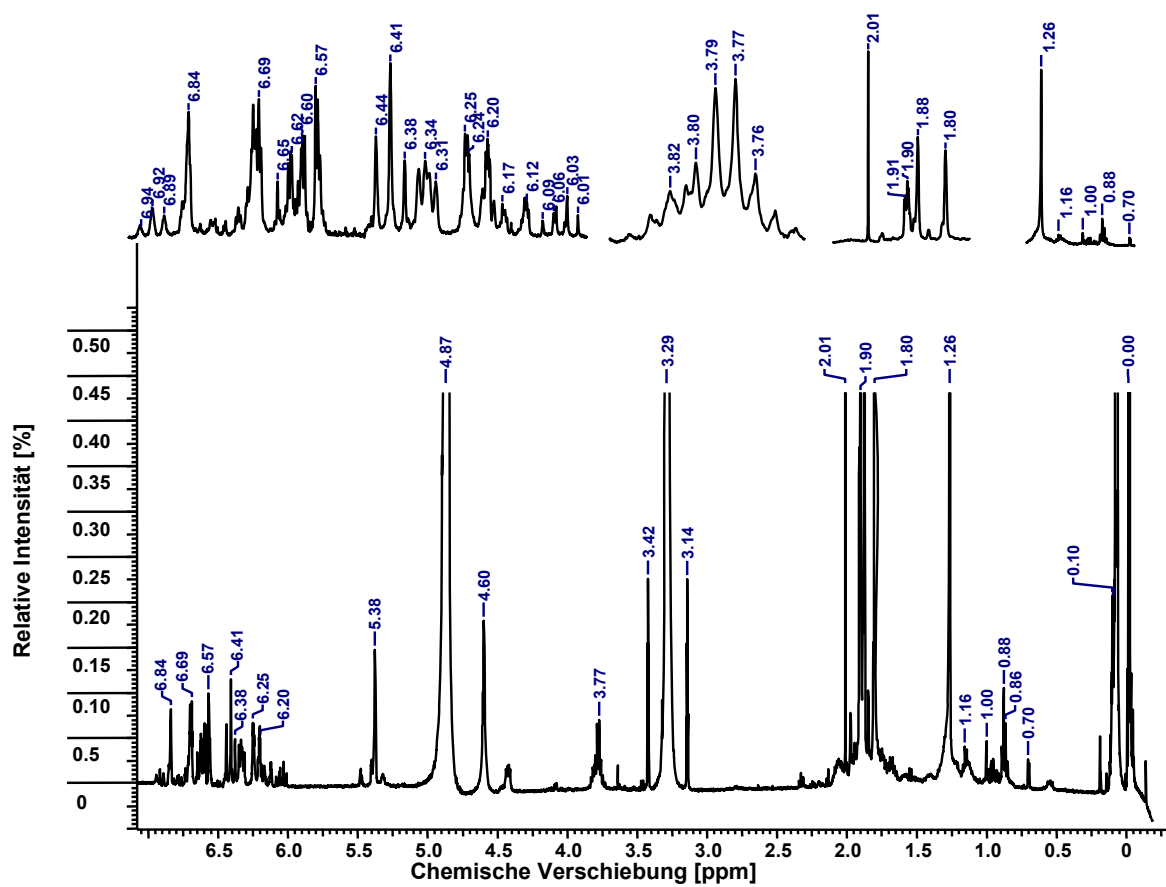


Abbildung 8-2: GC/MS-Läufe der Caulerpenin-Umwandlung von *C. taxofolia* in Gegenwart freier Aminosäuren, 2 min. nach Verwundung
A: Full scan mode; B: SIM: 212,5-213,5 (Caulerpenin (17)) C: SIM 134,5-135,5 4'-Methoxyacetophenon

