

# Coronatin-Analoga: molekulare Sonden für pflanzliche Signalwege

## 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

Göde Schüler

geboren am 27.9.1971 in Bochum

Gutachter:

1. Prof. Ernst Anders

2. Prof. Wilhelm Boland

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.03.2001

für Julia

und meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	VERTEIDIGUNGSSYSTEME VON PFLANZEN .....	1
1.1.1	<i>Konstitutive chemische Verteidigung</i> .....	2
	Seltene Aminosäuren.....	2
1.1.2	<i>Aktivierte chemische Verteidigung</i> .....	3
	Blausäure.....	3
	Senföle .....	4
1.1.3	<i>Induzierte chemische Abwehr</i> .....	4
1.1.4	<i>Tritrophe und multitrophe Systeme</i> .....	6
1.2	SIGNALTRANSDUKTION IN HÖHEREN PFLANZEN .....	7
1.2.1	<i>Signalweg der Wundantwort</i> .....	8
	Octadecanoide .....	8
	Ethylen.....	10
1.2.2	<i>Signalweg bei Pathogenbefall und SAR</i> .....	11
	Hypersensitive Reaktion .....	11
	Systemisch erworbene Resistenz (SAR) .....	11
	Salicylsäure .....	12
1.2.3	<i>Wechselwirkungen zwischen JA, Ethylen und SA</i> .....	13
1.3	PSEUDOMONADEN ALS PATHOGENE.....	13
1.3.1	<i>Pseudomonas syringae pv. glycinea</i> .....	13
1.3.2	<i>Coronatin und der Indanoyl-Isoleucinmethylester</i> .....	13
1.4	DUFTEMISSION BEI PHASEOLUS LUNATUS.....	18
2	AUFGABENSTELLUNG.....	21
2.1	PHOTOAFFINITÄTSMARKER .....	21
2.2	CORONATIN-ANALOGA.....	22
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	23
3.1	PHOTOAFFINITÄTSMARKER .....	23
3.1.1	<i>Auswahl einer photolabilen Gruppe</i> .....	25
	Arylazide.....	25
	Benzophenone .....	26
	Diazirine .....	27
3.1.2	<i>Übertragung auf das Indanongerüst</i> .....	27
3.1.3	<i>Synthese des Photoaffinitätsmarkers</i> .....	28

---

3.1.4	<i>Test der biologischen Aktivität</i> .....	33
	Duftstoff-Biosynthese.....	33
	Rankenkrümmung („tendriling“).....	35
	Genexpression von JIP 23 in Gerstenblättern.....	36
3.1.5	<i>Photolyse und Ausbildung eines reaktiven Intermediates</i> .....	38
3.1.6	<i>Bestimmung der Reaktionsordnung bei Zerfall</i> .....	40
3.1.7	<i>Überprüfung der Reaktionsfähigkeit mit Makromolekülen</i> .....	42
3.1.8	<i>Fluoreszenz des Zerfallsproduktes</i> .....	43
3.2	<b>CORONATIN-ANALOGA</b> .....	47
3.2.1	<i>Bedeutung und Nutzen</i> .....	47
3.2.2	<i>Synthesen von Coronafacinsäure</i> .....	48
3.2.3	<i>Strukturüberlegungen</i> .....	48
3.2.4	<i>Synthese</i> .....	50
3.2.5	<i>Biologische Aktivität</i> .....	55
	Duftstoff-Biosynthese.....	55
	Rankenkrümmung.....	57
	Endogene Salicylatlevel.....	58
	Genexpression von JIP 23 in Gerste.....	59
	Nikotin-Induktion in Tabakpflanzen.....	60
	Induktion der Biosynthese von Benzo[c]phenanthridinen.....	62
3.3	<b>UNTERSUCHUNGEN AN PFLANZLICHEN SIGNALWEGEN</b> .....	63
3.3.1	<i>Vergleich von Duftprofilen nach Behandlung mit verschiedenen Indanoyl-Konjugaten</i> .....	63
	Homoterpene und Methylsalicylat.....	64
	Terpenoide und andere Duftstoffe des durch JA-induzierten Duftmusters.....	65
3.3.2	<i>„Crosstalk“ – Die Wirkung von Salicylat auf den Octadecanoidweg</i> .....	68
	Quantifizierung der 12-Oxophytodiensäure.....	70
	Ergebnisse.....	71
3.3.3	<i>Überlegungen zur induzierten Homoterpen / Methylsalicylat-Biosynthese</i> .....	72
3.3.4	<i>Verbesserte Methoden zur Quantifizierung von organischen Säuren</i> .....	74
3.3.5	<i>Induktion der Glyceollinproduktion an Sojabohnen</i> .....	79
	Einleitung.....	79
	Ergebnisse.....	80
	Identifizierung eines neuen Flavons der Sojabohne.....	81
3.3.6	<i>Analytik zur Identifikation von Phytoalexinen in der Limabohne</i> .....	83
3.3.7	<i>Photoakustikspektroskopie für Isopren</i> .....	85
	Funktionsweise der Photoakustikspektroskopie.....	85
	Synthese des Dideutero-Isoprens.....	87
	Infrarotspektren der Isoprene.....	88
	Praktische Anwendung.....	89

---

4	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
5	EXPERIMENTELLER TEIL .....	95
5.1	MATERIALIEN, GERÄTE UND METHODEN .....	95
5.1.1	Geräte.....	95
5.1.2	Materialien und Methoden .....	96
	Chemikalien .....	96
	Pflanzen.....	96
	Bakterien.....	96
	Medien.....	96
	Methoden und Versuchsbedingungen .....	97
5.2	SYNTHESEN.....	102
	3-(2-Carboxyphenyl)propansäure.....	102
	2-(2-Carboxyethyl)-5-nitrobenzoesäure .....	102
	5-Amino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure .....	103
	5-Acetylamino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure.....	104
	6-Acetylamino-1-oxo-indan-4-carbonsäure .....	104
	6-Azido-1-oxo-indan-4-carbonsäure.....	105
	2-[(6-Azido-1-oxo-indan-4-carbonyl)-amino]-3-methyl-pentansäuremethylester.....	106
	4-Diisopropylamino-6-oxo-3,6,7,8-tetrahydro-cyclopenta[d]azepino-1-yl-L-Isoleucinmethylester .....	107
	1-(7-Acetyl-5,6-dihydro-naphthalen-2-yl)-ethanon .....	108
	5-Acetyl-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure .....	109
	2-(2-Carboxy-ethyl)-5-ethyl-benzoesäure .....	109
	6-Ethyl-1-oxo-indan-4-carboxylic acid .....	110
	N-(6-Ethyl-1-oxo-indane-4-carbonyl)-L-Isoleucinmethylester .....	111
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	113
7	ANHANG.....	123
7.1	ABKÜRZUNGEN .....	123
7.2	SPEKTREN .....	125
7.2.1	<sup>1</sup> H-NMR-Spektren.....	125
7.2.2	<sup>13</sup> C-NMR-Spektren.....	132
7.2.3	Massenspektren.....	139
7.2.4	Infrarotspektren .....	145
7.2.5	Spektren des 7,4'-Dihydroxyflavons .....	151
7.3	DANKSAGUNG.....	155
7.4	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE .....	157
7.5	LEBENS LAUF .....	159





---

# 1 Einleitung

Das Leben von Pflanzen ist in einem weitaus größeren Umfang von ihrem direkten Lebensraum abhängig, als dies bei Tieren oder Menschen der Fall ist. Pflanzen haben einen festen Standort und profitieren somit von den ihnen zugänglichen Ressourcen wie Licht, Wasser, Nährstoffen und Mineralien oder leiden unter ihrem Mangel. Sie haben keine Möglichkeit, durch Standortveränderung Schadstoffen, konkurrierenden Pflanzen oder anderen ungünstigen Lebensumständen aus dem Weg „zu gehen“. Besonders deutlich wird dieser Nachteil bei Befall durch Pathogene oder Schädlinge. Während Tiere sich gegen Feinde durch aktiven Kampf verteidigen oder wenigstens durch Flucht entziehen können, haben Pflanzen diese Möglichkeiten aufgrund ihres fixierten Standortes nicht.

Im Laufe der Evolution haben die Pflanzen jedoch vielfältige Strategien entwickelt, um diesen Nachteil möglichst auszugleichen. Schon im Jahr 1888 hat ERNST STAHL, Professor in Jena, die wechselseitige Anpassung zwischen Pflanzen und ihren herbivoren Insekten beobachtet.<sup>1</sup>

## 1.1 Verteidigungssysteme von Pflanzen

EHRlich und RAVEN haben 1964 mit als Erste ein Modell schrittweiser und wechselseitiger chemischer Evolution (Koevolution) zwischen Pflanzen und Insekten vorgeschlagen, wobei die feindlichen chemischen Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und ihren natürlichen Feinden die treibende evolutionäre Kraft für die Anpassung und Weiterentwicklung beider Gegner sind.<sup>2</sup> Diese uralten Wechselwirkungen können dafür verantwortlich sein, dass verwandte Pflanzenarten ähnliche Sekundärmetabolite bilden und eng verwandte Insektenfamilien ähnliche Wirtspflanzen wählen.

Inzwischen hat sich das Konzept der Koevolution fortentwickelt. Man unterscheidet zwischen paarweiser und diffuser Koevolution. Die erste bezieht sich auf ein wechselseitiges und schrittweises „Wettrüsten“ der Pflanze und ihres Schädling, während sich die zweite und weitaus häufigere darauf bezieht, dass mehrere verwandte Insektenarten eine Reihe chemisch ähnlicher Pflanzen befallen. Auch hierbei können Herbivore und Pflanzen die Entwicklung des jeweils anderen stark beeinflussen.

Pflanzen haben sich also im Laufe der Zeit auf ihre Fraßfeinde eingestellt und mehr oder weniger spezifische Abwehrmechanismen gegen sie entwickelt. Neben den physikalischen Methoden der Verteidigung, wie der Ausbildung von Dornen oder einer dicken und undurchdringlichen Cuticula, hat dieser Prozess hochkomplexe und überraschend kreative Angriffs- und Verteidigungsstrategien hervorgebracht, die vor allem auf chemischen „Kampfstoffen“ basieren.

### 1.1.1 Konstitutive chemische Verteidigung

Viele Pflanzen haben die Substanzen zu ihrer Verteidigung bereits gebildet, bevor sie überhaupt geschädigt werden. Bei dieser konstitutiven (konstitutiv: grundlegend, wesentlich) chemischen Verteidigung gehören Gifte auch zur normalen Ausstattung der Pflanze, wenn sie nicht angegriffen wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Verteidigung sofort bereit ist und die nötigen Toxine, z.B. die ätherischen Öle des Eukalyptus, im Bedarfsfall nicht neu synthetisiert werden müssen. Andererseits birgt diese Methode auch Gefahren. So muss die Pflanze gegen das eigene Gift immun sein, damit sie nicht selber geschädigt wird.

#### **Seltene Aminosäuren**

Eine interessante Strategie der Verteidigung, die allerdings eher eine Langzeitwirkung besitzt, als direkt der betroffenen Pflanze zu helfen, ist die Verwendung seltener Aminosäuren.<sup>3</sup> Die korrekte Funktion von Proteinen und Enzymen ist von ihrer dreidimensionalen Struktur und somit vom korrektem Einbau der richtigen Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese abhängig. Viele Pflanzen enthalten zu ihrer Verteidigung sehr seltene, nicht proteinogene Aminosäuren, die teilweise mehr als 10% der Trockenmasse ausmachen können. Sie weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit mit normalen Aminosäuren auf. Ein Beispiel ist das Canavanin, ein Struktur analogon des Arginins.

Wird die Pflanze gefressen, wird diese Aminosäure wie alle anderen in den Aminosäurepool des Herbivoren übernommen. Durch die große Ähnlichkeit ist die Arginin-tRNA vieler Tiere jedoch nicht in der Lage, zwischen Original und Fälschung zu unterscheiden und baut auch das „falsche“ Arginin ein. Dies kann die biologische Aktivität des produzierten Proteins stark reduzieren oder sogar ganz ausschalten.

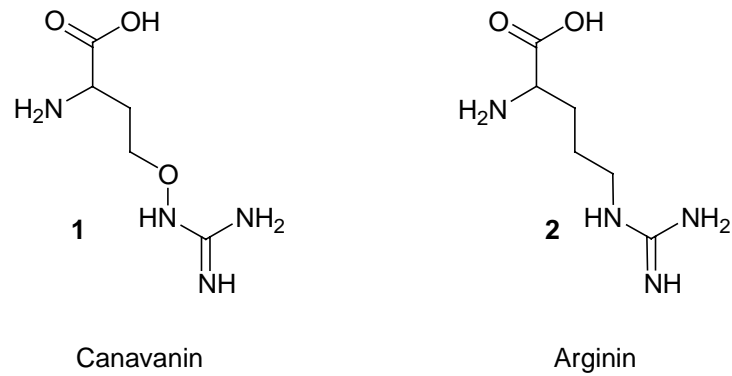


Abb. 1: Canavanin und Arginin als Strukturanaloga

Die Arginin-tRNA der Pflanze selbst kann dagegen zwischen Canavanin (1) und Arginin (2) unterscheiden. Häufig haben jedoch auch die Schädlinge dieser Pflanzen sich im Laufe der Evolution an diesen Schutzmechanismus angepasst und können bei der Proteinbiosynthese genauso zwischen den Aminosäuren differenzieren.

### 1.1.2 Aktivierte chemische Verteidigung

Bei der aktivierten chemischen Verteidigung bewahrt die Pflanze nichttoxische Vorstufen der Substanz in einem abgetrennten Bereich auf und ein entsprechendes Enzym, das daraus das Gift freisetzt, in einem anderen. Wird ein Stück der Pflanze von einer Raupe gefressen und dadurch die Kompartimentierung aufgehoben, so werden Enzym und Substrat vermischt und das Gift kurz darauf freigesetzt.

#### **Blausäure**

Blausäure ist ein sehr starkes Atmungsgift, weil es die Cytochrom-Oxidase hemmt. Schätzungsweise 10% aller Pflanzen verteidigen sich mit diesem Gift gegen Fraßfeinde. Pflanzen, die auch selber eine mitochondriale Atmungskette besitzen, enthalten das Gift in gebundener Form als sogenanntes cyanogenes Glykosid. Für die Freisetzung ist die Spaltung des Glykosids mittels einer Glycosidase notwendig, die in einem anderen Kompartiment der Pflanze gespeichert ist (Abb. 2). Durch das Entfernen des Zuckers entsteht ein Cyanhydrin, das sehr instabil ist und leicht in Aldehyd und Blausäure zerfallen kann.