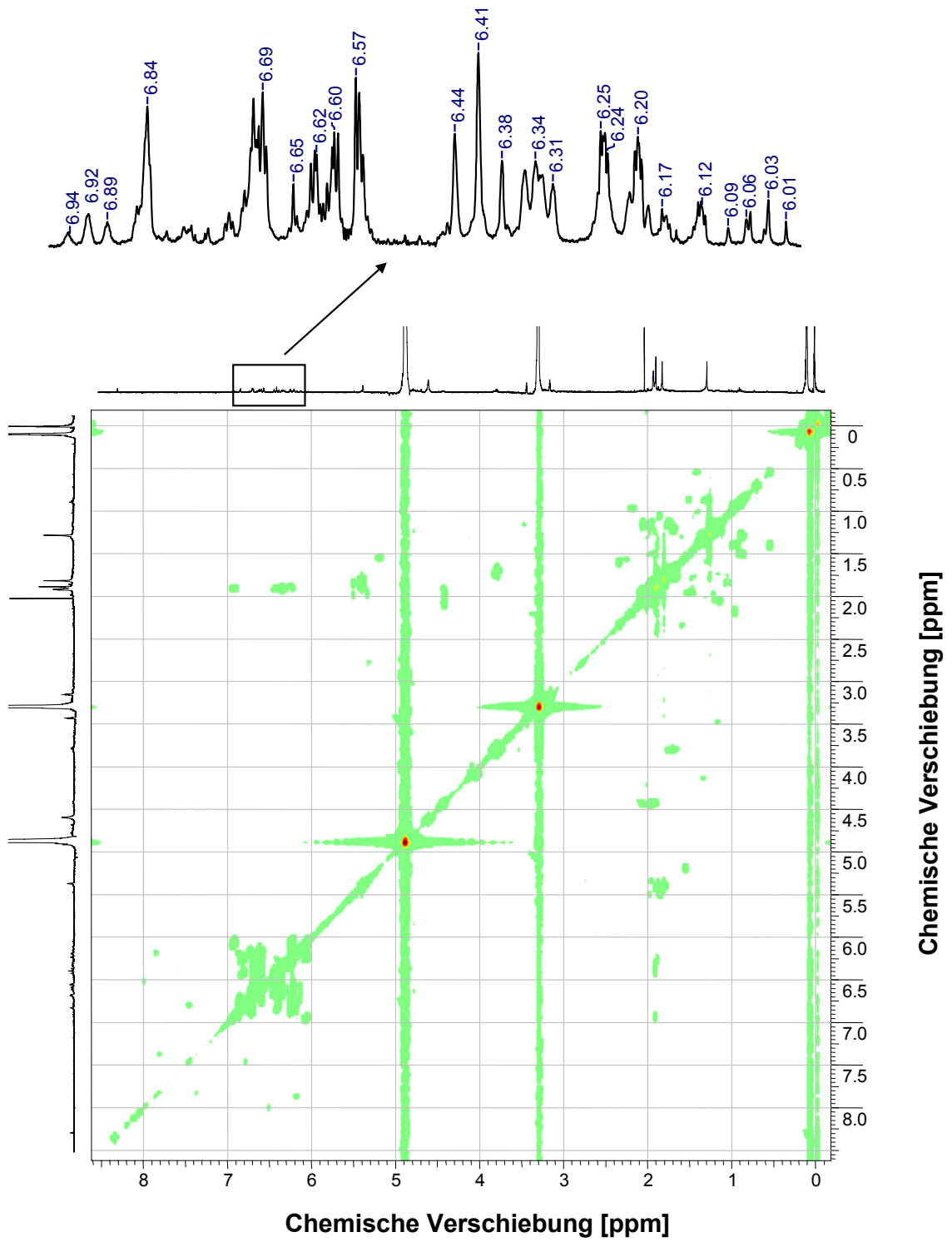
8.1.2 Spektroskopische Daten von 62

**62**

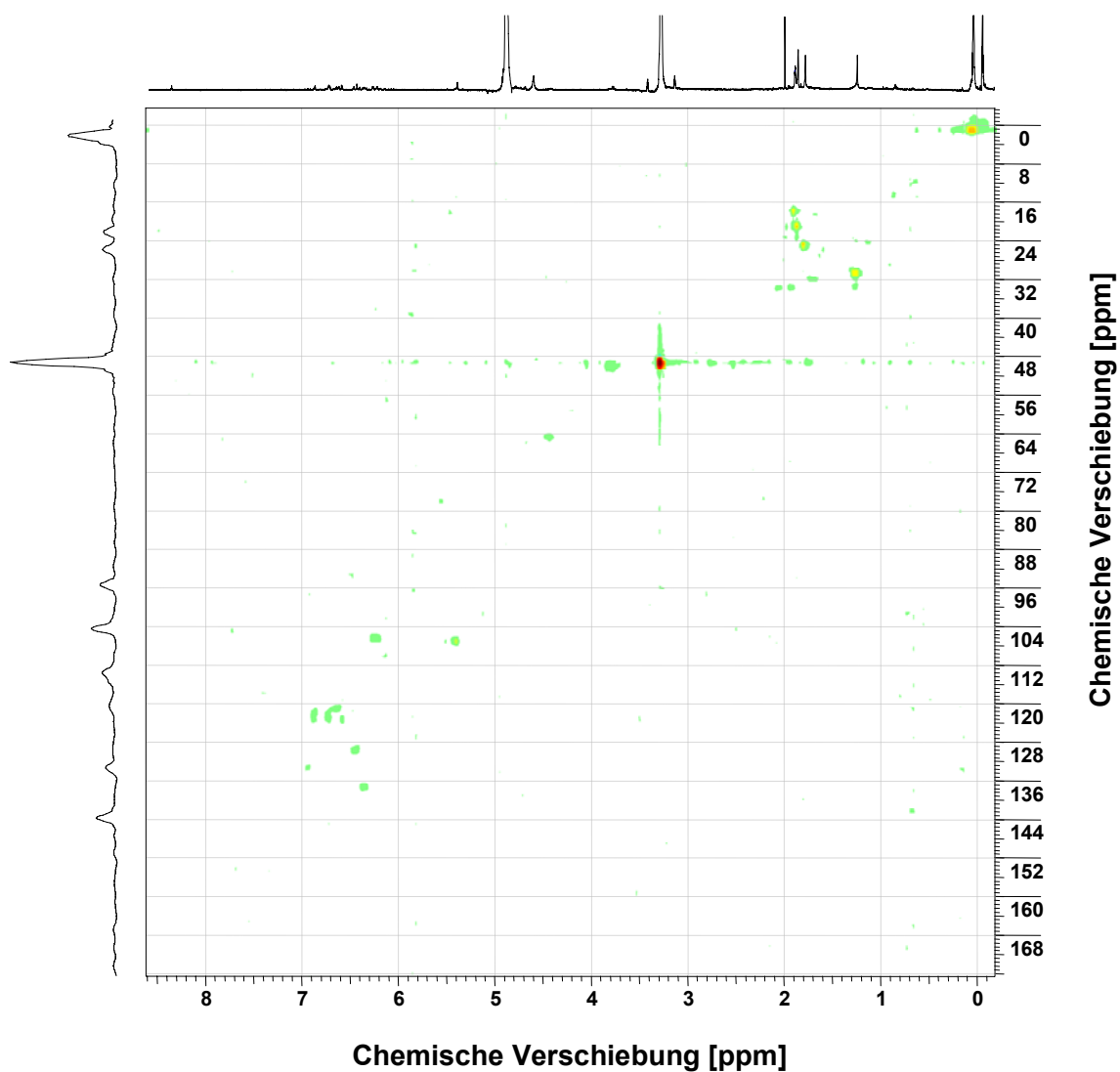
8.1.2.1 $^1\text{H-NMR}$ von 62



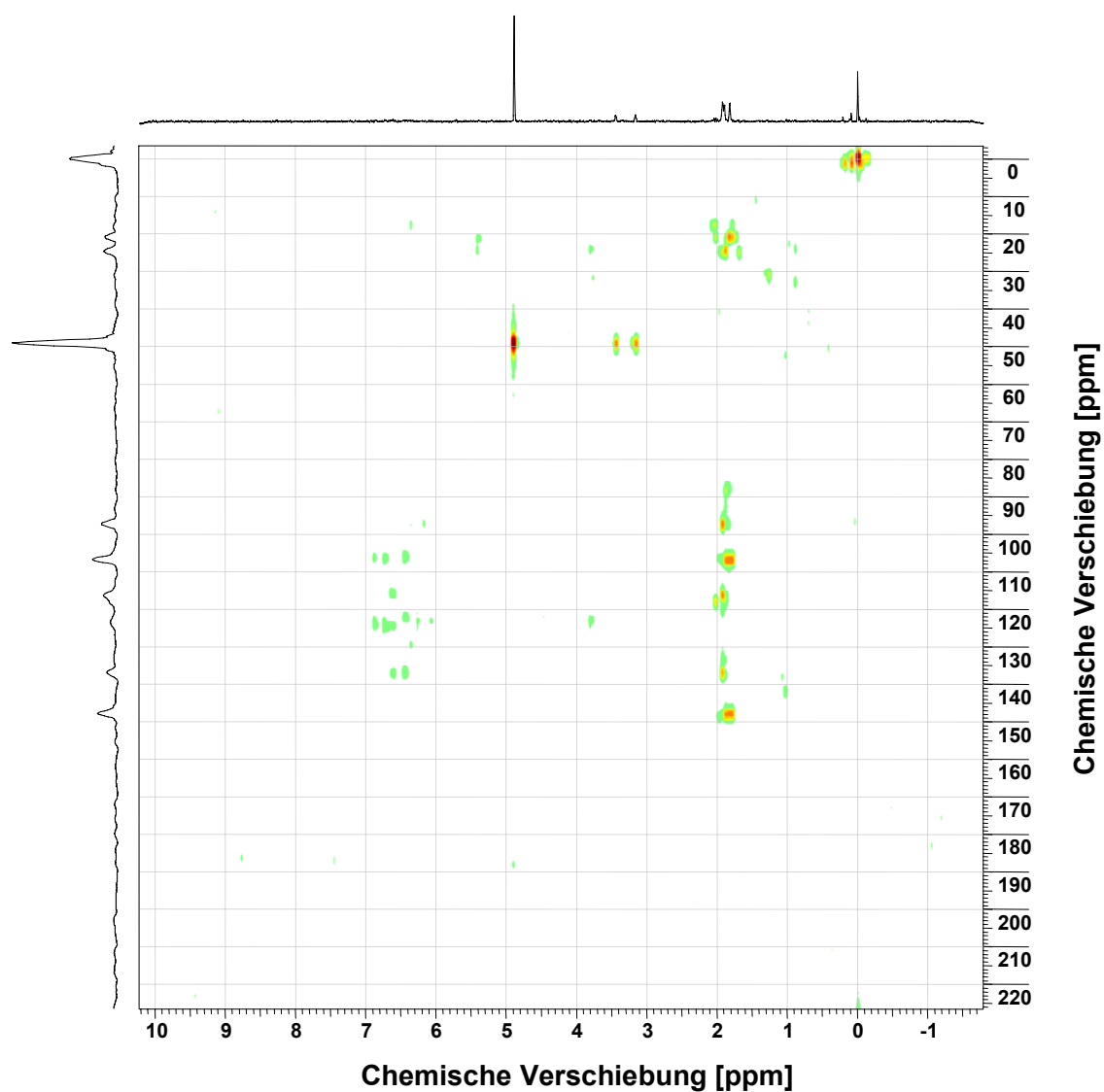
8.1.2.2 H-H-COSY von 62



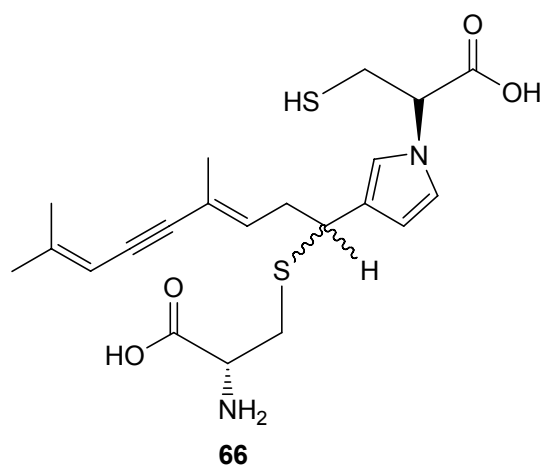
8.1.2.3 HMQC von 62



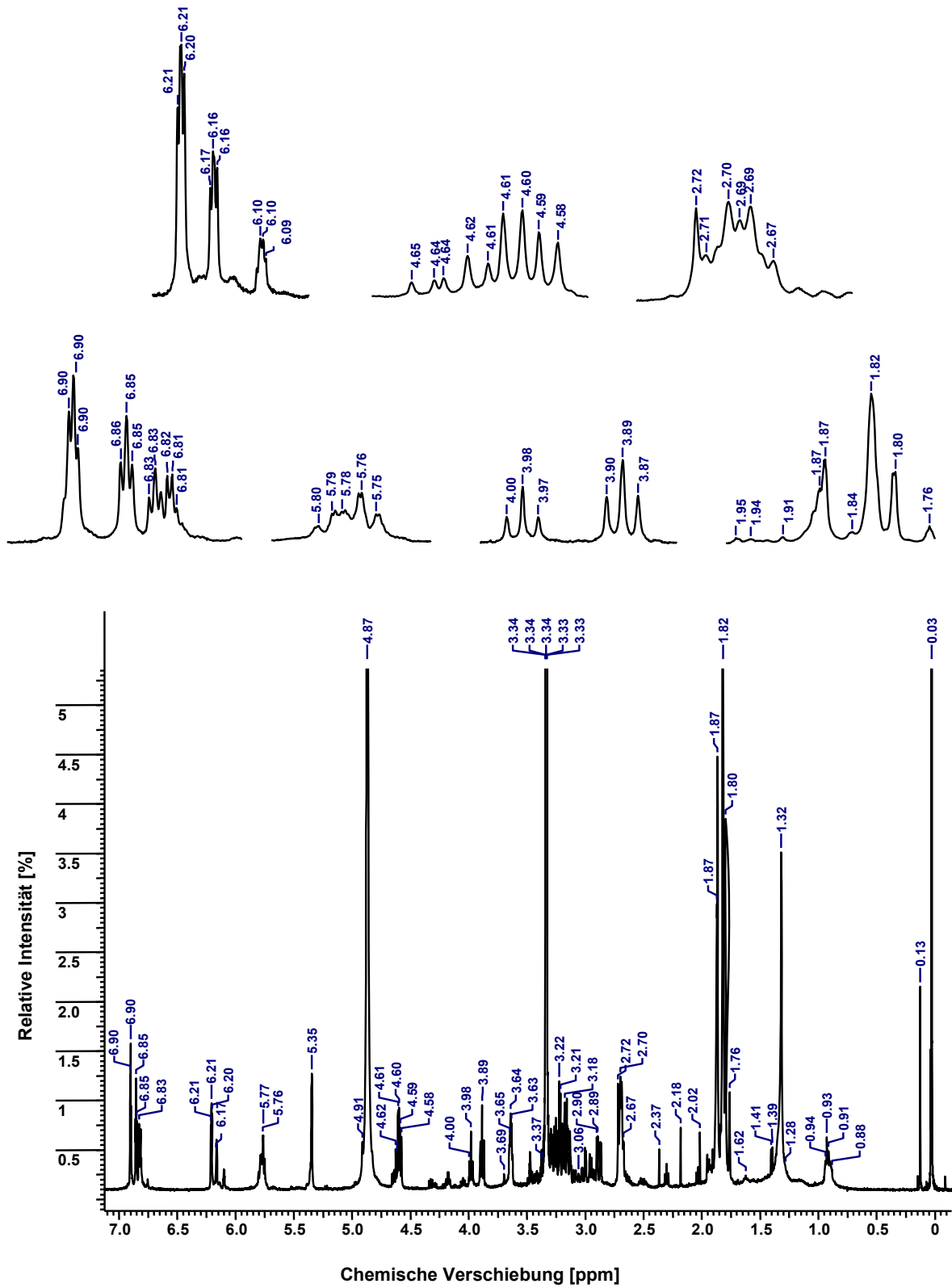
8.1.2.4 HMBC von 62



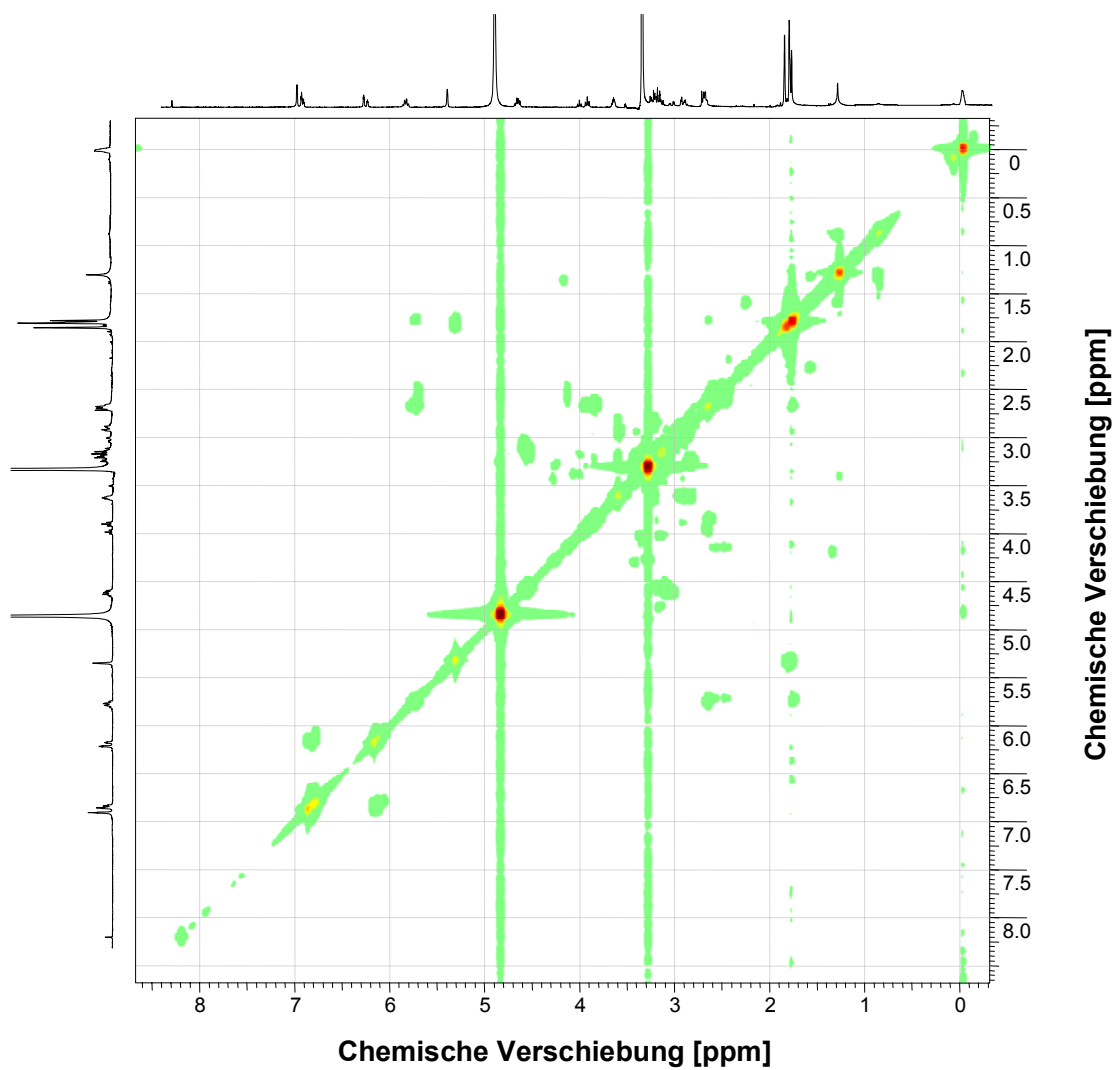
8.1.3 Spektroskopische Daten von 66



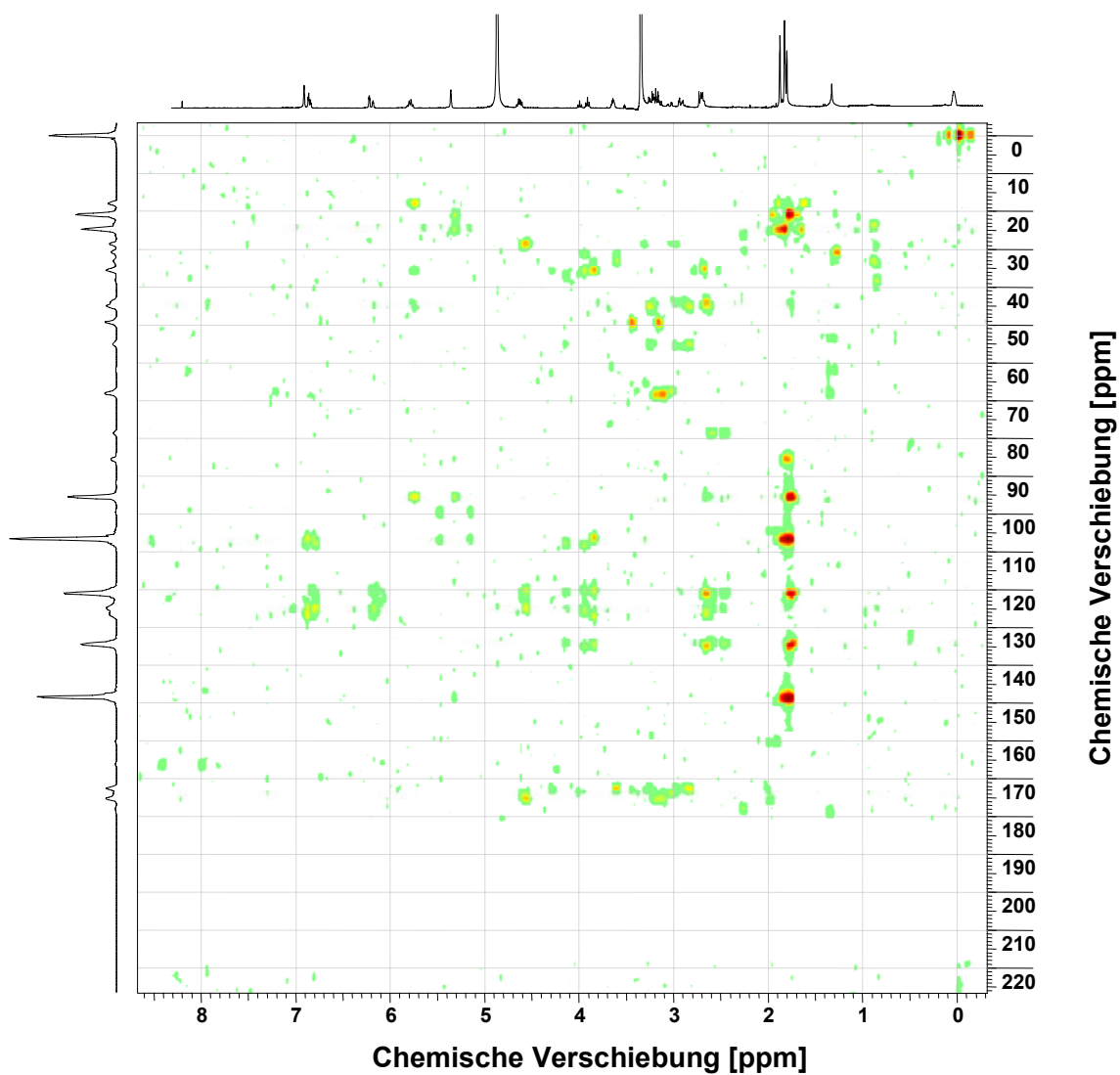
8.1.3.1 ¹H NMR von 66



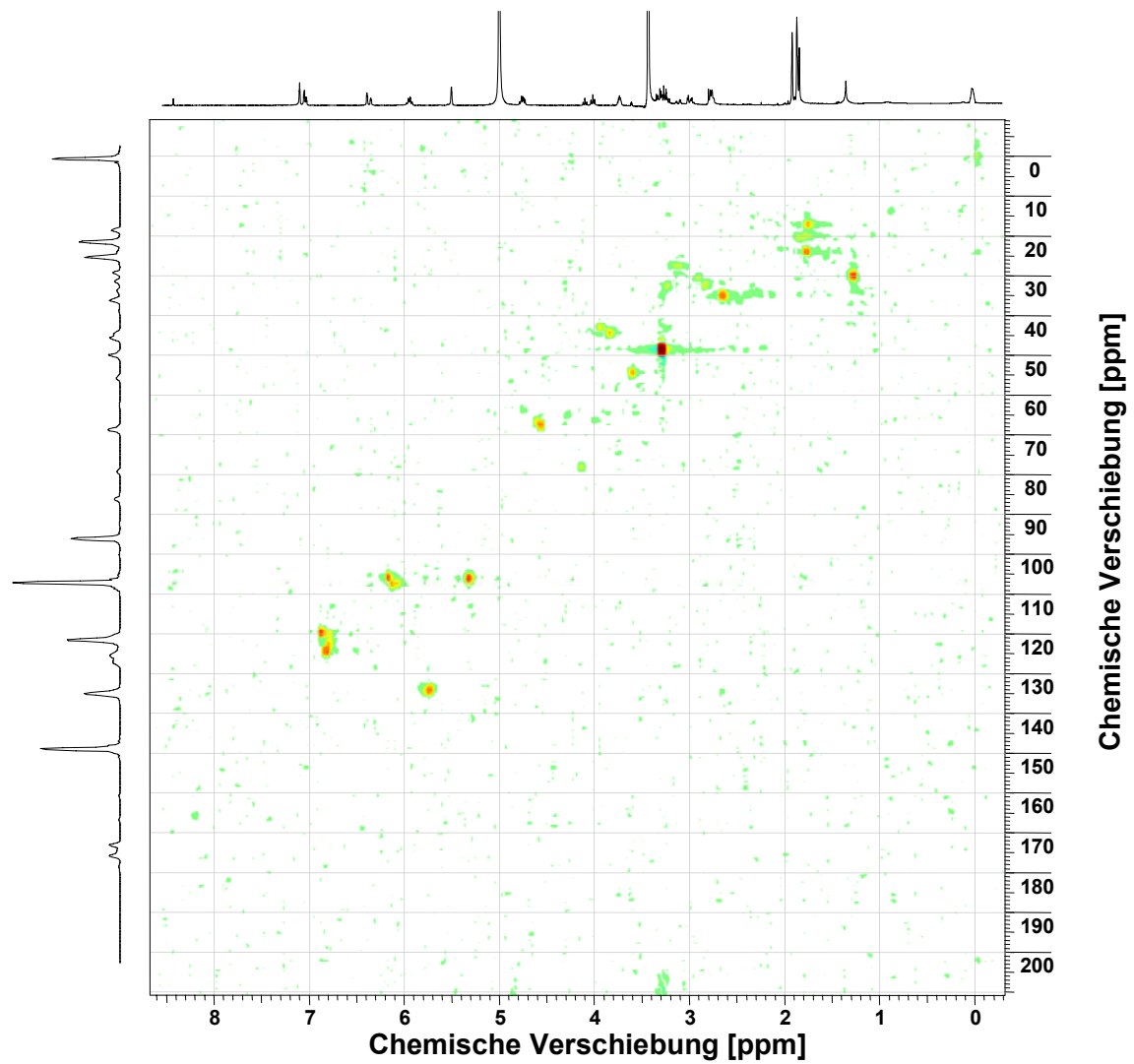
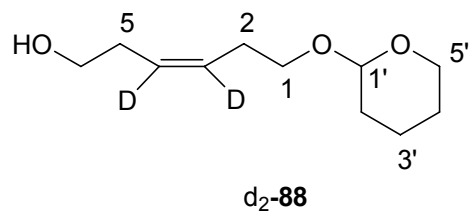
8.1.3.2 H-H-COSY von 66