Ein Beispiel für diese Methode ist die Limabohne (*Phaseolus lunatus*). Sie enthält in ihren Samen, aber auch in der Pflanze selbst, große Mengen an cyanogenen Glucosiden aus Vanillin oder 4-Hydroxybenzaldehyd.<sup>4</sup>

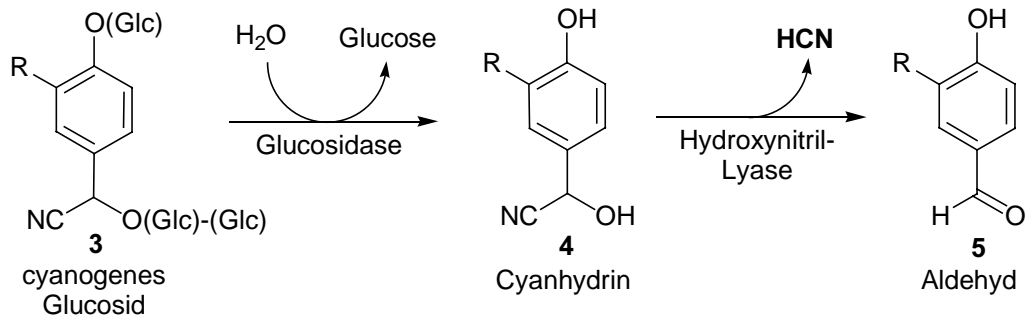


Abb. 2: Das Cyanhydrin, das sich nach der Abspaltung des Zuckers bildet, zerfällt spontan in Aldehyd und Blausäure. (Glc) = Glucose, R= H (90%) und OMe (10%) bei *P. lunatus*

### Senföle

Senfölglicoside oder Glucosinolate (6) bieten einen ähnlichen Schutz.<sup>5</sup> Sie kommen in Raps, Kohl, Kapuzinerkresse, Rettich und Senf vor. Auch hier gibt es eine räumliche Trennung durch Kompartimentierung von ungiftigen Vorstufen und Glucosidase.

Das im Kohl enthaltene Glucobrassicin (6, Abb. 3) wird aus Tryptophan gebildet. Auch hier entsteht nach der Abspaltung des Glucoserestes ein sehr instabiles Produkt. Nach der spontanen Abspaltung des Sulfatrestes und einer Umlagerung bildet sich ein Isothiocyanat 8, das Senföl.

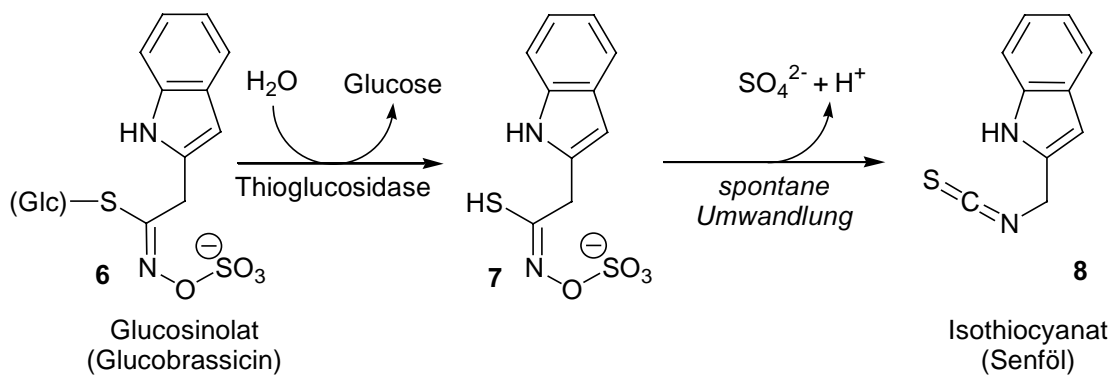


Abb. 3: Nach Abspaltung der Glucose zerfällt das Produkt in Sulfat und Senföl.

### 1.1.3 Induzierte chemische Abwehr

Die Produktion von Abwehrstoffen (Phytoalexinen) und Giften bedeutet für die Pflanze auch immer einen Verbrauch von Ressourcen. Um diesen Verbrauch zu minimieren und dadurch die Gesamtfitness zu erhöhen, produzieren viele Pflanzen ihre Phytoalexine nur im konkreten Bedarfsfall. Dabei induzieren spezifische Signale, wie Zellwandfragmente oder Substanzen, die von dem Schädling abgegeben werden,

sogenannte Elicitoren, die Genexpression, die dann wiederum die Produktion der Abwehrstoffe einleitet.

Das Wissen um Phytoalexine ist schon 60 Jahre alt. Im Jahr 1941 präsentierten MÜLLER und BÖRGER zum ersten Mal ihre Phytoalexin-Hypothese (aléxein (gr.): abwehren). Sie konnten zeigen, dass Tomatenknollengewebe, das erst mit einer nicht infektiösen, inkompatiblen Art von *Phytophthora infestans* infiziert wurde, danach gegen den Befall mit einer infektiösen, kompatiblen Art von *P. infestans* eine Resistenz ausgebildet hat. Aus ihren Experimenten schlossen sie, dass das Gewebe durch die Wechselwirkung mit der inkompatiblen Art nicht-spezifische Substanzen (Phytoalexine) gebildet hatte. Diese verhinderten das weitere Wachstum des Pathogens und stellten auch bei der nachfolgenden Infektion mit der kompatiblen Art einen wirksamen Schutz dar.<sup>6</sup>

Zu dieser Zeit war noch nichts über Art oder chemische Struktur der Substanzen bekannt. Heute wissen wir jedoch, dass die chemische Vielfalt dieser Phytoalexine immens ist.

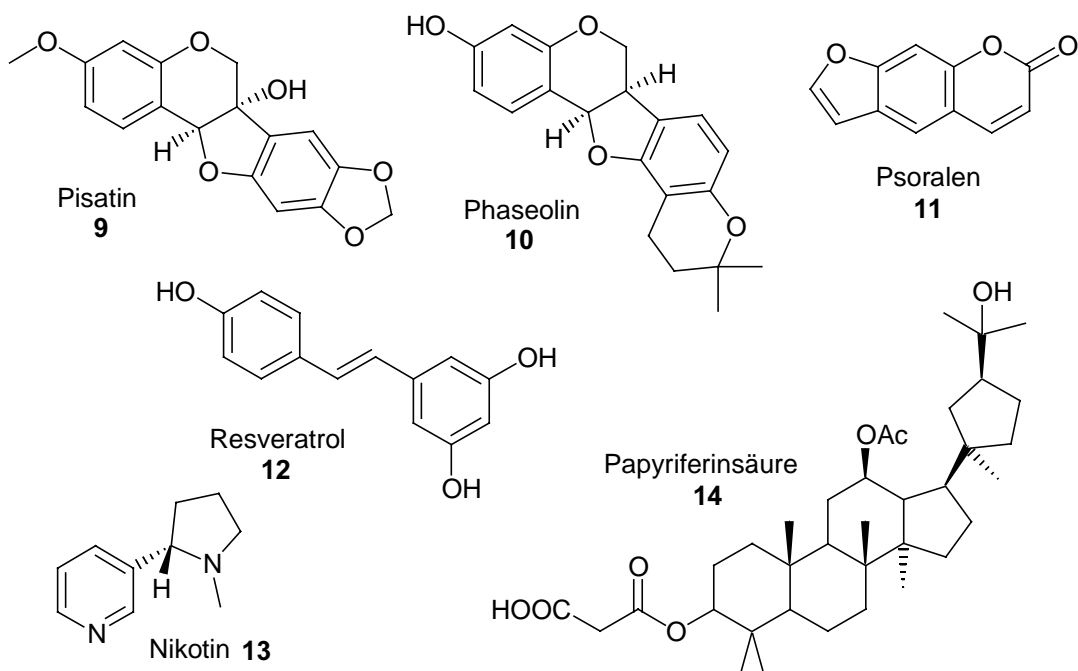


Abb. 4 : Beispiele für Phytoalexine. Pisatin, Phaseolin, Psoralen, Resveratrol, Nikotin und Papyrifersäure

Die erste Substanz, die als Phytoalexin aufgeklärt wurde, war das Pisatin (9, Abb. 4). Erst 20 Jahre nach der Hypothese von MÜLLER und BÖRGER konnte diese

antimykotische Verbindung aus den Schoten der Gartenerbse (*Pisum sativum*) isoliert werden, wenn sie zuvor mit einem Pilz infiziert wurden.<sup>7</sup>

Wie das Pisatin (9) gehört auch Phaseolin (10), das aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) stammt, zu der Gruppe der Pterocarpane, die sich von den Isoflavonoiden ableiten. Phaseolin ist gegen Bakterien, Hefen und Pilze wirksam.<sup>8</sup>

Das Psoralen (11) stammt aus der großen Gruppe der Furanocumarine, die man in Doldenblütlern, Nelken und Limonen findet. Ein Symptom, das durch das Toxin hervorgerufen wird, sind große wassergefüllte Blasen auf der Haut.<sup>9</sup> Ihre besondere Toxizität entfalten diese Phototoxine in Kombination mit UV-Licht. Dadurch sind diese Verbindungen in der Lage, an die DNS zu binden und so großen Schaden anzurichten.

Resveratrol (12) ist ein Phytoalexin aus Trauben. Bei dieser Substanz wurde in den letzten Jahren immer wieder eine tumorrepressive Wirkung bei Säugetieren diskutiert. Im Wein sind je nach Jahrgang, Wetter, Lage, Traubenart und Pathogenbefall sehr unterschiedliche Mengen Resveratrol enthalten, wobei Rotwein generell deutlich mehr enthält als Weißwein.<sup>10</sup>

Ein erhöhter Nikotingehalt (13) in Tabakblättern macht die Pflanze in wenigen Tagen nach Befall durch Raupen für den Schädling ungenießbar. Nur den spezialisierten Schädlingen der Tabakpflanze macht dies nichts aus, da sie an diese Verteidigungsmethode angepasst sind.<sup>11</sup>

Selbst gegen Säugetiere wirken Phytoalexine. Die Papyriferinsäure (14) wird von der Alaskapapierbirke (*Betula resinifera*) und der Erle (*Alnus crispa*) bei Bedarf produziert und auf der Blattoberfläche von jungen Trieben gelagert. Dies hindert den Schneeschuhhasen daran, diese besonders geschützten Pflanzenteile zu fressen. Das Triterpenoid kann in den juvenilen Wachstumsphasen der Internodien bis zu 30 Prozent des Trockengewichts ausmachen.<sup>12</sup>

#### 1.1.4 Tritrophe und multitrophe Systeme

Neben den direkten Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Herbivor oder Pathogen, zeigen neuere Forschungen auch die chemische Kommunikation zwischen Pflanze, Herbivor und einer dritten trophischen Ebene, die für die Abwehr von Schadinsekten eine wichtige Rolle spielt. Viele Pflanzen, die akut von Schädlingen befallen werden, sind in der Lage, „um Hilfe zu rufen“. Dabei locken sie aktiv mit

Duftstoffen Parasiten oder Feinde der Schadinsekten an. So lockt zum Beispiel die Limabohne *Phaseolus lunatus* bei Befall durch die herbivore Spinnmilbe *Tetranychus urticae* ihren natürlichen Feind, die Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* an. Die Raubmilbe wird vom Luftstrom transportiert und wandert so von Pflanze zu Pflanze auf der Suche nach Nahrung. Durch ihre olfaktorischen Sinne ist sie in der Lage, von der Spinnmilbe befallene Pflanzen von nicht befallenen zu unterscheiden. Solche Duftstoffe, die von der Pflanze und nicht von dem Schädling abgegeben werden, sind das Signal für die Milbe, die Wanderung zu beenden. Das Tier beginnt dann, auf der Pflanze nach den Spinnmilben zu suchen.<sup>13</sup>

Ein vergleichbares Beispiel tritropher Interaktion bietet die Kommunikation zwischen Raupen, Pflanzen und parasitären Wespen. Das erste bekannte System dieser Art bestand aus der parasitären Wespe *Cotesia marginiventris*, Maispflanzen (*Mays zea*) und der Schmetterlingsraupe *Spodoptera exigua*. *C. marginiventris* ist ein Parasit der Larven von *Sp. exigua*, indem sie ihre Eier in das Innere der Raupen ablegt. Wie die Limabohne reagiert auch die Maispflanze mit der Emission von Duftstoffen auf den Fraß der Raupen. Die Pflanze wird dadurch attraktiv für die parasitäre Wespe. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Duftstoffe für das jeweilige System charakteristisch sind. So werden die Wespen nicht bei Befall durch die Spinnmilben angelockt.<sup>14</sup>

## **1.2 Signaltransduktion in höheren Pflanzen**

Wenn die Pflanze von Pathogenen oder Herbivoren befallen wird, ist zur induzierten Biosynthese von Abwehrsubstanzen ein effektives Signaltransduktionssystem erforderlich. Ihr Überleben ist von einer schnellen Antwort auf die Schädigung abhängig. Die primären Elicitoren, die die Pflanze aktivieren, sind von der Art des abzuwehrenden Pathogens abhängig und gehören verschiedenen Substanzklassen an. Es sind unter anderem Oligosaccharid-Fragmente aus den Zellwänden der pathogenen Pilze oder der Pflanze selbst, kleine Proteine („Elicatine“) aus Pilzen, Enzyme (z.B.  $\beta$ -Glucosidasen) und Fettsäure-Aminosäure Konjugate (z.B. Volicitin<sup>15</sup>) aus dem Speichelsekret von Insekten, oder auch Sekundärmetabolite aus dem Stoffwechsel der Pflanze oder des Pathogens.

Trotz dieser Vielfalt der Elicitoren kann man im Moment nur zwei verschiedene Signalwege unterscheiden. Dies ist zum einen die verwundungs-induzierte Signalkette und zum anderen die hypersensitive Reaktion auf den Pathogenbefall.

## 1.2.1 Signalweg der Wundantwort

Verletzungen an Blättern durch Insekten oder durch mechanische Zerstörung führen in vielen Pflanzen zur Produktion von Proteinase-Inhibitoren (PINs), sowohl lokal als auch systemisch. Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) reagieren auf Verletzungen ihrer Blätter mit einer systemischen Biosynthese von PINs. Diese greifen in das Verdauungssystem von Insekten und den Stoffwechsel von Pathogenen ein, reduzieren die Verfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren und verzögern so das Wachstum der Schädlinge. Diese Reaktion wird durch Jasmonsäure bzw. andere Octadecanoide oder auch durch Ethylen als Signalmoleküle eingeleitet.

### Octadecanoide

Obwohl es eine große Vielfalt an primären Elicitoren und unterschiedlichen Abwehrreaktionen gibt, scheinen die Verteidigungsmechanismen der meisten untersuchten Pflanzenarten bei Verwundung, z.B. durch Herbivore, wenigstens auf einer gemeinsamen Gruppe von Signalmolekülen zu beruhen. Die primären Elicitoren induzieren über eine noch weitgehend unbekanntes Signalkaskade die Biosynthese von Jasmonsäure (Abb. 5). Diese Substanz wird in Pflanzen über den von VICK und ZIMMERMAN beschriebenen Octadecanoidweg hergestellt.<sup>16</sup> Ausgangssubstanz ist dabei die Linolensäure (15), die, nach der Oxidation zu (13S)-Hydroperoxyoctadeca-9,11,15-triensäure (16), in mehreren Schritten zur 12-Oxophytodiensäure (OPDA, 18) umgesetzt wird. Diese zeigt ebenfalls, wie die Jasmonsäure (JA, 20), eine starke biologische Aktivität.<sup>17</sup> Durch die nachfolgende Reduktion und Kürzung der Seitenkette durch drei Zyklen einer  $\beta$ -Oxidation entsteht schließlich Jasmonsäure (JA).

Die Jasmonsäure oder ihr Methylester (MeJA) induzieren in der Pflanze spezifische Abwehrreaktionen. Sie aktivieren Gene von Proteinase-Inhibitoren oder von Enzymen, die bei der Produktion von Sekundäremetaboliten und Phytoalexinen eine Rolle spielen. Jasmonsäure ist auch an der Regulation von Alterungs- und Wachstumsprozessen in der Pflanze beteiligt.

Aufgrund dieser zentralen Rolle von Jasmonsäure im Sekundärstoffwechsel des pflanzlichen Abwehrsystems kann man durch künstliche Applikation von JA oder MeJA in vielen Systemen Schädlingsbefall imitieren und die entsprechende Antwort der Pflanze auslösen. So induziert JA die Biosynthese von Duftstoffen, Taxol,



Alkaloiden, Glucosinolaten, Ethylen, JIPs (*jasmonate induced proteins*), aber auch Rankenkrümmung und Knollenbildung.<sup>18-20</sup>

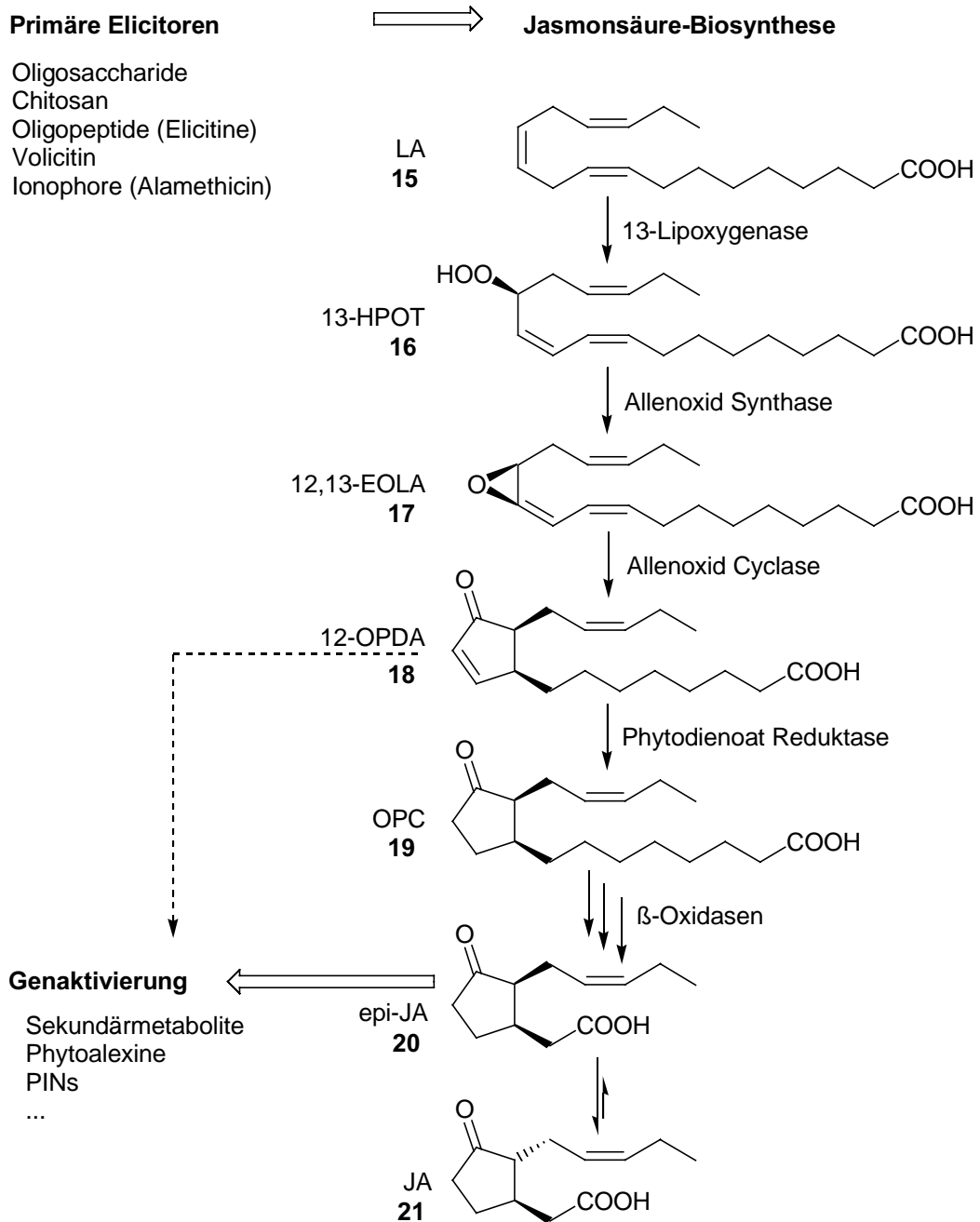


Abb. 5: Octadecanoid-Pathway. LA=Linolensäure; 13-HPOT=(9Z),(11E),(15Z)-(13S)-Hydroperoxyoctadeca-9,11,15-triensäure; 12,13-EOLA=(9Z),(15Z)-12,(13S)-Epoxyoctadeca-9,11,15-triensäure; 12-OPDA= (9R,13S)-12-Oxophytodiensäure; OPC= (9R,13S)-3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentanooctansäure; JA= (3R,7R)-Jasmonsäure; epi-JA= (3R,7S)-*epi*-Jasmonsäure

Zu beachten ist außerdem, dass Jasmonsäure in vier stereoisomeren Formen vorliegen kann, von denen allerdings nur zwei Biosyntheseprodukte sind: (+)-(3R,7S)-*epi*-JA (20,

vgl. Abb. 5), das aktive, aber thermodynamisch ungünstige Isomer, und (-)-(3*R*,7*R*)-JA (**21**), zu welchem JA leicht über die Enolform tautomerisiert. Im Text ist immer die aktive *epi*-Form der Jasmonsäure gemeint, wenn über JA und Jasmonsäure geschrieben wird.

Schließlich ist auch nicht auszuschließen, dass weitere Octadecanoide oder ähnliche Oxylipine grundlegende Signal- und Steuerungsfunktionen haben.

## Ethylen

Ethylen (**25**, Abb. 6) ist in Pflanzen u.a. an der Auslösung von Seneszenz beteiligt und spielt ebenfalls bei der pflanzlichen Abwehrreaktion in der Wundantwort eine entscheidende Rolle.<sup>21</sup> Bekannt ist seine Rolle beim Import von Bananen. Wobei die gekühlten Früchte weit vor ihrem Reifestadium geerntet und verschifft werden, und die Reifung erst wenige Tage vor Ankunft in Europa durch Begasung mit Ethylen ausgelöst wird.

Die Ethylenbiosynthese verläuft über das *S*-Adenosylmethionin (**22**). Die positive Ladung am Schwefel erleichtert die Spaltung zur Cyclopropanaminosäure (**23**) durch die Bildung einer guten Abgangsgruppe. Durch eine ACC-Oxidase wird das Cyclopropan zu Ethylen (**25**), Kohlendioxid, Blausäure und Wasser gespalten. Ebenso wie für die Wirkung von JA ist auch für die Ethylenwirkung die Signalkette noch nicht völlig aufgeklärt. Untersuchungen an ethylenunempfindlichen Mutanten von *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, dass an der Signaltransduktion mehrere hintereinander geschaltete Protein-Kinasen beteiligt sind, wobei eine Histidin-Proteinkinase möglicherweise als Ethylenrezeptor fungiert.<sup>22</sup>

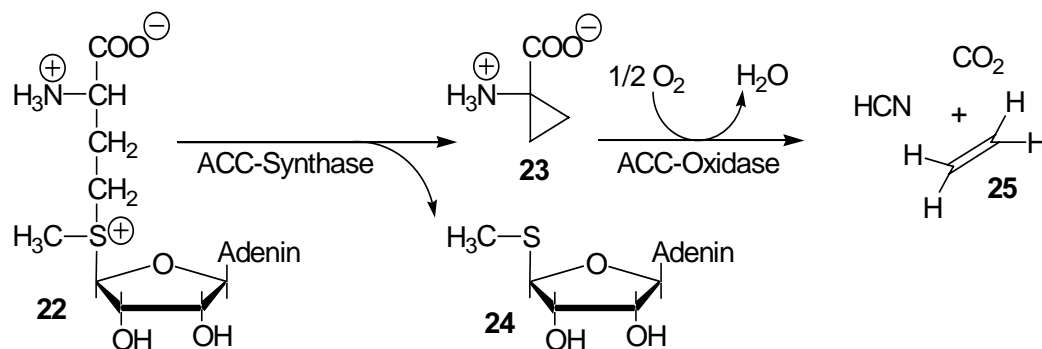


Abb. 6: Ethylen Biosynthese. Die Aminocyclopropan-Carboxylat-Synthase (ACC-Synthase) spaltet das *S*-Adenosylmethionin zur Cyclopropanaminosäure (**23**) und **24**. Die ACC-Oxidase oxidiert das Produkt danach zu Ethylen, Wasser, Blausäure und CO<sub>2</sub>.

## 1.2.2 Signalweg bei Pathogenbefall und SAR

### Hypersensitive Reaktion

Eine sehr effektive Verteidigung besteht darin, nach dem Eindringen eines Pathogens dessen weitere Verbreitung möglichst zu verhindern und seine Ausbreitung auf einen möglichst kleinen Gewebebereich der Pflanze zu beschränken. Dabei entstehen, ausgelöst durch die hypersensitive Reaktion (HR), lokale Nekrosen, also Bereiche mit abgestorbenem Zellgewebe, die vermutlich aus programmiertem Zelltod (Apoptose) resultieren. Da der Eindringling zur Verbreitung auf lebenden Zellen angewiesen ist, opfert die Pflanze die umliegenden Zellen.

Neben dem lokalen Zelltod sind an der Infektionsstelle häufig eine Reihe von Zellwandveränderungen zu beobachten. Diese Veränderungen, zu denen z.B. die Verstärkung der Zellwand durch Lignin<sup>8,23</sup> oder die Akkumulation und Verknüpfung von Zellwandproteinen gehören,<sup>24,25</sup> dienen als physikalische Barrieren. Als Auslöser für den programmierten Zelltod wurde in vielen Fällen ein starker Anstieg von aktiven Sauerstoff-Spezies wie Superoxid und/oder Wasserstoffperoxid ausgemacht („oxidative burst“).<sup>26</sup>

### Systemisch erworbene Resistenz (SAR)

Neben den nekrotischen Läsionen durch die hypersensitive Reaktion, die das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens verhindern sollen, werden zahlreiche weitere Verteidigungsantworten der Pflanze systemisch induziert und mehrere Gene koordiniert exprimiert. Zu den Genprodukten dieser sogenannten SAR-Gene gehören verschiedene Gruppen von PR-Proteinen (*pathogenesis-related-proteins*) wie Chitinasen und Glucanasen. Die meisten der bisher bekannten PR-Proteine zeigen *in vitro* antimikrobielle Aktivität oder erhöhen die Krankheitsresistenz, wenn sie in transgenen Pflanzen überexprimiert werden. Inzwischen gilt als gesichert, dass PR-Proteine direkt für eine erhöhte Resistenz der Pflanze verantwortlich sind.

Die Synthese und Anreicherung von Salicylsäure scheint dabei für die Aktivierung einer Reihe sowohl lokaler als auch systemischer Verteidigungsreaktionen notwendig zu sein.

## Salicylsäure

Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass bei Experimenten mit Salicylsäure (**26**, SA, Abb. 7) oder Aspirin an Tabak die Expression von PR-Proteinen eingeleitet und dadurch die Resistenz gegen den Tabakmosaikvirus (TMV) erhöht werden kann.

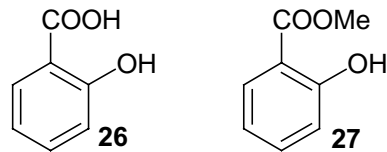


Abb. 7: Salicylsäure (SA), Methylsalicylat (MeSA)

Ein nicht geringer Anteil der SA wird in eine mögliche Speicherform, die Salicylsäure- $\beta$ -glucoside, umgewandelt. Vieles spricht dafür, dass SA auch der mobile Signalstoff für die SAR innerhalb der Pflanze ist. Es konnte auch Methylsalicylat (**27**) als flüchtiger Signalstoff identifiziert werden, der die Verteidigungsmechanismen in benachbarten Blättern und möglicherweise sogar in benachbarten Pflanzen aktiviert. Methylsalicylat kann nicht nur in der Gasphase sondern auch, genau wie Salicylsäure, im vaskulären System der Pflanze transportiert werden.<sup>27</sup>

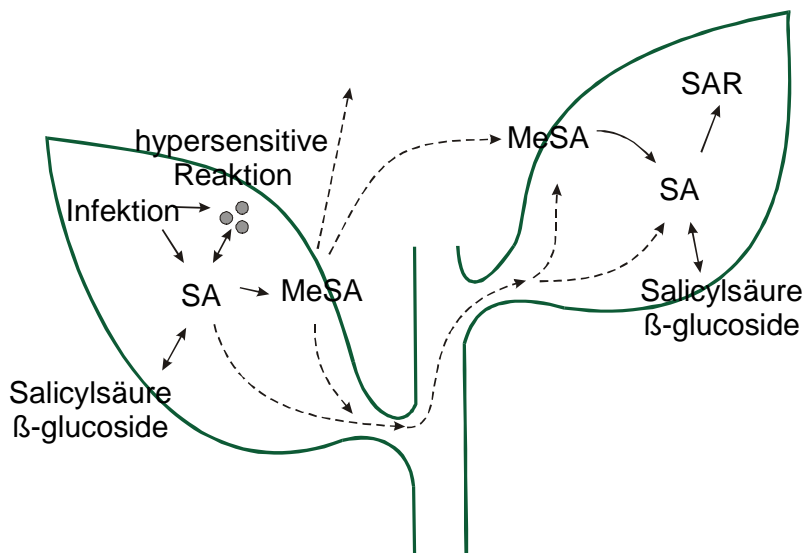


Abb. 8: Modell der Funktionen von Salicylsäure in der Pflanze nach Klessig.<sup>27</sup>

### 1.2.3 Wechselwirkungen zwischen JA, Ethylen und SA

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass die unterschiedlichen Verteidigungsreaktionen keineswegs voneinander unabhängige, lineare Signalkaskaden sind, sondern sich gegenseitig beeinflussen, sogar blockieren können.