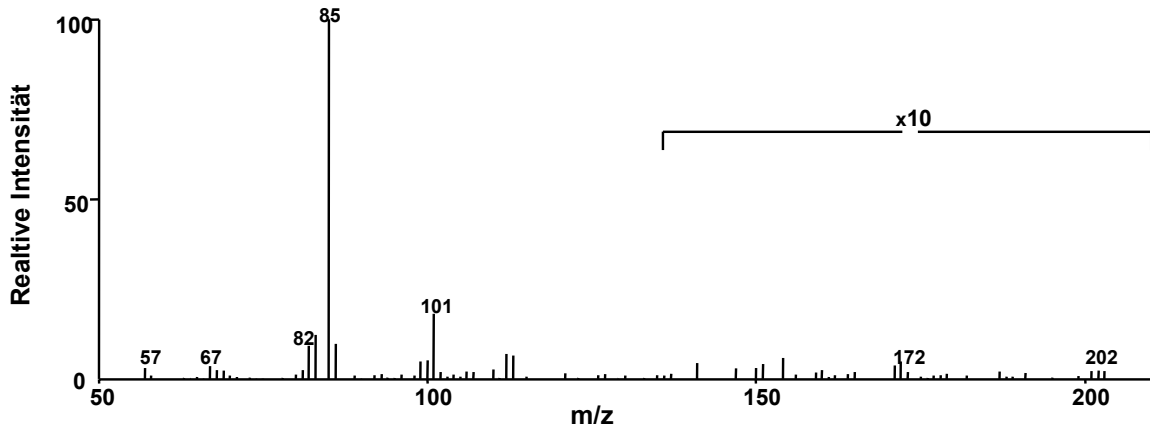
8.1.3.3 HMQC von 66



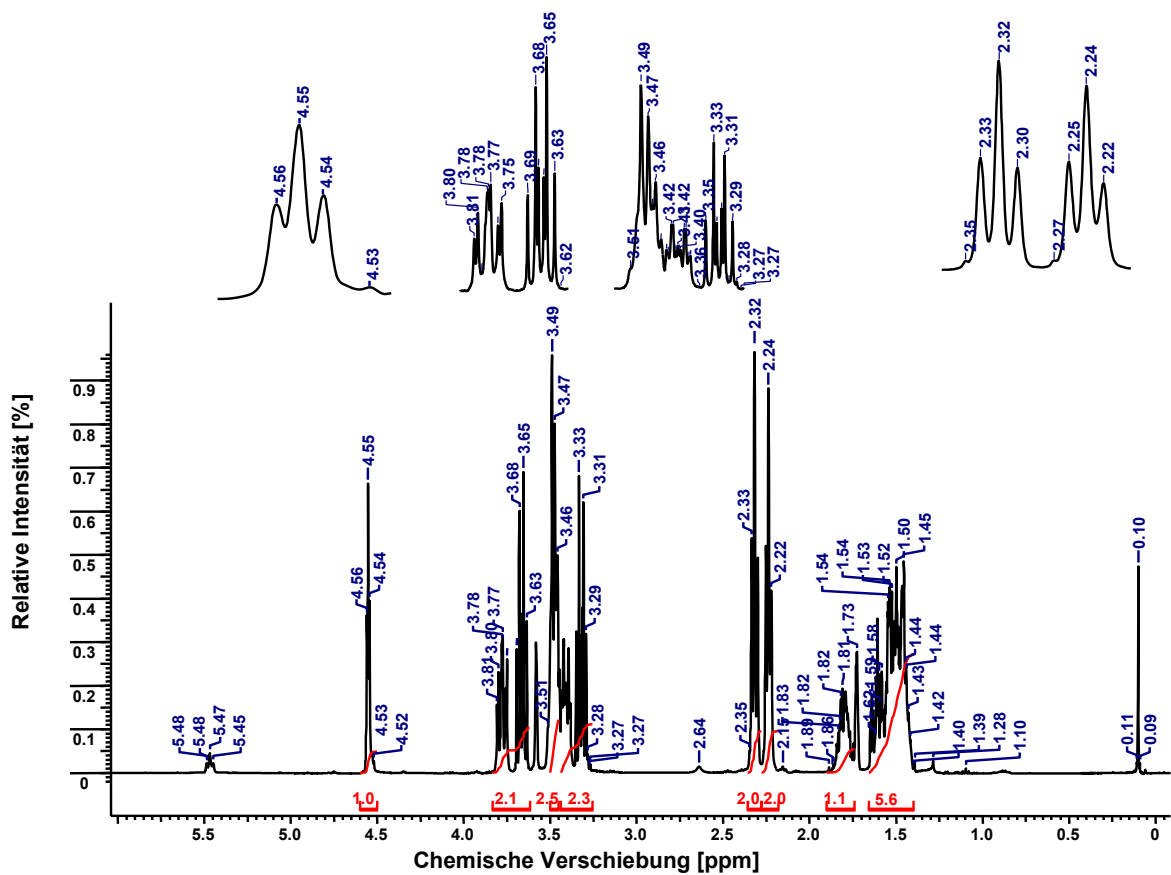
8.1.3.4 HMBC von 66

8.1.4 Spektroskopische Daten von d₂-88

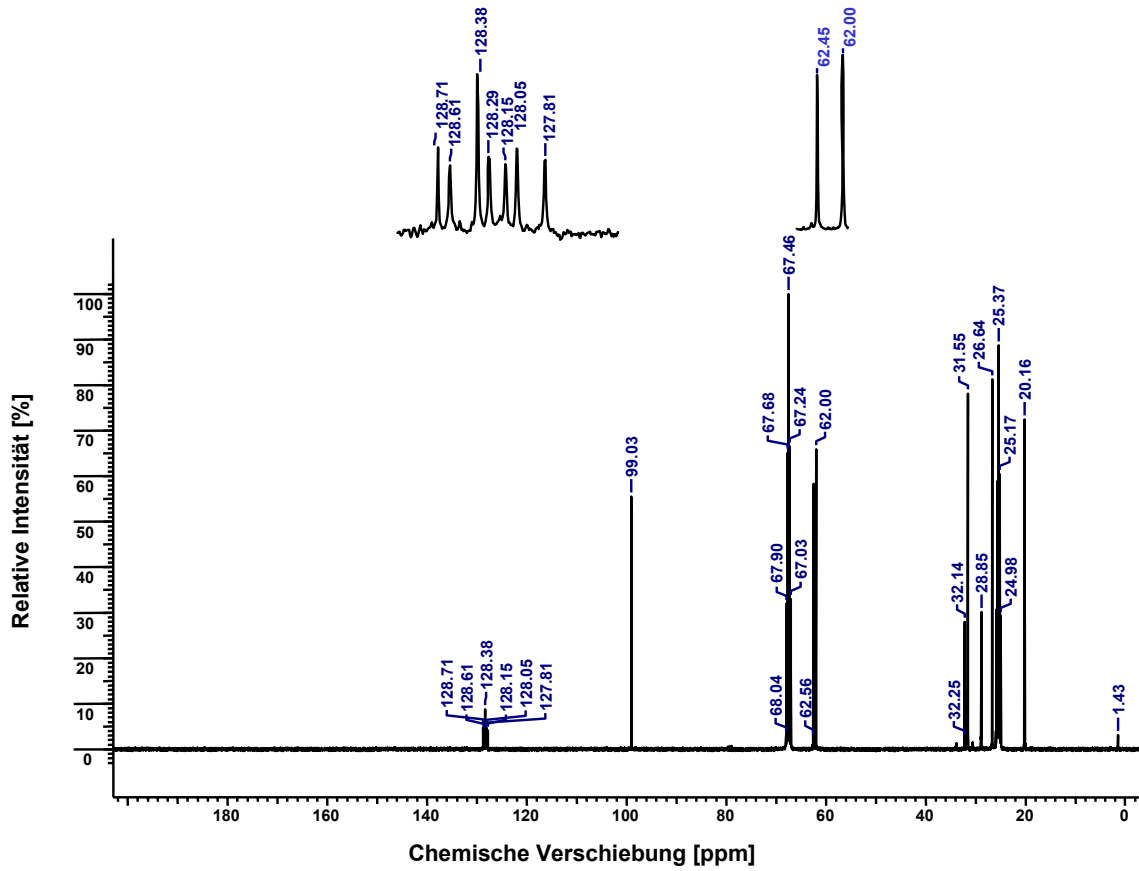
8.1.4.1 GC-EI-MS von d₂-88



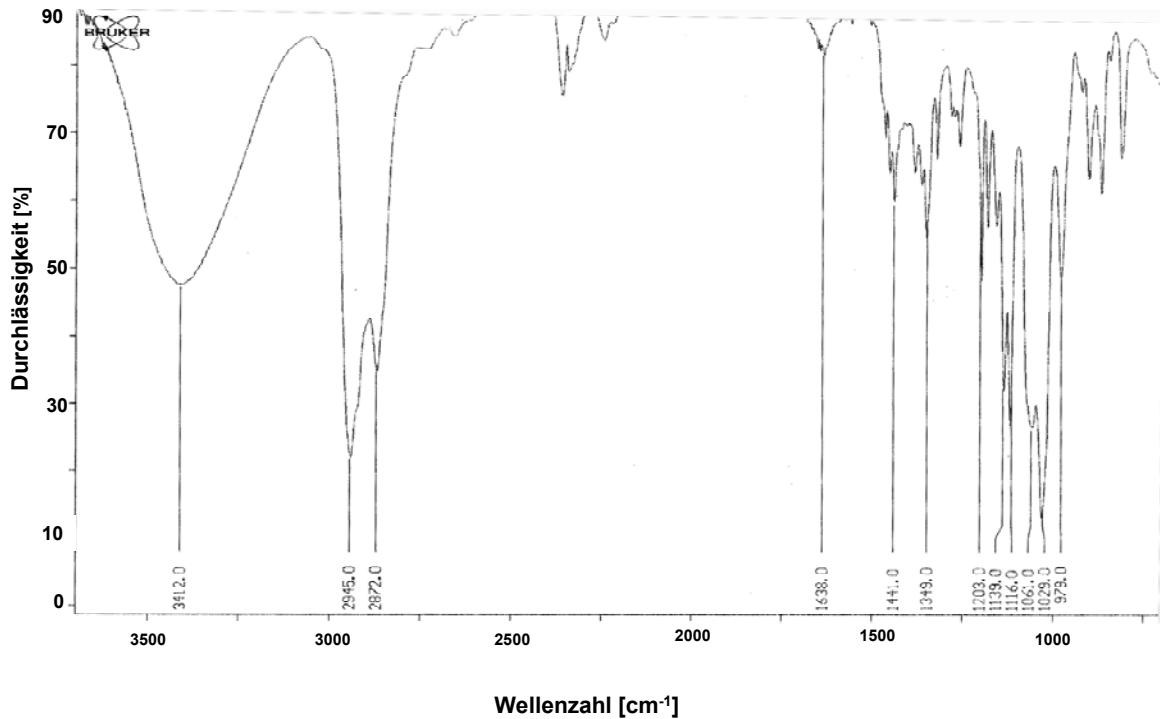
8.1.4.2 ¹H-NMR von d₂-88



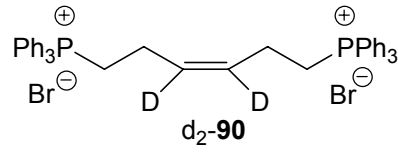
8.1.4.3 ¹³C-NMR von d₂-88



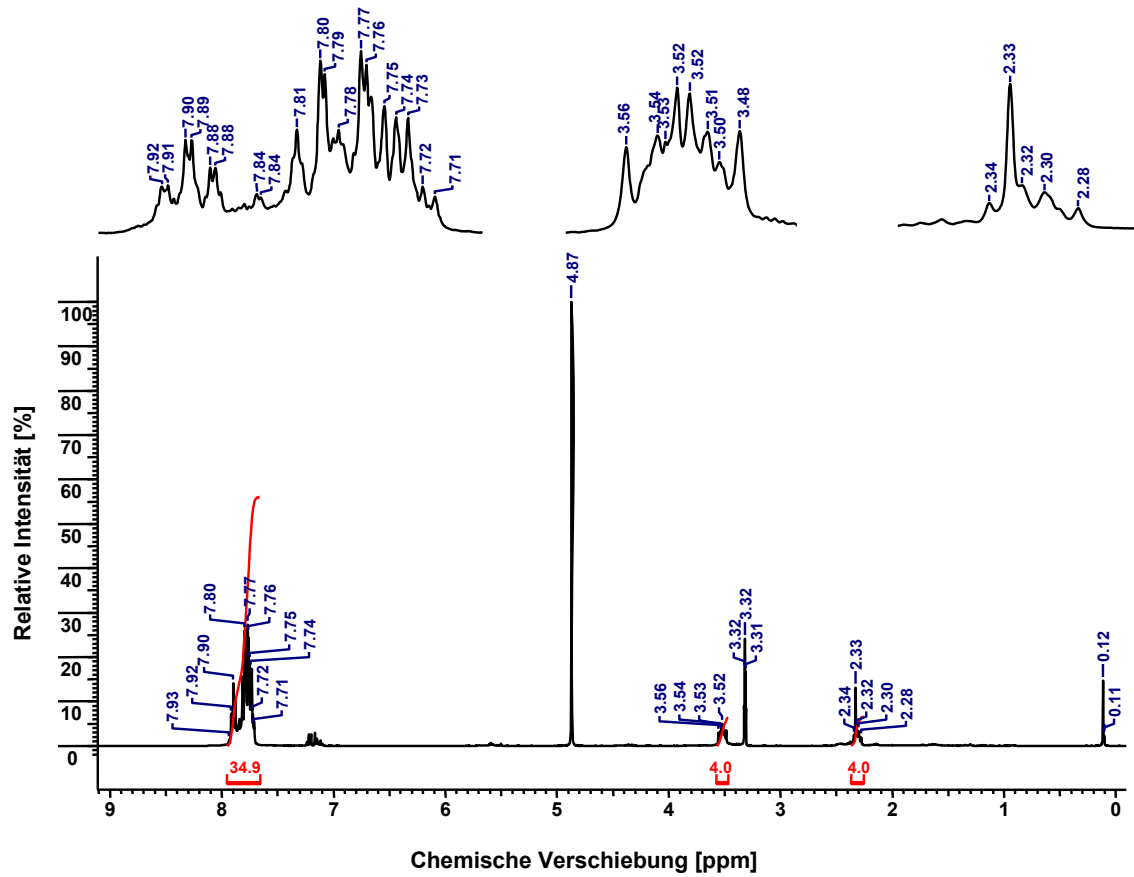
8.1.4.4 IR von d₂-88



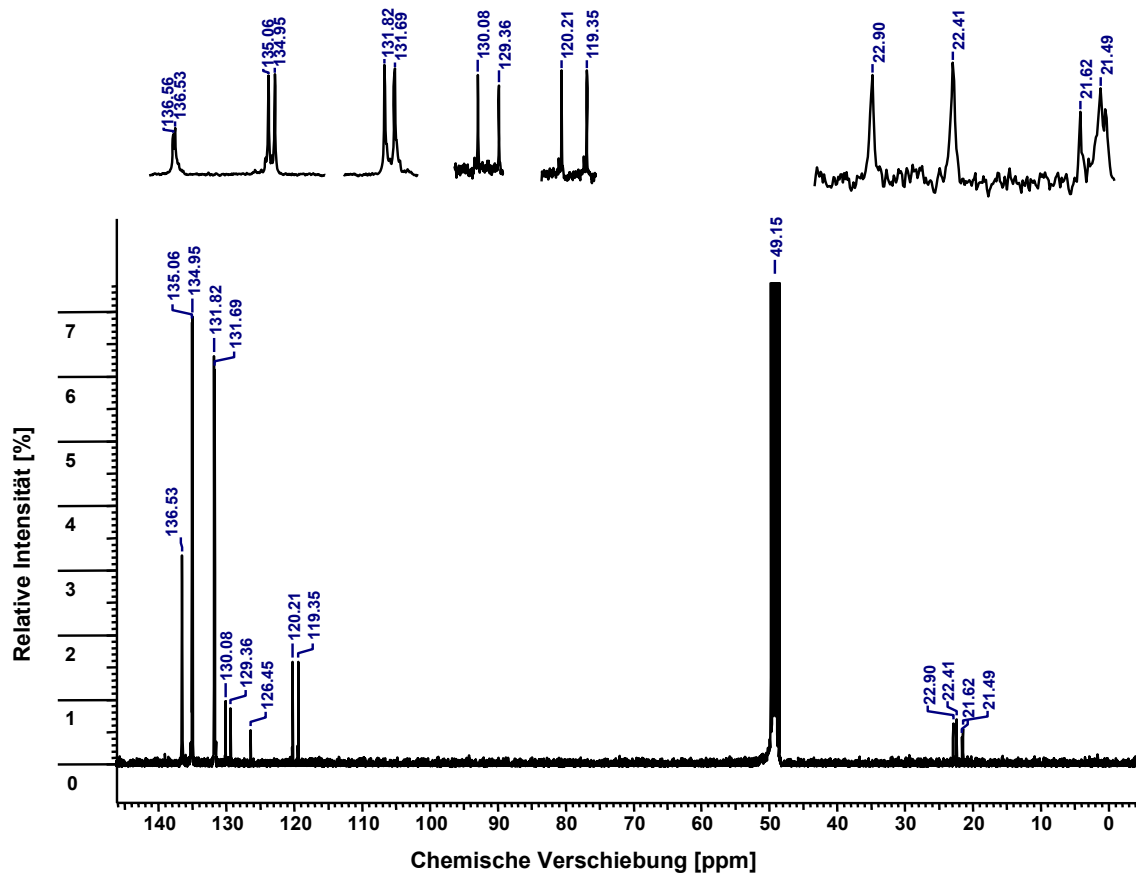
8.1.5 Spektroskopische Daten von d₂-90



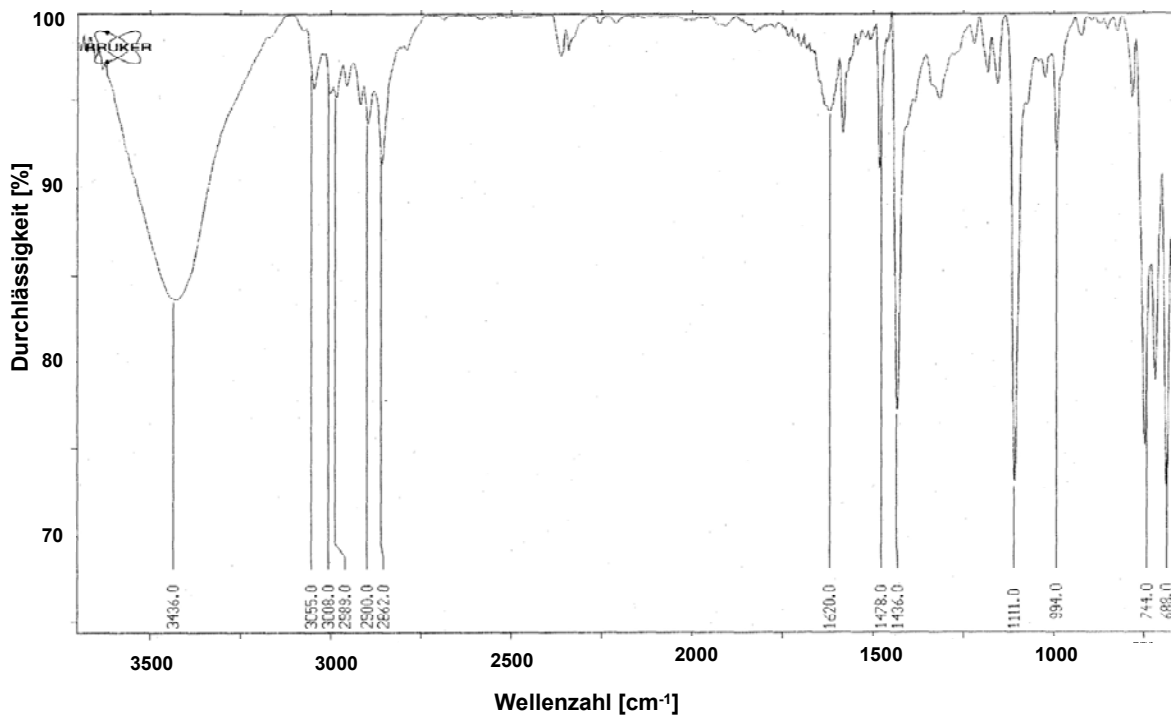
8.1.5.1 ¹H NMR von d₂-90



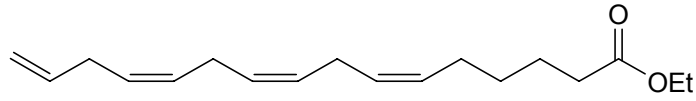
8.1.5.2 ¹³C NMR von d₂-90



8.1.5.3 IR von d₂-90

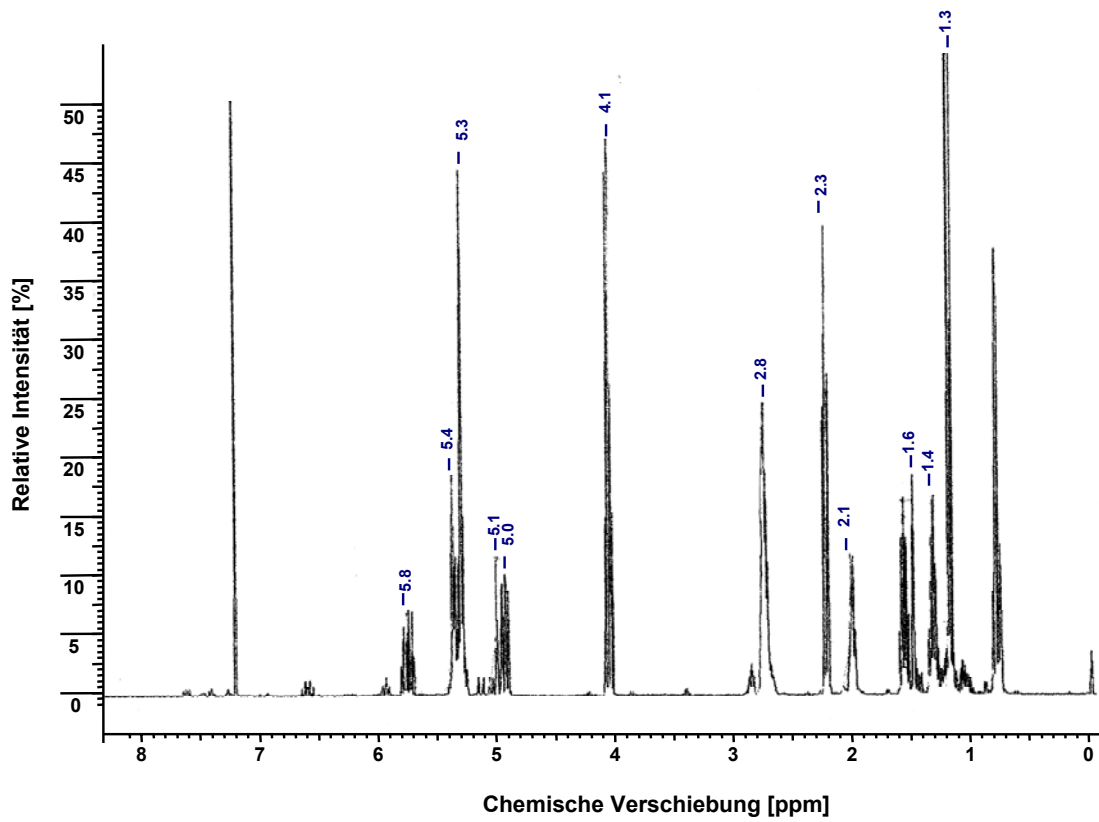


8.1.6 Spektroskopische Daten von Ethyl-6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraenoat (95)

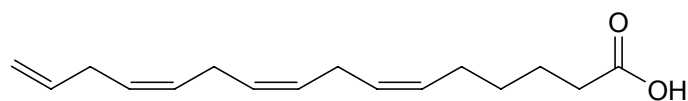


95

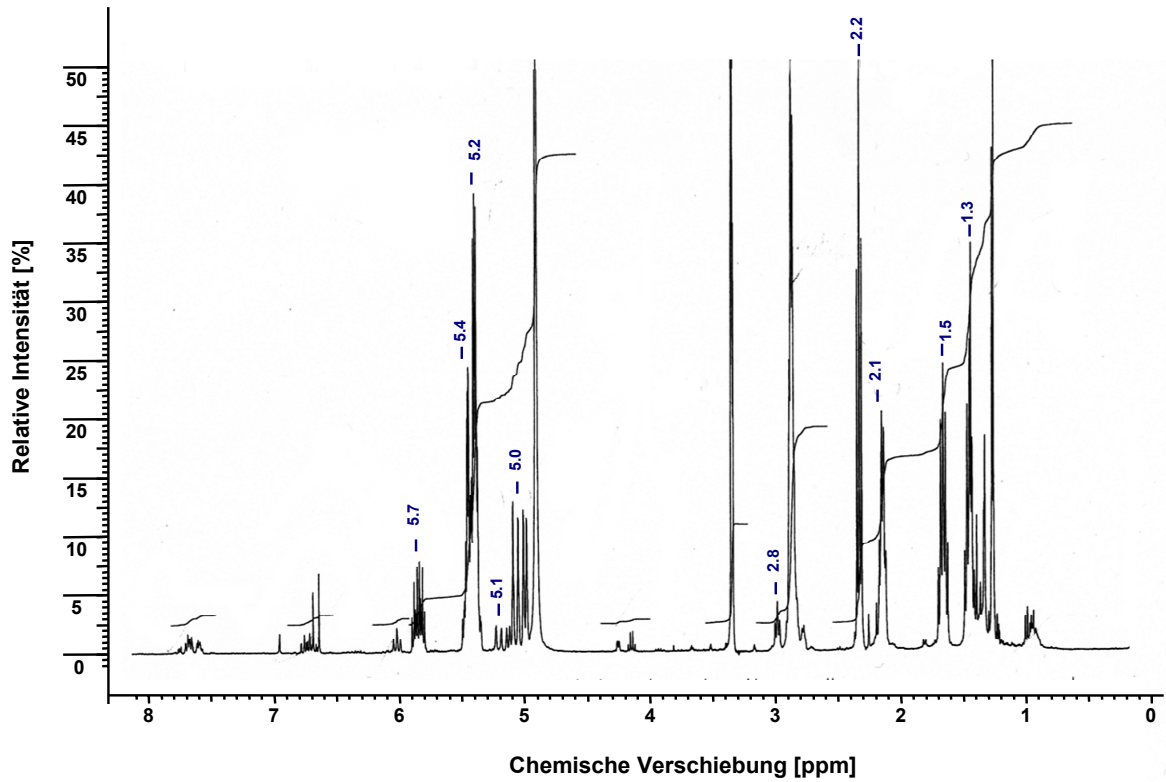
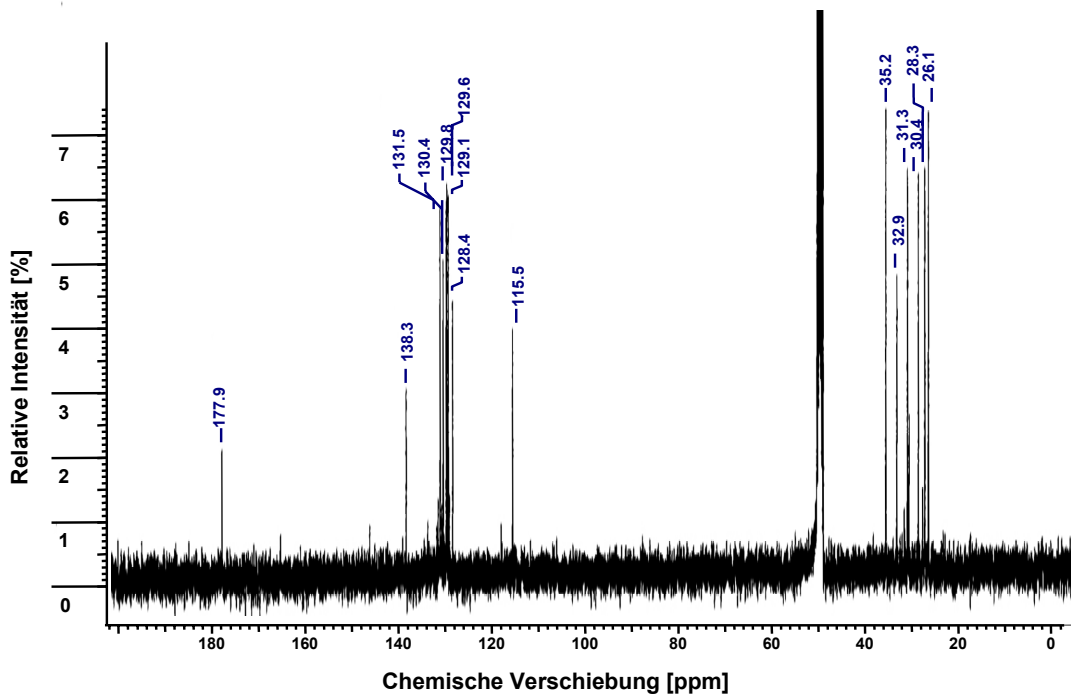
8.1.6.1 ^1H NMR von 95



8.1.7 Spektroskopische Daten von 6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraensäure (96)



96

8.1.7.1 ^1H NMR von 968.1.7.2 ^{13}C NMR von 96

8.2 Tabellenanhang

8.2.1 Caulerpeninumwandlung im Gegenwart von Lysin (64) / Cystein (73)

Das Verhältnis der Fläche der Massenspur von Caulerpenin ($m/z = 212,5-214,5$) wird relativ zum internen Standard 4'-Methoxyacetophenon ($m/z = 134,5-135,5$) in den Medien Wasser, 100 mg Lysin (64) pro ml Wasser und 100 mg Cystein (73) pro ml Wasser angegeben:

8.2.1.1 Wasser

Zeit [min]	1	2	3	4	5	MW	STD
0	0,7338	1,2574	0,5059	1,1447	1,6896	1,0663	0,4625
0,5	0,0366	0,0179	0,0082	0,0079	0,0309	0,0203	0,0131
1	0,0666	0,1292	0,0069	0,0053	0,0066	0,0429	0,0549
2	0,0000	0,0060	0,0016	0,0116	0,0192	0,0077	0,0079

8.2.1.2 100 mg Lysin (64) pro ml H₂O

Zeit [min]	1	2	3	4	5	MW	STD
0	2,5053	1,8513	0,8503	0,6071	1,2635	1,4155	0,7703
0,5	0,0228	0,0806	0,1815	0,0618	0,1254	0,0944	0,0611
1	0,0714	0,0304	0,2858	0,0382	0,0345	0,0921	0,1095
2	0,0132	0,0477	0,0357	0,0032	0,0060	0,0212	0,0196

8.2.1.3 100 mg Cystein (73) pro ml H₂O

Zeit [min]	1	2	3	4	5	MW	STD
0	0,9122	1,7348	0,7733	0,9438	0,4894	0,9707	0,4633