Während Jasmonsäure und Ethylen in vielen Systemen synergistisch wirken, blockiert Salicylsäure, die bei Pathogenbefall produziert wird, die wundinduzierte Genexpression in Tomatenpflanzen. Dies geschieht wahrscheinlich durch Inhibierung der Jasmonsäure-Biosynthese (siehe Seite 8).

## 1.3 *Pseudomonaden als Pathogene*

### 1.3.1 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkungen spielt *P. syringae*, ein Gram-negatives, obligat aerobes, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Bakterium und dessen Phytotoxine. Das Bakterium ist der Erreger des Bakterienbrandes auf Sojapflanzen, dabei bilden sich wasserdurchtränkte Bereiche im Blatt, die sich im Verlauf der Krankheit in nekrotische, von chlorotischen Höfen umgebene Zonen umwandeln. Da diese Krankheit vermehrt nach Perioden kühler Witterung auftritt, wird *P. syringae* pv. *glycinea* auch als ein typisches Kaltwetterpathogen bezeichnet.<sup>28</sup> Die Schäden, die durch dieses Bakterium hervorgerufen werden, sind dabei von beträchtlicher wirtschaftlicher Bedeutung.<sup>29</sup>

*P. syringae* pv. *glycinea* lebt epiphytisch auf der Blattoberfläche oder im Boden bzw. auf abgestorbenem Pflanzenmaterial. Von dort dringt das Bakterium über die Spaltöffnungen (Stomata) auf der Blattunterseite oder über kleine Wunden der Cutikulaschicht in den Interzellularraum des Blattgewebes (Mesophyll) ein. Ist das Pathogen erfolgreich in seine Wirtspflanze eingedrungen, beginnt es, sich im Interzellularraum zu vermehren. Typische Symptome des Bakterienbrandes werden 5-7 Tage nach erfolgreicher Besiedlung von *P. syringae* pv. *glycinea* auf seiner Wirtspflanze, der Sojabohne, sichtbar.

### 1.3.2 Coronatin und der Indanoyl-Isoleucinmethylester

Eine wichtige Waffe des Bakteriums zur Besiedlung der Pflanze ist das Phytotoxin Coronatin (28, COR, Abb. 9). Es handelt sich um ein nicht wirtsspezifisches Polyketid-

Aminosäurederivat, das von *P. syringae* pv. *glycinea* sowie den eng verwandten Pathovaren pv. *atropurpurea*, pv. *morsprunorum*, pv. *maculicola* und pv. *tomato* produziert wird.<sup>30-32</sup>

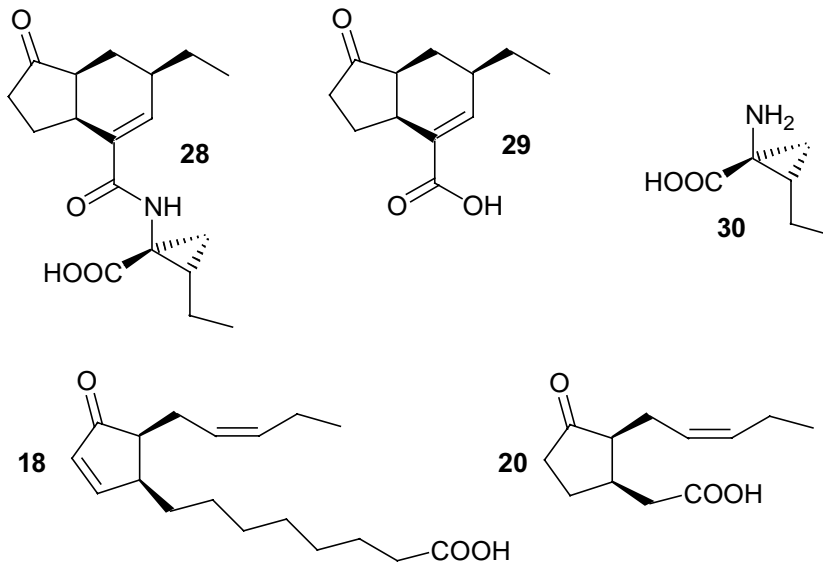


Abb. 9: Coronatin (COR), Coronafacinsäure (CFA), Coronamsäure (CMA), 12-Oxophytodien-säure (OPDA), Jasmonsäure (JA)

Coronatin (28) gilt als ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. syringae*, der entscheidend am Krankheitsverlauf bzw. an der Symptomausprägung beteiligt ist.<sup>33</sup> Dabei sind Chlorosen die typischen Symptome, die bei einer großen Anzahl von Pflanzen hervorgerufen werden. Daneben bewirkt das Phytotoxin ein großes Spektrum weiterer Effekte, z.B. die Verstärkung des Abbaus der Blattsubstanz (Seneszenz) in Tabakpflanzen,<sup>34</sup> die Hypertrophie in Kartoffelknollen,<sup>35</sup> die Inhibierung des Wurzelwachstums im Weizen,<sup>36</sup> die Stimulation der Stomataöffnungen im Roggen, die Stimulation der Ethylen-Biosynthese im Tabak sowie die Synthese von Proteinase-Inhibitoren in Tomatenpflanzen.<sup>37-40</sup>

Coronatin ist aus der Coronafacinsäure (29, CFA) und der Cyclopropylaminosäure Coronamsäure (30, CMA) aufgebaut. Bei CFA handelt es sich um ein Produkt des Polyketidstoffwechsels, bestehend aus drei Acetateinheiten, einer Butyrat- und einer Pyruvateinheit. Die biosynthetischen Vorläufer der CMA sind *allo*-Isoleucin und Isoleucin. Dabei können auch Isoleucin und *allo*-Isoleucin mit der CFA verknüpft werden. Während diese aber wieder spaltbar sind, ist das Amid des Coronatins durch

die Dialkylierung am  $\alpha$ -Kohlenstoff der Aminosäure gegen die üblichen spaltenden Enzyme geschützt.

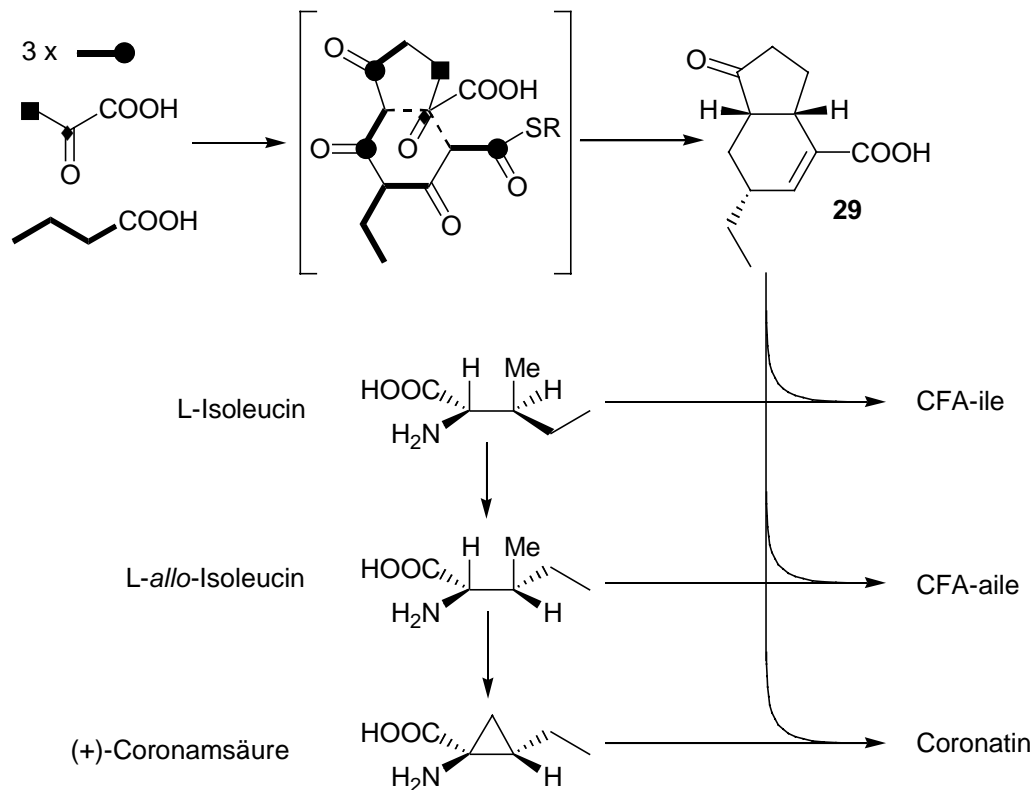


Abb. 10: Biosyntheseroute des Coronatins. CFA wird aus drei Acetateinheiten, einer Pyruvat- und einer Butyrat-Einheit aufgebaut und dann mit CMA bzw. deren biosynthetischen Vorläufern verknüpft.

Interessanterweise ähnelt die Coronamsäure (**30**) der Cyclopropanaminosäure (**23**), welche die Vorstufe der Ethylen-Biosynthese (Abb. 6) ist. Diese strukturelle Ähnlichkeit lässt vermuten, dass CMA möglicherweise die pflanzliche Ethylen-Biosynthese beeinflussen kann.<sup>39</sup>

Die Coronafacinsäure (**29**) dagegen ähnelt strukturell der Jasmonsäure (**20**, JA, Abb. 9), welche, wie schon besprochen (siehe Seite 8), eine essentielle Rolle bei der Regulation der pflanzlichen Abwehr gegenüber Insekten und Pathogenen spielt. Einige wenige Untersuchungen haben ergeben, dass CFA **29** und JA **20** sehr ähnliche biologische Aktivitäten besitzen, wenn sie in Jasmonat-spezifischen Tests eingesetzt werden.<sup>41</sup> BUDDÉ und ULLRICH konnten zeigen, dass CFA bei Sojabohnen die Ausbildung der hypersensitiven Reaktion nach Befall mit *P. syringae* hinauszögert und reduziert.<sup>42</sup> In den meisten anderen Bioassays dagegen zeigen die beiden einzelnen Bestandteile des

Coronatins (**28**) keine biologische Aktivität. Coronatin ist im Vergleich zu JA in vielen Assays 100 bis 10.000 mal stärker aktiv.<sup>41,43,44</sup>

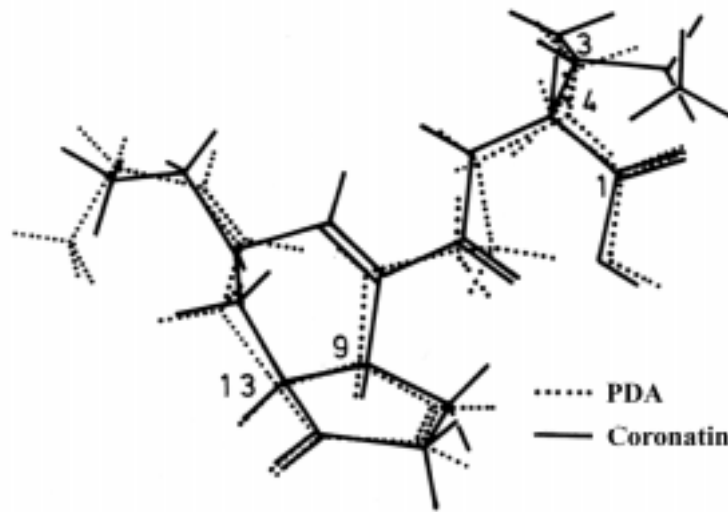


Abb. 11: OPDA und Coronatin aufeinander abgebildet.

Coronatin besitzt zudem funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit mit dem pflanzlichen Octadecanoid-Signalmolekül 12-Oxo-phytodienoic acid (18, OPDA, Abb. 11), einem Intermediat im Octadecanoid-Weg und somit einer Vorstufe der Jasmonsäure (**20**). Es war WEILER (1994), der zeigte, dass das Phytotoxin nicht als reines Analogon zu JA gesehen werden darf.<sup>45</sup> Die Positionen der Carboxylgruppe sind relativ zum Cyclopentylring bei Coronatin und JA sehr unterschiedlich. Diese Struktureigenschaften stimmen mit OPDA (**18**) viel besser überein. OPDA besitzt, ähnlich wie JA (**20**), zahlreiche regulatorische Funktionen bei der pflanzlichen Abwehrreaktion.<sup>46-48</sup>

Inzwischen wurde in vielen Arbeiten gezeigt, dass durch JA<sup>49,50</sup> und durch OPDA<sup>45,51</sup> hervorgerufene Effekte in der Pflanze durch Coronatin reproduziert werden können, was auf ein Mimik von OPDA und JA durch das Toxin hinweist.<sup>43,45,52</sup> Wahrscheinlich liegt gerade hier der Grund für die Toxizität des Coronatins.

Die Tatsache, dass Coronatin bestimmte Antworten der Pflanze analog zu JA oder OPDA auslösen kann und zudem auch schon in viel geringeren Konzentrationen, macht dieses Produkt der Pseudomonaden zu einem wichtigen Werkzeug für die Untersuchung des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen. Appliziertes Coronatin kann dabei helfen, die Produktion von wichtigen Metaboliten aus Zellkulturen zu steigern.<sup>53</sup>



Fast alle Antworten der Pflanzen, die sich durch JA induzieren lassen, sind schon mit kleinsten Mengen Coronatin hervorzurufen.

Leider ist das Phytotoxin synthetisch nur sehr aufwendig zugänglich (siehe Kapitel 3.2.2). Der einzige effektive Zugang ist die Extraktion von Bakterienkulturüberständen von *P. syringae*. Deshalb wäre ein synthetisch einfach zugängliches Coronatinanalogon eine große Hilfe. Erste wichtige Schritte in diese Richtung sind KRUMM gelungen.<sup>54</sup> Er entwickelte die Indanon-4-carbonsäure-Isoleucinkonjugate (**31**, Ind-IleMe).