0,5	0,0261	0,0073	0,0482	0,0939	0,0257	0,0402	0,0333
1	0,1067	0,0572	0,0075	0,0406	0,1204	0,0665	0,0468
2	0,0464	0,0839	0,1702	0,0029	0,0191	0,0645	0,0665

8.2.2 Quantifizierung von Caulerpenin (17) und Oxytoxin 2 (46) als Halbacetal 48

8.2.2.1 Daten

Zeit [min]	IS [mAU]	17 [TIC]	17 [Rel. Int.]	48 [TIC]	48 [Rel. Int.]
0	10909,8	133727706	44,27538	0	0
0	10948,2	122700301	40,62436	0	0
0	10976,2	112753706	37,33118	0	0
0,5	10746,8	71618614	23,71193	114773873	10,6734
0,5	10541,0	85670838	28,36442	72782381	6,76841
0,5	10831,8	82462174	27,30208	40663282	3,78149
1	10923,7	49169458	16,27932	95915827	8,91971
1	10731,2	25560645	8,46277	91258604	8,48661
1	10982,4	91119737	30,16848	43927091	4,08501
2	10872,6	75006138	24,8335	127971020	11,9007
2	10922,8	27253542	9,02327	94448611	8,78326
2	10866,9	21813490	7,22214	53769879	5,00034
4	11076,9	3343781	1,10708	16355511	1,52098
4	11022,2	1456683	0,48229	4853551	0,45136
4	11089,2	7605707	2,51814	10018776	0,93170
6	10792,9	1469873	0,48666	1578296	0,146774
6	10856,6	900048	0,29799	1052173	0,09785
6	11427,2	4466242	1,47871	5120026	0,47614
8	10863,6	0	0	570796	0,05308
8	11121,3	0	0	4889135	0,45467
8	11736,1	1926901	0,63797	3040937	0,28279

8.2.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zeit [min]	MW 17 [Rel. Int.]	STD 17 [Rel. Int.]	MW 48 [Rel. Int.]	STD 48 [Rel. Int.]
0	40,74364	3,47367	0	0
0,5	26,45948	2,43801	7,07444	3,45614
1	18,30353	10,9935	7,16377	2,67507
2	13,69297	9,68992	8,56143	3,45552
4	1,36917	1,04293	0,96801	0,53574
6	0,75445	0,63428	0,24025	0,20574
8	0,21266	0,36833	0,26351	0,20149

8.2.3 Bestimmung des Aminosäuregehalts in *C. taxifolia* nach Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (69)

8.2.3.1 HCl-Hydrolyse

Gehalt der entsprechenden Aminosäure relativ zu Alanin in intakter C. taxifolia

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Asp	1,14151	1,14940	1,07532	1,13829	1,17354	1,1356	0,03642
Glu	1,27850	1,29459	1,22156	1,22260	1,25382	1,25422	0,03273
Ser	0,87251	0,83858	0,83406	0,92025	0,87828	0,86874	0,03489
His	0,14389	0,17000	0,11555	0,13048	0,13048	0,14563	0,02367
Gly	1,66818	1,65311	1,57191	1,70478	1,74489	1,66858	0,0647
Arg	0,41072	0,48442	0,43662	0,41426	0,45406	0,46875	0,03876