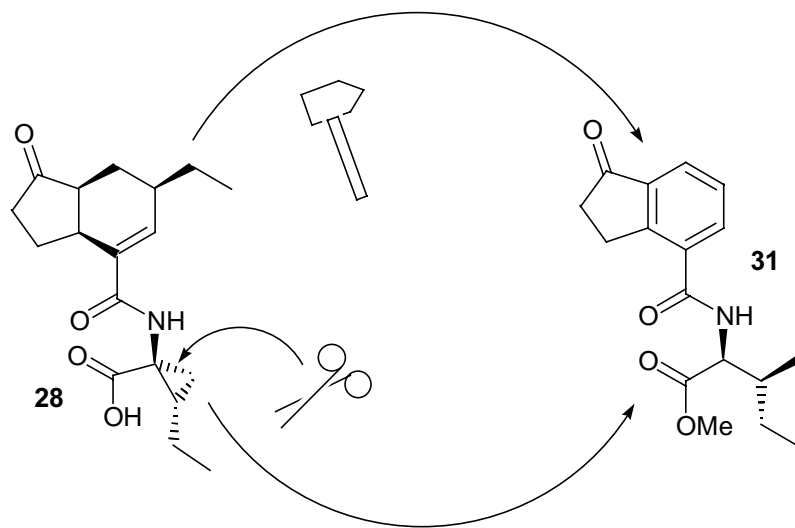


Abb. 12: Transformation der stereochemisch komplexen Coronatinstruktur zum Indanoyl-IleMe-Konjugat

Er ersetzte den CFA-Teil des Coronatins durch die einfach zugängliche Indanon-carbonsäure. Die wannenförmige CFA-Struktur wird dabei durch einen planaren Bicyclus ersetzt. Die Coronamsäure wird gegen ihren biosynthetischen Vorläufer, das L-Isoleucin, ausgetauscht. Die Versuche von KRUMM haben gezeigt, dass die Transporteigenschaften der Methyl- bzw. Allylester der Aminosäure den freien Säuren überlegen sind. In der Pflanze werden die Ester wieder verseift und können dann ihre biologische Aktivität entfalten. Methyliertes Coronatin zeigte im Gegensatz dazu keine biologische Aktivität mehr. Aufgrund der  $\alpha$ -Dialkylierung der Coronamsäure können die Ester in der Pflanze enzymatisch nicht gespalten werden.

Die biologische Aktivität des Konjugats des Isoleucinmethylesters **31** und anderer Indanoyl-Aminosäurekonjugate lag in Konzentrationsbereichen, in denen auch Jasmonsäure (**20**) aktiv ist. Zudem zeigten diese Substanzen in Bioassays solche

Reaktionen, die denen nach Jasmonsäure-Applikation entsprechen und nicht denen mit Coronatin.<sup>48,55-57</sup>

## **1.4 Duftemission bei *Phaseolus lunatus***

Anhand der Lima- oder Mondbohne wurden bereits zwei Beispiele der Pflanzenverteidigung erläutert. Zum einen enthält die Limabohne große Mengen von cyanogenen Glycosiden, zum anderen ein System zur Emission von Duftstoffen. Sie ist in der Lage, je nach Herbivore oder Elicitor die Zusammensetzung des emittierten Duftes zu variieren. Die strukturelle Vielfalt der emittierten Substanzen ist dabei sehr groß. Die Verbindungen stammen teilweise aus sehr unterschiedlichen Biosynthesewegen (Abb. 13).

Neben der Einteilung in strukturelle Klassen lässt sich auch eine Zuordnung von Duftstoffen zu bestimmten Elicitoren bzw. zu Funktionen vornehmen. Durch Elicitierung der Duftstoffbiosynthese mit Jasmonsäure werden fast alle möglichen Klassen an Substanzen produziert. Dagegen wird bei der Elicitierung mit abiotischen Stressfaktoren wie Schwermetallen (siehe Kapitel 3.3.3) oder durch Depolarisierung der Zellmembranen mit Alamethicin (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 71) nur die Produktion der beiden Homoterpene (DMNT **37**, TMTT **38** Abb. 13) und die von Methylsalicylat aktiv.<sup>58</sup> Diese drei Substanzen tauchen beim JA induzierten Duftmuster dagegen nicht oder nur stark eingeschränkt auf. Je nach Elicitor oder Herbivore erhält man nun unterschiedliche Mischungen dieser beiden Duftmuster.

Nimmt man Coronatin als Elicitor, dann erhält man ein besonders komplexes Duftspektrum (Abb. 14). Das Spektrum beinhaltet sowohl die JA-typischen Komponenten wie Ocimen, Linalool,  $C_{10}H_{14}$ ,  $C_{10}H_{16}O$ , Indol und Caryophyllen als auch die oben schon erwähnte zweite Klasse von Duftstoffen, die Homoterpene (DMNT, TMTT), sowie Methylsalicylat. Coronatin induziert also beide Duftarten.

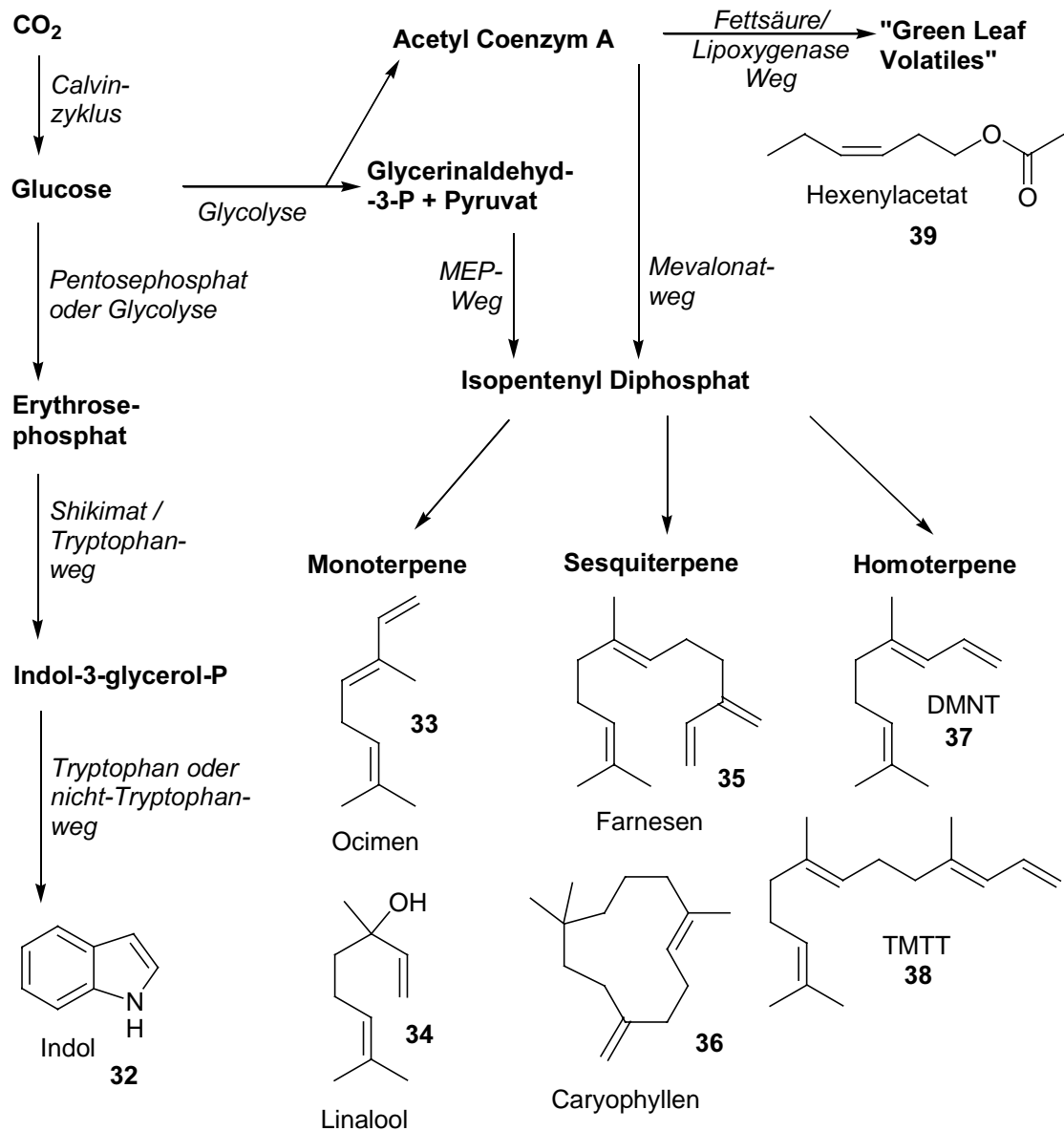


Abb. 13: Biosynthesewege zu einigen der emittierten Duftstoffe von *P. lunatus*. DMNT= (E)-4,8-Dimethyl-1,3,7- nonatrien; TMTT= (E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen.

Sieht man im Vergleich dazu den Bioassay mit Indanoyl-Isoleucin-Konjugat 31 als Elicitor, so erhält man ein Duftspektrum, das wieder deutlich mehr dem der Jasmonsäure entspricht als dem des Coronatins. Die Homoterpene kommen gar nicht (TMTT 38) oder nur stark reduziert (DMNT 37) vor, und auch Methylsalicylat ist nur noch in Spuren vorhanden.

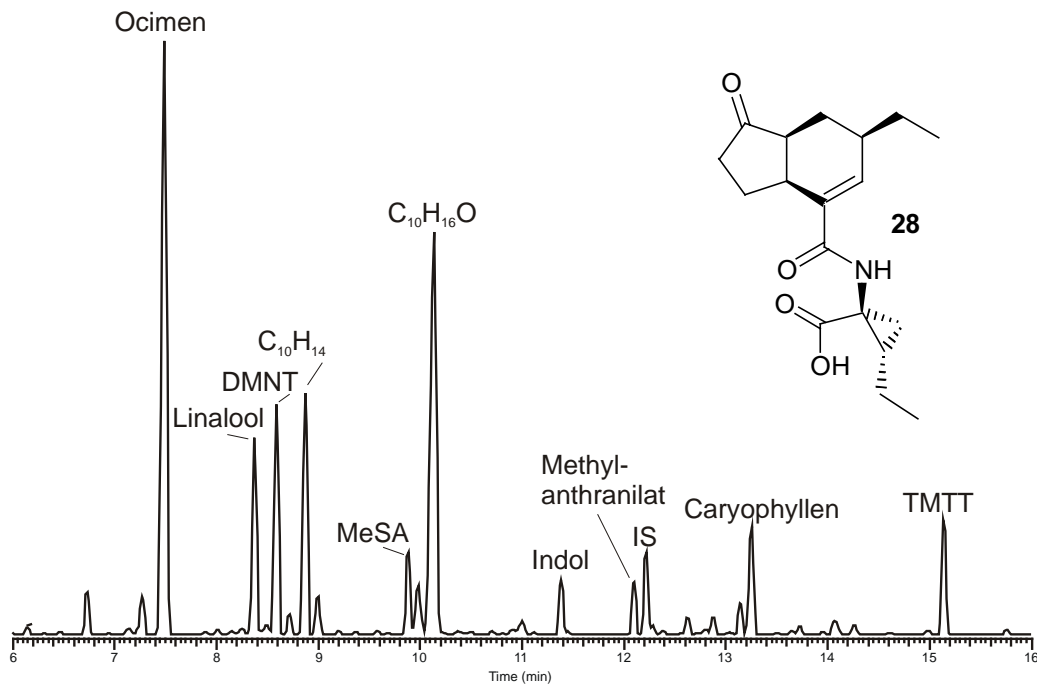


Abb. 14: Duftspektrum nach Elicitierung mit Coronatin, 100  $\mu\text{M}$  (IS: interner Standard)

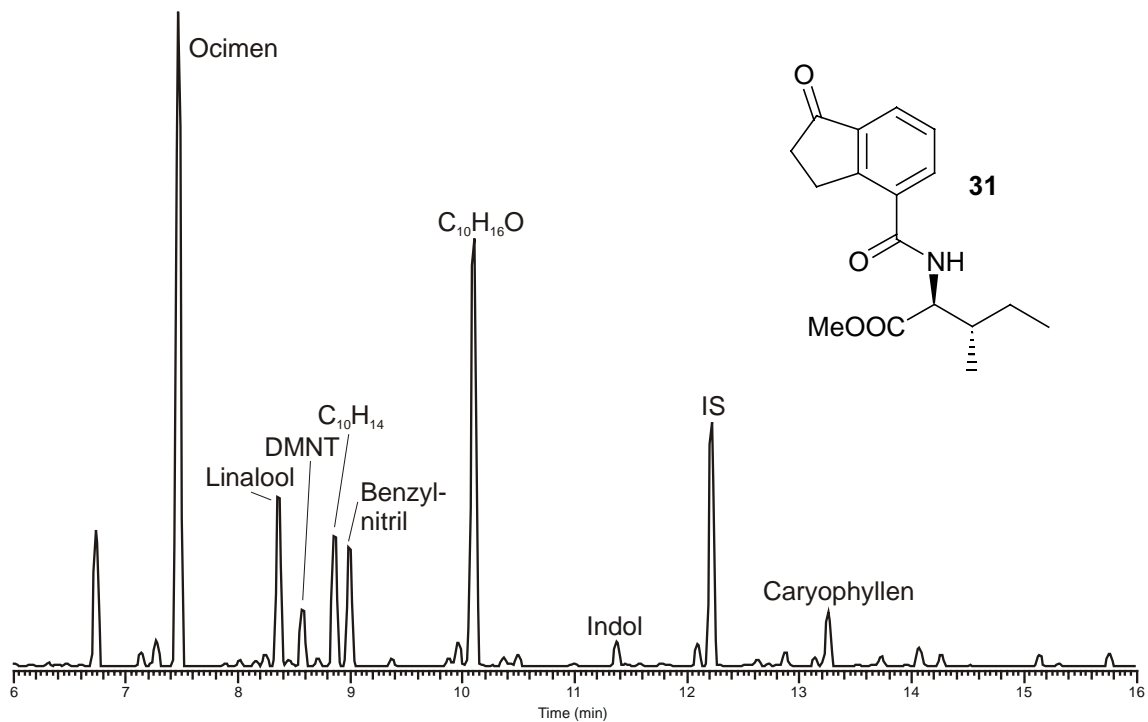


Abb. 15: Duftspektrum nach Elicitierung mit Indanoyl-Isoleucinmethylester, 100  $\mu\text{M}$

Zieht man alle bisher vorgenommenen Bioassays in Betracht, so kommt man zu dem Schluss, dass die neue Verbindungsklasse der Indanoyl-Aminosäure-Konjugate ein gutes Mimik für Jasmonsäure ist. Die Weiterentwicklung dieser neuen Leitstruktur war deshalb ein vielversprechendes Projekt.