Tyr	0,27051	0,27042	0,25569	0,22469	0,22469	0,25993	0,02134
Trp	0,19392	0,18471	0,18668	0,18095	0,19023	0,18730	0,00499
Val	0,93021	0,97918	0,92807	0,98515	0,93636	0,95179	0,02797
Phe	0,46171	0,43411	0,44817	0,40405	0,44653	0,43891	0,02180
Ile	0,61278	0,60767	0,61758	0,58845	0,63284	0,61186	0,01612
Leu	0,84755	0,81723	0,84684	0,77843	0,82530	0,82307	0,02827
Lys (64)	0,27791	0,29812	0,28040	0,29589	0,29308	0,289080	0,00928

**Gehalt der entsprechenden Aminosäure relativ zu Alanin
in verwundeter *C. taxifolia***

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Asp	1,21972	1,22545	1,26628	1,27235	1,16083	1,22893	0,04476
Glu	1,37626	1,42571	1,41085	1,41196	1,35612	1,39618	0,02889
Ser	0,82026	0,81686	0,79828	0,90043	0,79783	0,82673	0,04247
His	0,14177	0,16351	0,13608	0,13561	0,15290	0,14597	0,01203
Gly	1,59412	1,68783	1,59415	1,65218	1,61320	1,62830	0,04086
Arg	0,41072	0,48442	0,43662	0,41426	0,45406	0,44001	0,03042
Tyr	0,22000	0,15198	0,16253	0,20870	0,16924	0,18249	0,0300
Trp	0,16679	0,13724	0,14656	0,16218	0,14098	0,15075	0,01307
Val	0,92476	0,91065	0,99701	0,90057	0,88538	0,92367	0,04344
Phe	0,46247	0,42428	0,43405	0,41751	0,41779	0,43122	0,01872
Ile	0,63827	0,61474	0,62557	0,60983	0,59799	0,61728	0,01536
Leu	0,82289	0,78616	0,80536	0,76578	0,77725	0,79149	0,02275
Lys (64)	0,20506	0,21127	0,19419	0,22806	0,18748	0,20521	0,01577

**Zusammenfassung der Verhältnisse der Aminosäuren in intakter
im Vergleich zu verwundeter *C. taxifolia***

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Asp	106,85	106,61	117,76	111,78	98,92	108,38	6,97
Glu	107,65	110,13	115,50	115,49	108,16	111,38	3,86
Ser	94,01	97,41	95,71	97,85	90,84	95,16	2,85
His	98,52	96,18	117,77	103,93	117,18	106,72	10,22
Gly	95,56	102,10	101,41	96,91	92,45	97,69	4,06
Arg	90,87	93,20	100,54	94,63	90,81	94,01	3,99
Tyr	81,33	56,20	63,57	92,88	60,80	70,96	15,52
Trp	86,01	74,30	78,51	89,63	74,11	80,51	7,02
Val	99,41	93,00	107,43	91,41	94,56	97,16	6,47
Phe	100,17	97,74	96,85	103,33	93,56	98,33	3,66
Ile	104,16	101,16	101,29	103,63	94,49	100,95	3,85
Leu	97,09	96,20	95,10	98,37	94,18	96,19	1,64
Lys (64)	73,79	70,87	69,26	77,08	63,97	70,99	4,93

8.2.3.2 Perameisensäure (75)/HCl-Hydrolyse

Gehalt der entsprechenden Aminosäure relativ zu Alanin in intakter *C. taxifolia*

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Cysteinsäure (76)	0,36600	0,39108	0,36090	0,40231	0,33548	0,37115	0,02633
Asp	0,89820	1,12058	1,17618	1,28080	1,27068	1,14929	0,15542
Glu	0,73070	1,25612	1,34617	1,48747	1,41285	1,24666	0,30075
Asn (2)	0,52242	0,95604	0,84824	0,90559	0,86054	0,81857	0,17090
Met	0,29043	0,21963	0,40031	0,28741	0,32837	0,30523	0,06603

**Gehalt der entsprechenden Aminosäure relativ zu Alanin
in verwundeter *C. taxifolia***

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Cysteinsäure (76)	0,39740	0,40308	0,39427	0,40972	0,41774	0,40444	0,00948
Asp	1,26454	1,27990	1,19882	1,23737	1,28431	1,25299	0,03541
Glu	1,60852	1,62798	1,50972	1,46126	1,53005	1,54751	0,06959
Asn (2)	0,93098	0,83360	0,85202	0,84246	0,87361	0,86654	0,03898
Met	0,25547	0,28238	0,23803	0,23801	0,26592	0,25596	0,01898

**Zusammenfassung der Verhältnisse der Aminosäuren in intakter im Vergleich zu
verwundeter *C. taxifolia***

Aminosäure	1	2	3	4	5	MW	STD
Cysteinsäure (76)	108,58	103,07	109,25	101,84	124,52	109,45	9,04
Asp	140,79	114,22	101,92	96,61	101,07	110,92	17,93
Glu	220,13	129,60	112,15	98,24	108,29	133,68	49,64
Asn (2)	178,21	87,19	100,45	93,03	101,52	112,08	37,42
Met	87,96	128,57	59,46	82,81	80,98	87,96	25,18

8.2.4 Bioassays

8.2.4.1 Aufenthalte von *Dulichella* spp. auf künstlichem Futter auf Basis der Kontrollalge *Ulva* spp. (Kon.) bzw. intakter *C. taxifolia* (Caul. int.)

Zeit [min]	1		2		3		4		5		6	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5		x		x								
10				x								
15				x	x					x		
20				x						x		x
25		x		x						x		x
30				x						x		x
35				x	x			x		x		x
40				x				x		x		x
45		x		x	x			x		x		x
50				x	x			x		x		x
55		x		x	x			x		x		x
60				x	x			x		x		x
65				x	x			x		x		x
70				x	x			x		x		x
75				x	x					x		x
80				x	x					x		x
85				x	x					x		x
90				x	x					x		x

Zeit [min]	7		8		9		10		11		12	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5									x			
10												
15								x				
20						x				x		
25				x		x						
30						x		x				
35						x		x				
40	x					x		x				
45						x		x				
50				x		x		x				
55				x		x		x			x	
60				x		x		x			x	
65				x		x		x			x	
70	x					x		x				
75	x					x		x				
80	x			x		x		x	x			
85	x			x		x		x	x			
90	x			x		x		x	x			

8.2.4.2 Aufenthalte von *Elasmopus levis* auf künstlichem Futter auf Basis der Kontrollalge *Ulva* spp. (Kon.) bzw. intakter *C. taxifolia* (Caul. int.)

Zeit [min]	1		2		3		4		5		6	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5									x			x
10		x		x					x		x	
15		x		x					x		x	
20		x		x	x				x		x	
25		x		x		x			x		x	
30		x		x		x			x		x	
35		x		x		x			x		x	
40		x		x		x			x		x	
45		x				x			x		x	
50		x				x			x		x	
55		x		x		x			x			x
60		x				x			x			
65		x				x			x		x	
70		x				x			x		x	
75		x				x			x		x	
80		x		x		x			x		x	
85		x		x	x				x		x	
90		x		x	x				x		x	

Zeit [min]	7		8		9		10		11		12	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5		x		x						x	x	x
10		x								x		x
15		x							x			x
20		x							x			x
25		x		x	x			x	x			x
30		x		x	x			x	x			x
35		x		x	x			x	x			x
40		x		x	x			x	x			x
45		x		x		x		x	x			x
50		x		x	x			x	x			x
55		x		x	x			x	x			x
60		x		x	x			x	x			x
65		x		x	x			x	x			x
70		x		x	x			x	x			x
75		x		x	x			x	x			x
80		x		x	x			x	x			x
85		x		x	x			x	x			x
90		x		x	x			x	x			x

8.2.4.3 Aufenthalte von *Paracereis caudata* auf künstlichem Futter auf Basis der Kontrollalge *Ulva* spp. (Kon.) bzw. intakter *C. taxifolia* (Caul. int.)

Zeit [min]	1		2		3		4		5		6	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5	x			x							x	
10	x			x			x			x	x	
15	x			x	x					x	x	
20	x			x	x					x	x	
25	x			x	x					x	x	
30	x			x	x					x	x	
35	x			x	x					x	x	
40	x			x	x					x	x	
45	x			x	x					x	x	
50	x			x	x					x	x	
55	x			x	x					x	x	
60	x			x	x					x	x	
65	x			x	x					x	x	
70	x			x	x					x	x	
75	x			x	x					x	x	
80	x			x	x					x	x	
85	x			x	x					x	x	
90	x			x	x					x	x	

Zeit [min]	7		8		9		10		11		12	
	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.	Kon.	Caul int.
5		x								x	x	
10		x			x		x			x	x	
15		x	x		x		x		x		x	
20		x	x			x		x		x		x
25		x	x		x		x		x		x	
30		x	x		x		x		x		x	
35		x	x		x		x		x		x	
40		x	x		x		x		x		x	
45		x	x		x		x		x		x	
50		x	x		x		x		x		x	
55		x	x		x		x		x		x	
60		x	x		x		x		x		x	
65		x	x		x		x		x		x	
70		x	x		x		x		x		x	
75		x	x		x		x		x		x	
80		x	x		x		x		x		x	
85		x	x		x		x		x		x	

8.2.4.4 Aufenthalte von *Elasmopus levis* auf künstlichem Futter auf Basis von intakter (Caul. int.) bzw. verwundeter *C. taxifolia* (Caul. verw.)

Zeit [min]	1		2		3		4		5		6	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5									x			
10	x		x				x		x			x
15	x		x		x		x		x			x
20	x		x			x		x	x			x
25	x		x			x		x	x			x
30	x		x			x	x		x			x
35	x					x	x		x			x
40	x		x			x	x		x			x
45	x		x			x	x		x			x
50	x		x			x	x		x			x
55	x		x			x	x		x			x
60	x		x			x	x		x			x
65	x		x			x	x		x			x
70	x		x			x	x		x			x
75	x		x			x	x		x			x
80	x		x			x	x		x			x
85	x		x			x	x		x			x
90	x		x			x	x		x			x

Zeit [min]	7		8		9		10		11		12	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5					x		x		x			
10					x		x		x			
15					x		x		x			
20					x		x		x			
25					x		x		x			
30					x				x		x	
35			x		x			x	x		x	
40	x		x		x			x	x		x	
45	x		x			x		x	x		x	
50	x		x		x			x	x		x	
55			x		x			x	x		x	
60			x		x			x	x		x	
65			x		x			x	x		x	
70			x		x			x	x		x	
75			x		x			x	x		x	
80			x		x			x	x		x	
85			x		x			x	x		x	
90	x		x		x			x	x		x	

Zeit [min]	13		14		15		16		17		18	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5	x				x							
10	x				x							
15	x				x						x	
20	x		x		x						x	
25	x				x						x	
30	x				x						x	
35	x				x						x	
40	x				x							
45	x				x							
50	x				x							
55	x				x							
60	x				x							
65	x				x							
70	x				x							
75	x				x							
80	x				x							
85	x				x							
90	x				x							

Zeit [min]	19		20		21		22		23		24	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5	x				x		x				x	
10	x						x				x	
15	x						x				x	
20	x		x				x				x	
25			x				x				x	
30	x		x				x				x	
35	x		x				x				x	
40	x		x		x		x				x	
45	x		x		x		x				x	
50	x		x		x		x				x	
55	x		x		x		x				x	
60	x		x		x		x				x	
65	x		x		x		x				x	
70	x		x		x		x				x	
75	x		x		x		x				x	
80	x		x		x		x				x	
85	x		x		x		x				x	
90	x		x		x		x				x	

Zeit [min]	25		26		27		28		29		30	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5												
10							x					
15			x				x		x			
20			x				x					
25		x	x				x		x		x	
30		x	x		x		x					
35		x			x		x		x			
40		x		x			x					
45		x		x			x					
50		x		x			x		x			
55		x	x									
60		x	x				x					
65		x	x				x					
70		x	x				x					
75		x	x				x					
80		x					x					
85		x					x					
90		x	x				x					

Zeit [min]	31		32		33		34		35		36	
	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.	Caul int.	Caul verw.
5												
10									x			x
15									x			x
20									x			x
25									x			x
30			x						x			x
35									x			x
40									x			x
45			x						x			x
50	x		x						x			x
55	x		x						x			x
60	x		x						x			x
65	x		x						x			x
70	x		x						x			x
75	x		x							x		x
80	x		x							x		x
85	x		x							x		x
90	x		x							x		x

8.2.4.5 Aufenthalte von *Elasmopus levis* auf künstlichem Futter auf Basis der Kontrollalge *Ulva* spp. (Kon.) bzw. der Kontrollalge *Ulva* spp. + 0,5 % w/w Caulerpenin (17) (Kon. + 17)

Zeit [min]	1		2		3		4		5		6	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5					x							
10			x		x					x		
15	x		x		x					x		
20	x		x		x					x		
25	x		x		x					x		
30	x		x		x					x		
35	x		x		x							
40	x		x		x							
45	x		x		x							
50	x		x						x			
55	x		x						x			
60	x		x						x			
65	x		x						x			
70	x		x			x			x			
75	x		x			x			x			
80	x		x			x			x			
85	x		x						x			
90	x		x			x			x			

Zeit [min]	7		8		9		10		11		12	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5												
10					x							
15							x					
20							x			x		
25			x				x			x		
30							x			x		
35							x			x		
40							x			x		
45							x			x		
50		x	x				x			x		
55		x	x				x			x		
60		x	x				x			x		
65		x	x				x			x	x	
70		x	x				x			x	x	
75		x	x				x			x	x	
80		x					x			x	x	
85		x					x			x	x	
90		x					x			x	x	

Zeit [min]	13		14		15		16		17		18	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5						x						
10		x				x						
15		x				x						
20		x				x			x			
25		x				x			x			
30						x			x			
35						x			x			
40					x				x		x	
45					x				x		x	
50					x				x		x	
55						x			x		x	
60						x					x	
65						x					x	
70						x			x			x
75						x			x			x
80						x			x			x
85						x			x			x
90				x		x			x			x

Zeit [min]	19		20		21		22		23		24	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5												
10												
15												
20												
25	x											
30												
35												
40												
45												
50												
55												
60												
65				x		x	x					
70				x			x		x			
75				x			x		x			
80				x	x		x		x			
85	x				x					x		
90	x				x							