---

## 2 Aufgabenstellung

Mit der Entwicklung der Indanoyl-Isoleucinmethylester-Konjugate (**31**) hat THOMAS KRUMM aus unserem Arbeitskreis eine neue Leitstruktur entdeckt. Die Verbindung zeigte in Bioassays Aktivität, die weitgehend denen der Jasmonsäure (**20**) entsprach. Wenn diese Verbindung ähnliche biologische Antworten bei Pflanzen hervorruft, dann bindet sie wahrscheinlich auch an dieselben Bindeproteine und Rezeptoren wie die Jasmonsäure.

Mit dieser Überlegung öffnet sich ein großes Feld für neue Untersuchungen. Bisher ist noch nichts über mögliche Rezeptoren dieses wichtigen und ubiquitären Signalstoffs bekannt. Eine bessere Kenntnis der Wirkungsweise der Jasmonsäure und ihrer phytohormon-ähnlichen Wirkung wäre ein wichtiger Schritt zum Verständnis des Sekundärmetabolismus von Pflanzen und seiner Steuerung nach Herbivorenbefall.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb hauptsächlich mit zwei Ansätzen, um die Leitstruktur **31** für diese wichtigen Untersuchungen weiterzuentwickeln:

1. Erweiterung der Indanon-Struktur zu einem Werkzeug zur Identifizierung von Rezeptoren oder Bindeproteinen auf Basis der Photoaffinitätsmarkierung
2. Verbesserung der strukturellen Coronatin-Analogie durch Hinzufügen entsprechender Substituenten an der 6-Position des Indanons

### 2.1 Photoaffinitätsmarker

Bei der Entwicklung eines Werkzeugs für die Photoaffinitätsmarkierung musste zunächst nach einer geeigneten Struktur gesucht werden, die sich möglicherweise aus dem Indanoyl-Isoleucin-Konjugat (**31**) ableiten lässt. Dabei war in Betracht zu ziehen, dass die neue Leitstruktur nicht viele Positionen hat, an denen sie ohne Verlust an Aktivität verändert werden kann. Es sollte die Wahl einer optimalen photolabilen Gruppe und ihrer Position und schließlich die Synthese der neuen Verbindung erfolgen.

Durch Überprüfung der biologischen Aktivität war sicherzustellen, dass die neue Verbindung analoge Reaktionen wie Jasmonsäure oder Coronatin bei der Pflanze

hervorrufen und damit auch an dieselben potentiellen Bindeproteine bzw. Rezeptoren bindet.

Es sollte die Fähigkeit der neuen Verbindung getestet werden, ob sie nach Bestrahlung mit UV-Licht ein hochreaktives Intermediat bilden kann, das dann eine kovalente und irreversible Bindung mit dem Rezeptor ausbilden kann.

## 2.2 Coronatin-Analoga

Die unsubstituierten Indanoyl-Konjugate zeigen eine gute biologische Aktivität im Vergleich zur Jasmonsäure. Die Wirkung von Coronatin (**28**) können sie jedoch sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht erreichen. Zwischen der Wirkung des Coronatins und seinem bisherigen Mimik liegen Konzentrationsunterschiede mit dem Faktor 100 bis >1000, je nach Bioassay. In einigen Systemen kann der Indanoyl-Isoleucinmethylester (**31**) die biologischen Effekte des Coronatins gar nicht hervorrufen. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den beiden Substanzen ist nicht groß genug, um wirklich von einem Mimik des Coronatins zu sprechen.

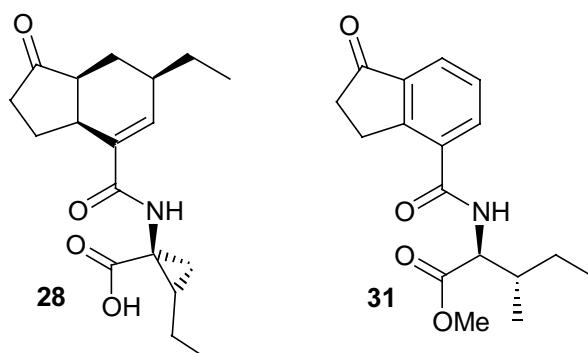


Abb. 16: Coronatin und Indanoyl-Isoleucinmethylester

Es sollte deshalb versucht werden, die Strukturanalogie der Indanoyl-Leitstruktur **31** zum Coronatin (**28**) zu erhöhen und damit die biologische Aktivität der Verbindung zu verbessern. Ein gutes Coronatin-Mimik wäre ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus in vielen pflanzlichen Systemen. Eine synthetisch leicht zugängliche Verbindung hätte in diesem Bereich vielfältige Verwendungsmöglichkeiten.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Photoaffinitätsmarker

Photoaffinitätsmarkierung ist schon seit den sechziger Jahren bekannt.<sup>59</sup> Die von WESTHEIMER entwickelte Methode wurde seitdem deutlich weiterentwickelt, jedoch ist das Grundprinzip dabei unverändert geblieben. Zur Photoaffinitätsmarkierung benötigt man ein lichtaktivierbares, chemisch inertes, radioaktiv markiertes Analogon des Liganden, in unserem Fall des Coronatins. Dieses zerfällt durch Bestrahlung und bildet ein hochreaktives Intermediat, welches irreversibel an das aktive Zentrum des Rezeptors bindet. Je nach Aufarbeitungsmethode kann man unterschiedliche Informationen über den Rezeptor erhalten (Abb. 17).

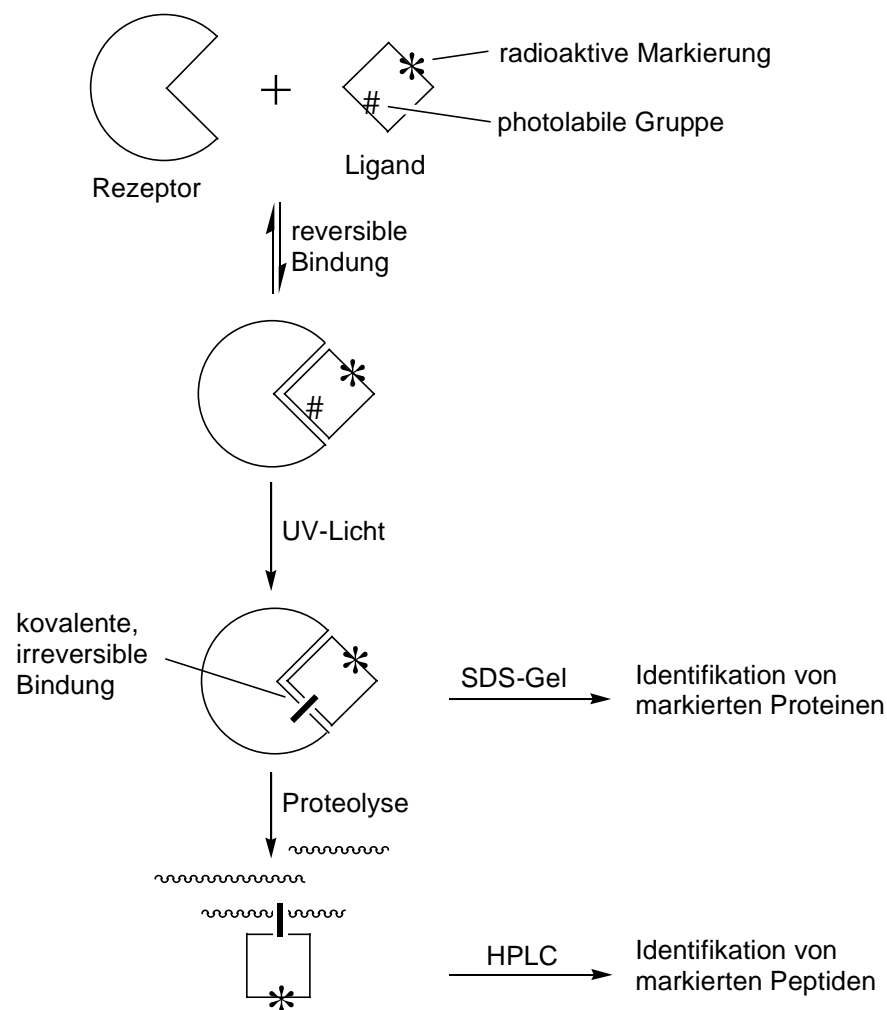


Abb. 17: Schema einer Photoaffinitätsmarkierung

Durch Aufreinigung mittels SDS-Gel erhält man das ganze Protein mit dem markierten Liganden. Es ist zudem sinnvoll, Informationen über die genaue Umgebung des Liganden in der Rezeptortasche zu gewinnen. Dazu proteolysiert man das Protein und erhält ein markiertes Peptid bzw. nach weiterer Hydrolyse eine markierte Aminosäure, die zusammen Hinweise auf den Bereich der Sequenz des Rezeptors geben, der für die Erkennung verantwortlich ist.

Photoaffinitätsmarkierung stellt in vielen Fällen die einzige Möglichkeit dar, Informationen über einen Rezeptor zu gewinnen. Dabei ist hier die besondere Schwierigkeit, dass Veränderungen der Struktur der Jasmonsäure (**20**), z.B. durch Anbringen einer photolabilen Gruppe, zum Verlust oder zumindest zu einer starken Reduktion der biologischen Aktivität führen. So ist die Verlängerung der Pentenylseitenkette mit sperrigen Resten sehr kritisch. An der unsubstituierten Seite des Fünfrings sind keinerlei Veränderungen erlaubt. Die Seitenkette mit der Säurefunktion kann zwar ohne Aktivitätsverlust verlängert werden, aber größere Substituenten sind nicht möglich.<sup>60</sup>

Hier kann das Indanoyl-Isoleucin-Konjugat (**31**) als JA-Analogon weiterhelfen. Diese neue Leitstruktur bietet potentielle Freiheitsgrade für strukturelle Veränderungen und löst trotzdem die gleiche biologische Antwort in Pflanzen aus wie Jasmonsäure. So kann man aus einem Strukturvergleich bereits erste Informationen gewinnen. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Veränderungen an der Ketofunktion in Coronatin (**28**) oder JA (**20**) die Aktivität der Verbindungen herabsetzen.<sup>45,61,62</sup> Ein Grund könnte in der Hinderung des Übergangs vom tetragonalen  $sp^3$ - zum planaren  $sp^2$ - $\alpha$ -Kohlenstoff der Ketofunktion (Abb. 18) liegen.

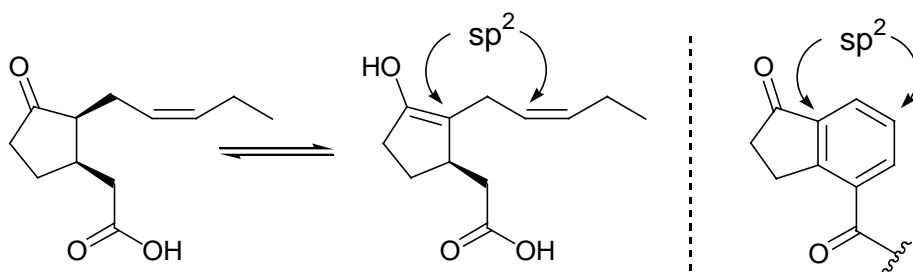


Abb. 18: Infolge der Keto-Enol-Tautomerie ist die Jasmonsäure an C-7 planar. Beim Indanonderivat sorgt der aromatische Sechsering für die gleiche Planarität.

Diese Grenzstruktur der Keto-Enol-Tautomerie wird beim Indanonderivat durch die Planarität des aromatischen Rings erreicht. Ausgehend von der Enolform der JA wäre



auch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor möglich, beispielsweise über die Wechselwirkung mit Wasserstoffbrückenakzeptoren (Abb. 19).<sup>54</sup>

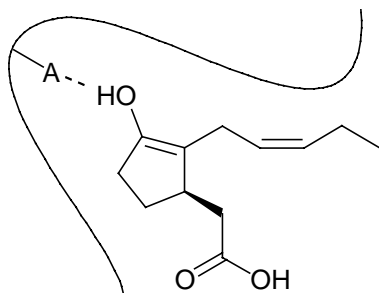


Abb. 19: Mögliche Wasserstoffbrückenbindung der Enolform von JA zu einem Rezeptor oder Bindeprotein. A=H-Brückenakzeptor.

KRUMM konnte zeigen, dass sowohl die entsprechenden Alkohol-, Thiol- und Oximderivate als auch das Chlorindenderivat der Indanoylverbindung aktiv sind. Dagegen zeigten Verbindungen ohne entsprechende Funktionalisierung an C-1 keine Aktivität.<sup>63</sup>

Diese Informationen sind beim Entwurf eines Photoaffinitätsmarkers und der damit verbundenen Veränderung der Indanon-Struktur **31** zu berücksichtigen. Hier bleibt somit vor allem der Aromat von **31** als Ort einer möglichen Modifizierung.

### 3.1.1 Auswahl einer photolabilen Gruppe

Im Laufe der Weiterentwicklung der Photoaffinitätsmarkierung sind seit den sechziger Jahren eine ganze Reihe photolabiler Gruppen entwickelt worden.<sup>64-66</sup> Ihnen allen liegt das Prinzip zugrunde, nach Bestrahlen mit energiereichem Licht hochreaktive Intermediate zu bilden, die schnell mit funktionellen Gruppen der Rezeptoren reagieren können. Im Folgenden sind aus der großen Vielfalt der photolabilen Gruppen einige potentielle Photoaffinitätssonden aufgeführt, die in Betracht gezogen wurden. Die Auswahl musste nach synthetischer Zugänglichkeit und dem potentiellen Einfluss auf die biologische Aktivität getroffen werden.

#### **Arylazide**

Eine der beliebtesten Gruppen an Photoaffinitätssonden sind die Arylazide. Wie viele der anderen photolabilen Gruppen setzen sie bei Belichtung Stickstoff frei. Sie sind einfach zu synthetisieren und haben eine hohe Stabilität im Dunkeln. Allerdings ist

ihre Zerfallschemie sehr komplex. So kann das zunächst gebildete Singulett-Nitren sich in ein Didehydroazepin umlagern, welches die eigentliche reaktive Spezies ist, oder es kann durch Interkombination (*intersystem crossing*, ISC) ein Triplett-Nitren bilden (Abb. 20). Dieses kann dann nicht mehr zur Markierung beitragen. Insertionsreaktionen des Singulett-Nitrens konnten bisher nicht beobachtet werden.