Zeit [min]	25		26		27		28		29		30	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5				x				x			x	
10				x				x				x
15				x		x		x			x	
20				x				x			x	
25				x				x		x		x
30				x				x		x		x
35	x			x				x		x		x
40	x			x				x		x		x
45	x			x				x		x		x
50	x			x	x			x		x		x
55	x			x	x			x		x		x
60	x			x	x			x		x		x
65	x			x	x			x		x		x
70	x			x	x			x		x		x
75	x			x	x			x		x		x
80	x			x	x			x		x		x
85	x			x	x			x		x		x
90	x			x	x			x		x		x

Zeit [min]	31		32		33	
	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17	Kon.	Kon. + 17
5	x					
10		x	x			x
15		x				x
20	x				x	
25	x					x
30		x				
35		x				x
40		x				x
45		x				
50		x				x
55		x				
60		x		x		
65		x				
70		x				
75		x				x
80		x				x
85		x				x
90		x				x

Danksagung

Ich möchte mich bei alle bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Georg Pohnert, der meine Ausbildung zum Chemiker seit dem Vordiplom maßgeblich beeinflusst und meinen Blick für die chemische Ökologie geöffnet hat. Ich danke ihm für die interessante Aufgabenstellung, das richtige Verhältnis von Hilfestellung und dem Gewähren vieler Freiheiten, seinen kritischen wissenschaftlichen Blick, seine Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Prof. Dieter Klemm, für die freundliche, unkomplizierte Betreuung und sein großes Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Wilhelm Boland für die Möglichkeit, den Großteil meiner Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen sowie für die Bereitstellung der Geräte und Verbrauchsmaterialien, die finanzielle Unterstützung in der Anfangszeit meiner Promotion vor der Förderung durch die DFG und die Unterstützung meines wissenschaftlichen Werdegangs.

Der gesamten Arbeitsgruppe Boland danke ich für die Unterstützung und die freundliche Atmosphäre, die dazu beigetragen hat, dass ich mich im Institut immer wohl gefühlt habe. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Dr. Rita Büchler für die Einführung in die SDS-PAGE und ihre Hilfe, wenn Probleme damit auftraten.

Vera David für die Herstellung von Unmengen an sterilem Seewasser für die Algenkulturen.

Grit Winnefeld für die Hilfe bei allen bürokratischen Problemen.

Dr. Axel Mithöfer für die interessanten Ratschläge bei biologischen Fragen und die meistens ausgeglichenen Kickerspiele.

Dr. Dieter Spittler, Andreas Habel und Dr. Christoph Beckmann für die Hilfestellung bei Fragen zu chemischen Synthesen.

Dr. Stefan Bartram, für wirklich nützliche Computerprogramme, das passende Werkzeug zum Reparieren aller Geräte und die richtigen Ratschläge, wenn das Gerät nach dem Zusammenbauen dann doch nicht funktionierte.

Kerstin Ploss, Doreen Schachtschabel und Heiko Maischak für das Schicken von Daten, Messungen und das Organisieren wichtiger Dinge, als ich schon in Lausanne war.

Prof. Martin Heil und Dr. Christian Kost für die Hilfe bei statistischen Fragen zu den Bioassays.

Meinen Laborkollegen Dr. Thomas Wichard und Dr. Ulrich Lion für das Praktizieren interdisziplinären Arbeitens in einem Labor, die gegenseitige Erweiterung unseres Musikspektrums und eine gute Zeit in Jena.

Birgit Schulze für das Korrekturlesen meiner Arbeit, interessante Diskussionen am späten Abend und den unerschöpflichen Vorrat an Essen, wenn es mal wieder länger dauerte.

Jens Ille für die Lösung sämtlicher logistischer Probleme und die unermüdliche Ein- und Ausfuhr von Algen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei:

Dr. Verena Jung für die hervorragende Vorarbeit in ihrer Dissertation, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Ergebnisse zu erzielen. Für die unialgalen Kulturen von *C. taxifolia*, die ohne ihren grünen Daumen wohl nie in Jena etabliert worden wären, die tolle Zeit am MPI für chemische Ökologie in Jena und das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Janine Rattke für die Erklärung und die gemeinsamen Reparaturen der LCQ, Kickerspiele, interessante Diskussionen über HPLC/MS und Mathematik, das Umwandeln meines chaotischen Labors in einen nutzbaren Arbeitsplatz vor dem gemeinsamen Durchführen diverser SDS-PAGEs, das Überreden zum Joggen und das kritische Lesen meiner Dissertation.

Ich danke auch den Serviceabteilungen des MPI für chemische Ökologie, allen voran Dr. Renate Ellinger und Dr. Bernd Schneider, für das Messen und die Hilfe bei der Auswertung mehrdimensionaler NMR-Spektren.

Darüber hinaus danke ich Dr. Ales Svatos und extern Susanne Heggemann für die Maldi-ToF-Messungen. Vom HKI in Jena danke ich Andrea Perner für die Messung der hochaufgelösten LC/MS-Spektren, Clemens Ostrowicz und Dr. Stefan Heine für das Scannen fluoreszent markierter SDS-Gele sowie Dr. Gerhard Wieland für die konfokale Mikroskopie. Ich danke dem Lehrstuhl von Prof. Popp, insbesondere Dr. Marion Strehle und Dr. Petra Rösch, für die Untersuchung meiner Algenproben mit Raman-Mikroskopie.

Von der École Polytechnique Fédérale de Lausanne danke ich Christina Zamanos-Epreman für die Hilfe bei der Überwindung bürokratischer Hürden, Dr. Marc Moniatte und Diego Chiappe von der Proteomics Core Facility für den Versuch, den Ursprung der 20 kDa Bande aufzuklären, Giovanni Petrucci und Gladys Pache aus dem magasin für die

Versorgung mit allen, für ein funktionierendes Labor benötigten, Materialien und die engstgleiche Geduld bei meinen brüchigen französischen Erklärungsversuchen, was ich nun eigentlich brauche sowie Dr. Martial Rey und Nicolas Aeby für die Einführung in die NMR-Software der EPFL und die Messzeit am 500 MHz NMR. Des Weiteren danke ich der Gruppe von Prof. Dyson und Dr. Alain Razaname für das zeitweise Überlassen ihrer Massenspektrometer sowie ganz besonders Dr. Zacharias Grote für die Bereitstellung der präparativen HPLC sowie die Einführung in das Lausanner Nachtleben und die Ausflüge in die Berge. Außerdem bedanke ich mich bei der „neuen“ Lausanner Arbeitsgruppe, Jerrit Weissflog, Alexandra Barofsky, Matthew Welling und Charles Vidoudez.

Im Speziellen danke ich Dr. Theresa Wiesemeier für die Betreuung der Flohkrebse, das gemeinsame Bewältigen des Aufbaus eines Labors in der Schweiz, guten Rotwein und schlechtes Bier sowie hervorragende wissenschaftliche und private Diskussionen und das Korrekturenlesen meiner Dissertation.

Bei der Carbogen Amcis AG danke ich Eva Donauer, Franz Breitfeld und Peter Pfaff für die Unterstützung meines Tages- und das ungebrochene Interesse an meiner Nachtarbeit, Sabine Ackermann, Rebekka Wölfle, Mario Brogle, Lenka Habenicht, Karin Sandmaier und Milan Honegger für die Ausflüge in das Nacht- und Kulturleben der Schweiz sowie eine wirklich gute Zeit in Aarau und Umgebung.

Ich danke ganz herzlich Anna Wiesemeier und Meike Horst für die unschätzbare Hilfe bei der Endformatierung und Korrektur, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich immer noch schlecht formatiert und voller Fehler wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frauke Pfeiffer, die daran geglaubt hat, dass aus mir ein brauchbarer Chemiker wird, mich trotz allen noch so ausgefallenen Arbeitszeiten, -interessen und -orten immer unterstützt hat und immer für mich da war.

Ich danke von ganzem Herzen meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich immer zählen kann und die mir all dies ermöglicht haben.

Curriculum Vitae

Name: Sven Adolph
geboren am: 01. August 1974 in Herford

Schulabschluss

Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife am Widukind-Gymnasium,
Enger, Deutschland

Zivildienst

Oktober 1994–Oktober 1995 DRK Kreisverband Herford-Land e.V., Deutschland

Ausbildung

Oktober 1995–September 1997 Ausbildung zum staatlich geprüften Umweltschutz-
technischen Assistenten an der Dr.-Kurt-Blindow-
Schule, Bückeberg, Deutschland

Studium

Oktober 1997–September 2002 Studium Diplom-Chemie (Umweltchemie) an der
Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland
Abschluss: Diplom-Chemiker (Umweltchemie)

Praktische Erfahrungen

Februar–März und
August–September 2000 Praktikum bei der Dynamit Nobel GmbH, Troisdorf,
Deutschland

März 1999–Dezember 2001 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für
chemische Ökologie, Jena, Deutschland

Promotion

Januar 2003–Juli 2005	Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena, Deutschland
August 2005–Juni 2006	École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Schweiz

Anstellung

Seit Juli 2006	Analytischer Chemiker bei der Carbogen-Amcis AG in Hunzenschwil, Schweiz
----------------	--

Veröffentlichungen

Publikationen

R. Schirra, H. G. Emans, L. Lichtblau, S. Adolph, "Nitration and hydrolysis procedure for the production of the plastic explosive DNDA", *Patent* **2003**, DE 2001-10142126 20010830.

G. Pohnert, O. Lumineau, A. Cueff, S. Adolph, C. Cordevant, M. Lange, S. Poulet, "Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods?", *Marine Ecology Progress Series* **2002**, 245, 33.

S. Adolph, S. A. Poulet, G. Pohnert, "Synthesis and biological activity of alpha, beta, gamma, delta-unsaturated aldehydes from diatoms", *Tetrahedron* **2003**, 59, 3003.

S. Adolph, S. Bach, M. Blondel, A. Cueff, M. Moreau, G. Pohnert, S. A. Poulet, T. Wichard, A. Zuccaro, "Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla", *Journal of Experimental Biology* **2004**, 207, 2935.

G. Pohnert, S. Adolph, T. Wichard, "Short synthesis of labeled and unlabeled 6Z,9Z,12Z,15-hexadecatetraenoic acid as metabolic probes for biosynthetic studies on diatoms", *Chemistry and Physics of Lipids* **2004**, 131, 159.

S. Adolph, V. Jung, J. Rattke, G. Pohnert, "Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker", *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 2806.

J. Weissflog, S. Adolph, T. Wiesemeier, G. Pohnert, "Reduced herbivory through wound activated protein depletion by the invasive macroalga *Caulerpa taxifolia*", *ChemBioChem*, in press.

Vorträge

S. Adolph, G. Pohnert, "Untersuchungen zum Wundverschluss der Grünalge *Caulerpa taxifolia*", IV. Symposium Hochschule trifft Industrie, Wermelskirchen, 10.–12. November 2005.

S. Adolph, G. Pohnert, "A new biopolymer as wound-plug in the green alga *Caulerpa taxifolia*", Institutssymposium 2004 des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie, Jena, 30.–31. Januar 2004.

S. Adolph, G. Pohnert, "Synthese und biologische Aktivität von $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyden aus Diatomeen", Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstofftreffen, Jena, 28. April 2003.

Poster

S. Adolph, V. Jung, J. Rattke, G. Wieland, G. Pohnert, "The role of secondary metabolites in the wound response of *Caulerpa taxifolia*", XI 004.

Selbstständigkeitserklärung

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

Jena, 18. Januar 2008