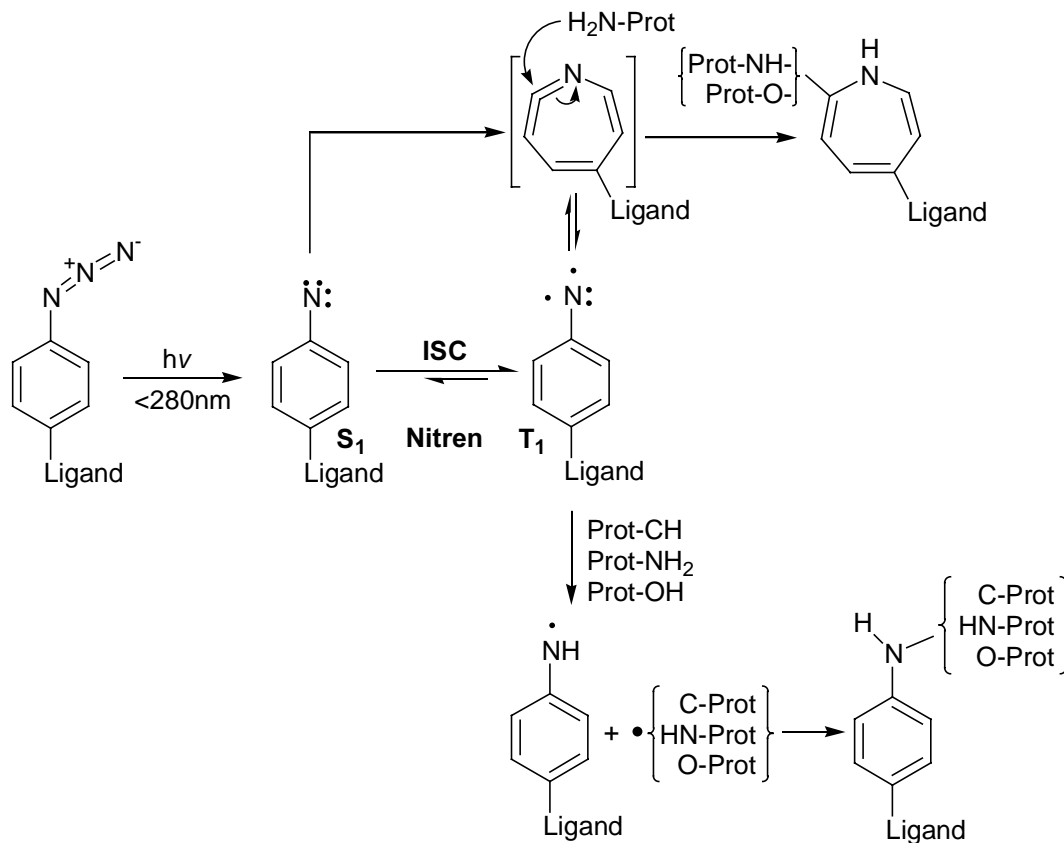


Abb. 20: Arylazide als Photoaffinitätssonden und ihre Reaktionen mit funktionellen Gruppen von Proteinen (=Prot)

Die Art der Reaktion des Nitrens ist sehr stark von den Substituenten des Aromaten abhängig. So reagiert das *para*-Nitroarylazid in Cyclohexan und in Gegenwart von Diethylamin fast vollständig zum Nitroanilin, während sich das *para*-Chlorarylazid vollständig zum Didehydroazepin umlagert.<sup>67</sup>

### Benzophenone

Die Benzophenone gehören zu den effektivsten Sonden. Sie reagieren über radikalische Zwischenstufen und sind in protischen Lösungsmitteln stabil. Ihre Radikalchemie ist definiert. Der Nachteil liegt im großen Raumbedarf. Der synthetische Aufwand ist nicht sehr groß, zudem sind einige dieser Verbindungen kommerziell erhältlich.

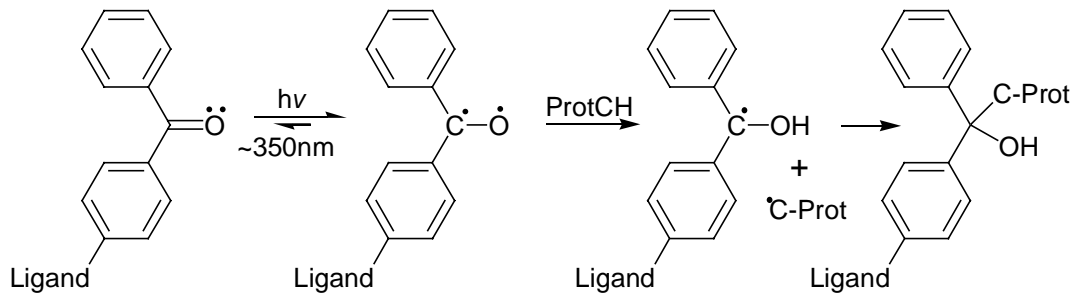


Abb. 21: Benzophenone als Photoaffinitätssonden (Prot= Protein).

Nach der Diradikalbildung wird zunächst ein H-Atom abstrahiert und danach die kovalente Bindung zum Rezeptor ausgebildet.

### Diazirine

Diazirine wurden erstmals 1975 von SMITH und KNOWLES als Photoaffinitätssonden vorgeschlagen.<sup>68</sup> Eine Weiterentwicklung sind die Trifluormethylaryldiazirine, die sich durch vorteilhafte photochemische Eigenschaften und hervorragende chemische Stabilität auszeichnen.

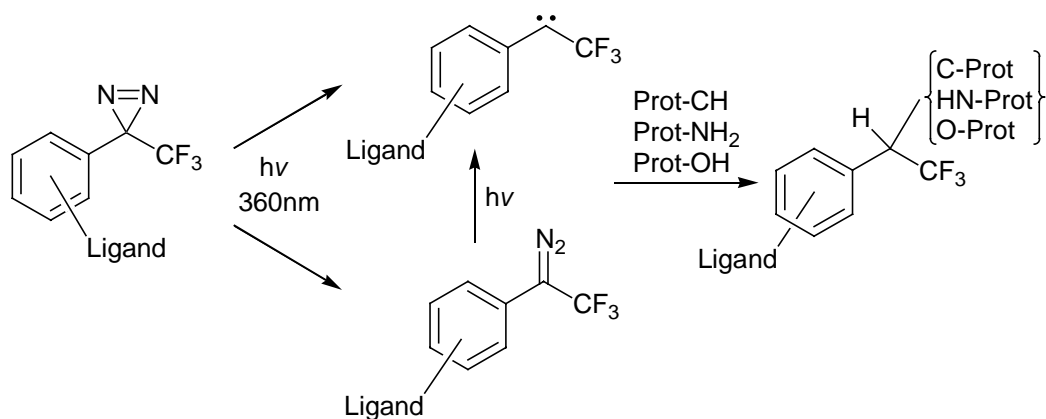


Abb. 22: Diazirine als Photoaffinitätssonden

Nach Bestrahlen zerfällt das Diazirin zum Carben oder isomerisiert zur linearen Diazoverbindung, die wiederum zum Carben zerfällt. Dieses reagiert dann mit verschiedenen funktionellen Gruppen in einer Einschubreaktion.

### 3.1.2 Übertragung auf das Indanongerüst

Das Hauptproblem bei der Erweiterung des Indanonkonjugats (**31**) mit einer photolabilen Gruppe ist die Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität des resultierenden Photoaffinitätsmarkers.

Aus den Arbeiten von KRUMM wird klar, dass solche deutlichen Veränderungen am Aminosäureteil des Konjugats nicht möglich sind. Zu groß ist schon der Einfluss kleinerer Strukturänderungen durch den Austausch von L-Isoleucin mit ähnlichen Aminosäuren.<sup>63</sup> Es kommt also für entsprechende Veränderungen nur der Indanoylteil in Frage.

Durch Vergleich der Strukturen des Coronatins (**28**) und der Jasmonsäure (**20**) mit der Indanoylleitstruktur (**31**) ergibt sich die 6-Position des Indanons (Abb. 23) als bester Platz für einen Substituenten.

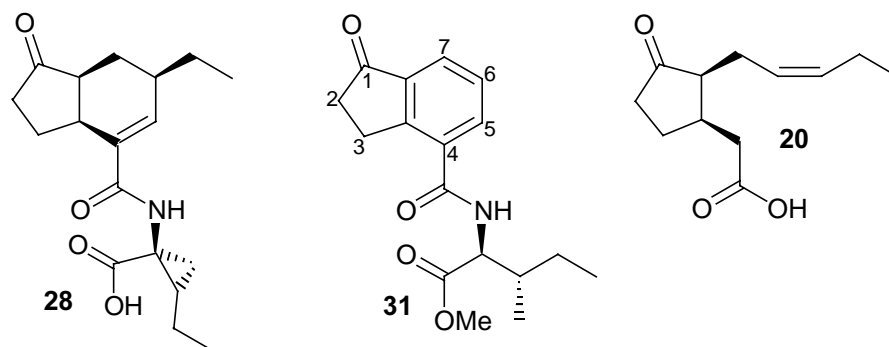


Abb. 23: Strukturvergleich von Coronatin, **31** und JA

Der Platzbedarf der photolabilen Gruppe sollte an dieser Stelle im Idealfall in der Größenordnung der Substituenten von Coronatin (Ethyl-) und Jasmonsäure (Propenylgruppe) liegen. Von den oben aufgeführten Photosonden würde ein Arylazid dieser Vorgabe am besten entsprechen, doch auch ein Trifluormethyldiaziridin liegt noch in dieser Größe.

Aufgrund des idealen Platzbedarfs und des einfachen synthetischen Zugangs fiel die Entscheidung auf den 6-Azido-indanoyl-L-isoleucinmethylester (**40**) als Synthesziel.

### 3.1.3 Synthese des Photoaffinitätsmarkers

Die Kupplung der 6-Azidoindanoncarbonsäure (**41**) mit einer Aminosäure sollte nach der bisher verwendeten HOBt-aktivierten Methode möglich sein.<sup>69</sup> Eine intensive Literaturrecherche zeigte für die Synthese der 4,6-substituierten 1-Indanone, dass bisher keine passend funktionalisierte Substanzen bekannt waren.

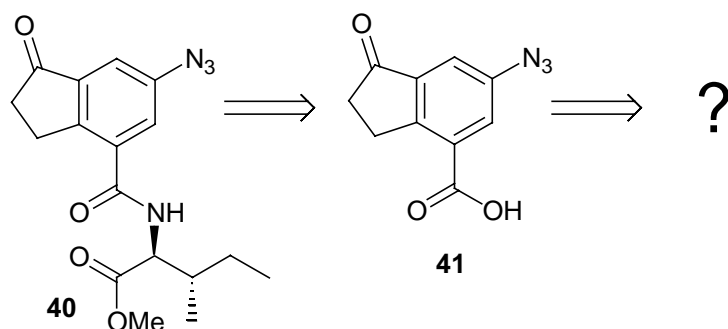


Abb. 24: Retrosynthetische Überlegung zu **40** und **41**

Die von KRUMM beschriebene Synthese der 4-substituierten Indanoncarbonsäure (**44**) geht von der kommerziell erhältlichen *ortho*-Carboxyzimtsäure aus. Diese wird mit Wasserstoff an Pd/C hydriert<sup>70</sup> und anschließend in einer Salzsäure aus Natriumchlorid und Aluminiumtrichlorid intramolekular cyclisiert.<sup>71</sup> Dabei bildet sich *in situ* zunächst das Säurechlorid, das dann die Friedel-Crafts-Acylierung eingeht (Abb. 25).

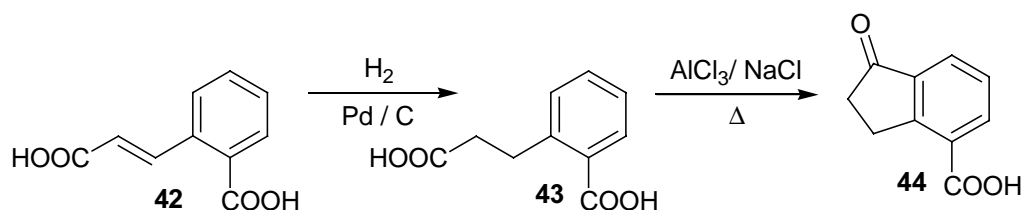


Abb. 25: Synthese der Indanoncarbonsäure (**44**)

Die direkte Funktionalisierung der Indanoncarbonsäure **44** wäre der einfachste Zugang zu **41** gewesen, vor allem da die Keto- und die Carboxyfunktion *meta*- und die Alkygruppe *para*-dirigierend sind. Jedoch zeigte sich, dass alle Versuche, die 6-Position zu funktionalisieren, durch die deaktivierende Wirkung dieser erstgenannten Substituenten fehl schlugen oder die gewünschte Verbindung nur als Nebenprodukt ergaben.

So führten beispielsweise alle Bromierungsversuche mit den unterschiedlichsten Reagenzien und Bedingungen nur zur Bromierung des Fünfrings, aber nicht zur Reaktion am Aromaten. Aus diversen Nitrierungsversuchen erhielt man das gewünschte Produkt nur als Spur neben zahlreichen Oxidationsprodukten (Abb. 26).

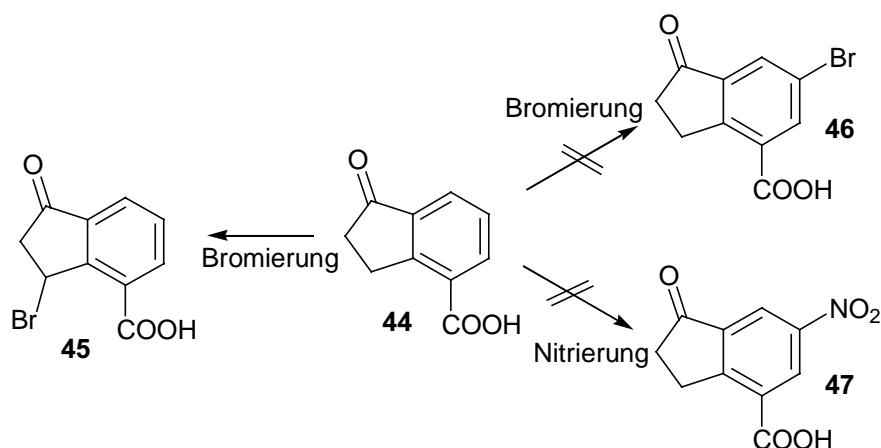


Abb. 26: Funktionalisierungsversuche der 6-Position von **44**

Weitere Literaturrecherchen führten zu Arbeiten von ANDREWS und HARVEY, welche die hydrierte *ortho*-Carboxyzimtsäure (**43**) in *meta*-Position zur Säure funktionalisieren konnten.<sup>72</sup> Dabei entsteht durch Nitrierung die Verbindung **48**, die das korrekte Substitutionsmuster (Abb. 27) aufweist. Diese Reaktion gelingt mit einer Ausbeute von 81%. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser erhält man leicht gelbliche, plättchenförmige Kristalle.

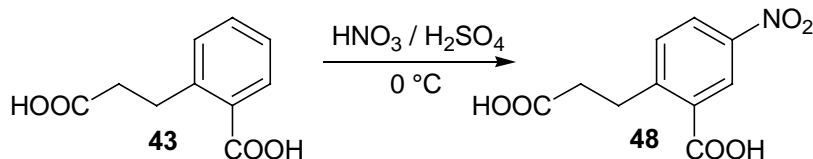


Abb. 27: Reaktion zu 2-2'-Carboxyethyl-5-nitrobenzoesäure (**48**)

Leider ist bei der 2-2'-Carboxyethyl-5-nitrobenzoesäure (**48**) der Aromat durch die Nitrofunktion nun so stark deaktiviert, dass eine Friedel-Crafts-Cyclisierung nicht mehr möglich war. Selbst die Variation von Lewis-Säuren und Temperatur brachte keine Lösung.

Aus diesem Grund muss die Nitrogruppe in einen Substituenten mit aktivierender Wirkung umgewandelt werden, der sich überdies möglichst einfach in ein Azid überführen lassen sollte. Die Nitrogruppe wird deshalb zunächst zum Amin reduziert. Statt der Prozedur von ANDREWS<sup>72</sup> zu folgen, einer Hydrierung in Methanol bei 50 °C und 50 atm Druck mit Raney-Nickel als Katalysator, wurde eine drucklose Hydrierung in Natriumhydroxidlösung mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator bei Raumtemperatur vorgenommen. Nach der Hydrierung wird der Katalysator abfiltriert

und die Natronlauge vorsichtig mit Salzsäure angesäuert, bis das Produkt (**49**) mit 83% Ausbeute ausfällt und abfiltriert werden kann.

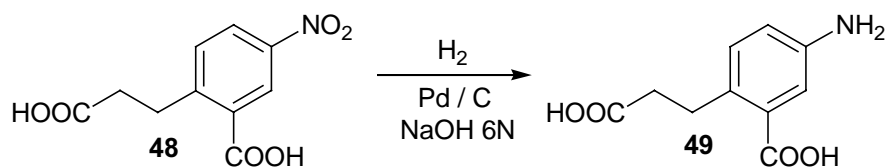


Abb. 28: Hydrierung der Nitrogruppe

Für den nachfolgenden Ringschluss ist eine Schutzgruppe erforderlich. Um das Amin vor einem Angriff der Lewissäure zu schützen, wird es acetyliert. Die gekühlte Reaktion von **49** mit Acetylchlorid in Diethylether und Triethylamin als Base verläuft glatt zu 85% (**50**).

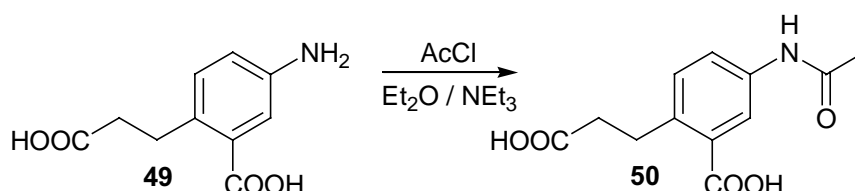


Abb. 29: Schutz der Aminofunktion als N-Acetylaminogruppe (**50**)

Die Friedel-Crafts-Acylierung gelingt nun ohne Probleme und auch schon bei niedrigerer Temperatur als beim Ringschluss zur nicht substituierten Indanoncarbonsäure **44**. Die Ausbeute an **51** ist mit 77% zufriedenstellend.

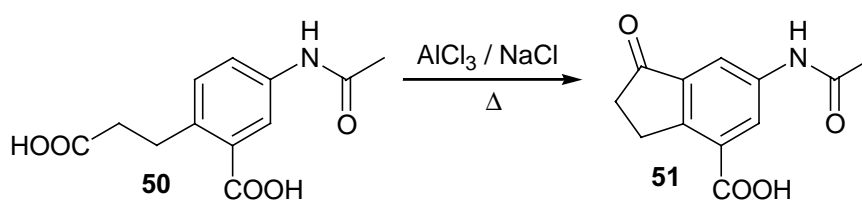


Abb. 30: Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung von **50**

Für die Diazotierung des Amins und der Transformation zum Azid **41** muss zunächst die Schutzgruppe sauer entfernt werden. Das Amin **49** wird danach in Fluoroborsäure gelöst und unter Kühlung durch Zugabe von wässriger  $\text{NaNO}_2$ -Lösung diazotiert. Nach kurzem Rühren wird wässrige  $\text{NaN}_3$ -Lösung zugetropft, und unter Stickstoffentwicklung bildet sich das Azid **41**. Die drei Reaktionsschritte gelingen mit einer Gesamtausbeute von 78%.

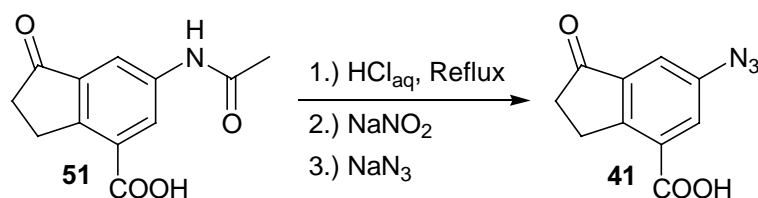


Abb. 31: Synthese der Azidofunktion

Die Kupplung mit dem L-Isoleucinmethylester gelingt nach einem Protokoll von KRUMM in THF mit HOBT, DCC und N-Ethylmorpholin als Base.<sup>63</sup> Die Ausbeute dieser Reaktion liegt bei 82%.

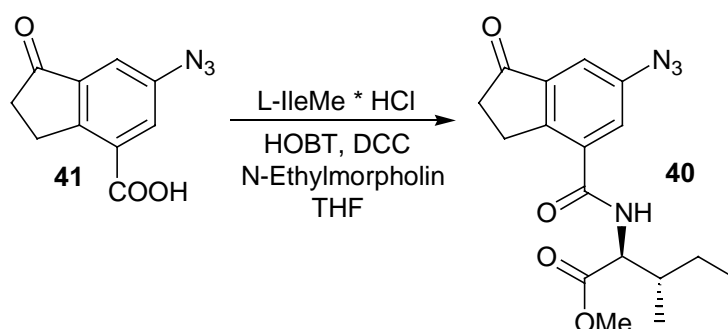


Abb. 32: Knüpfung der Amidbindung zwischen **41** und dem Isoleucinmethylester

Durch diese sieben Reaktionsschritte erhält man den „kalten“ potentiellen Photoaffinitätsmarker **40** in einer guten Gesamtausbeute von 28%. Die Substanz erweist sich im Dunkeln und festen Zustand als sehr stabil. Die Gesamtreaktion ist in Abb. 33 zusammengefaßt.

Um die Eignung dieser neuen Verbindung als Photoaffinitätsmarker sicherzustellen, müssen verschiedene Eigenschaften getestet werden. Zunächst muss man sicherstellen, dass die neue Verbindung auch wirklich mit den gleichen Rezeptoren bzw. mit den gleichen Bindeproteinen wie JA und Coronatin wechselwirkt, also ob der Marker in der Pflanze auch die gleiche biologische Aktivität zeigt wie der Originalligand **28**.

Zudem ist zu zeigen, dass die photolabile Gruppe bei Bestrahlung mit UV-Licht zerfällt und ein reaktives Intermediat bildet, welches dann mit den Rezeptor reagiert.



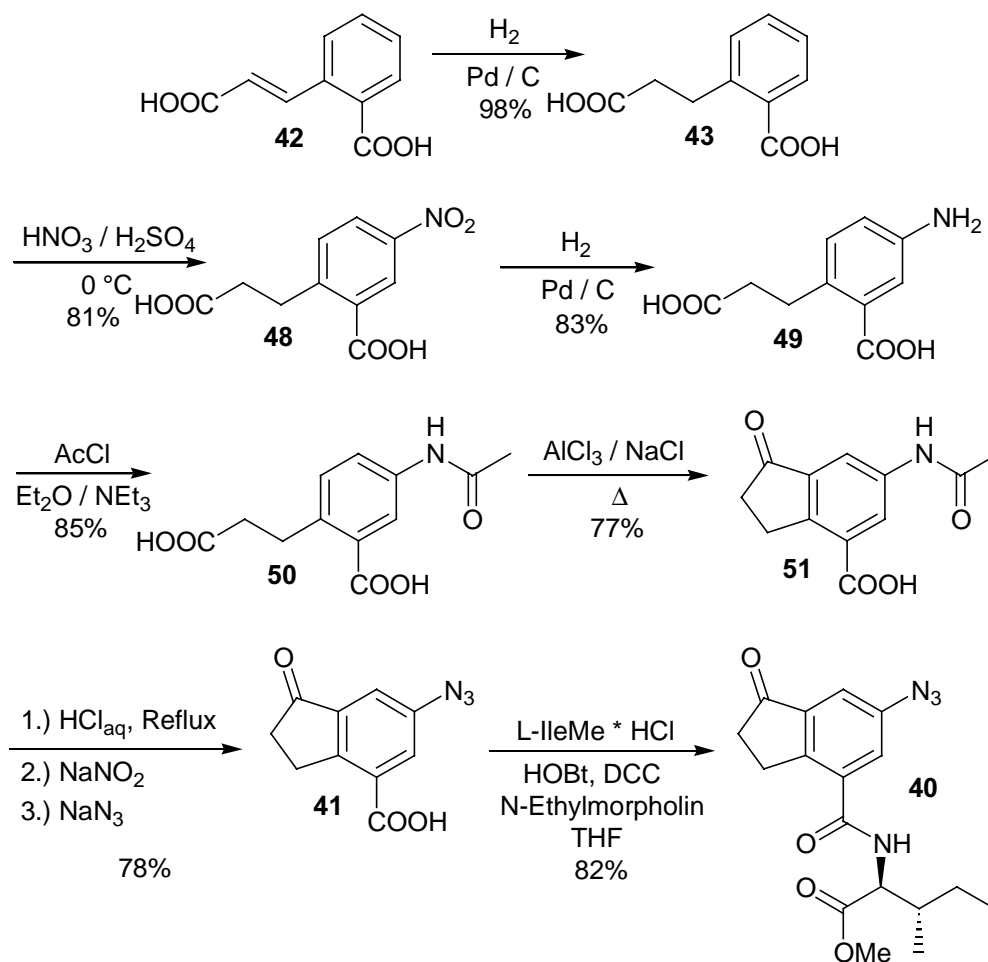


Abb. 33: Gesamtreaktionssequenz zum 6-Azido-4-indanoyl-L-Isoleucinmethylester (**40**)

### 3.1.4 Test der biologischen Aktivität

In der Einleitung wurden viele Beispiele für die biologische Wirkung von Coronatin **28** und Jasmonsäure **20** auf Pflanzen aufgeführt. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von JA sollte deshalb eine Wirkung in vielen unterschiedlichen biologischen Systemen zu beobachten sein.

#### Duftstoff-Biosynthese

Wie schon in der Einleitung beschrieben zeigt die Limabohne ein ausgesprochen komplexes Duftmuster, dessen Zusammensetzung durch den Elicitor bestimmt wird. Die neue Verbindung sollte ein Duftspektrum aufweisen, das dem nach der Elicitierung mit Coronatin (**28**) bzw. mit dem Indanoyl-L-Isoleucinmethylester (**31**) entspricht. Das GC-Profil des Duftes nach Elicitierung mit einer Lösung des Azido-Indanoyl-L-Isoleucinmethylesters (**40**) ist in Abb. 34 gezeigt. Dabei wurden Limabohnenpflanzen mit zwei voll ausgebildeten Blättern abgeschnitten und in einem

Exsikkator in eine wässrige Lösung des Elicitors gestellt. Über 24 Stunden wurde der emittierte Duft an einem Aktivkohlefilter gesammelt. Die Duftstoffe wurden mit einer kleinen Menge Dichlormethan eluiert und mittels GC/MS analysiert. 1-Bromdecan (50  $\mu\text{M}$ ) diente dabei als interner Standard (siehe Anhang).

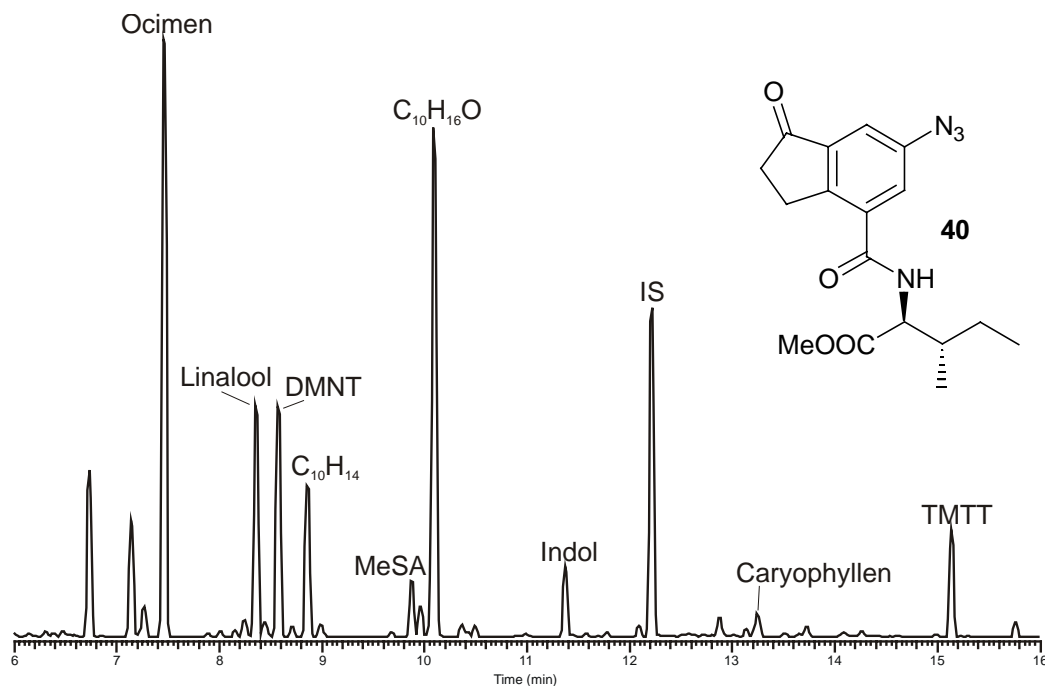


Abb. 34: Duftspektrum der Limabohne nach Elicitierung mit **40** (IS= interner Standard)

Das Chromatogramm zeigt alle Verbindungen, die für mit Jasmonsäure induzierten Duft typisch sind: Ocimen, Linalool, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O, Indol und Caryophyllen. Dazu kommen hier noch, wie auch beim Coronatin, die beiden Homoterpene DMNT und TMTT und Methylsalicylat.

Rein qualitativ wird durch den Vergleich der drei Chromatogramme (**28**: Abb. 14; **31**: Abb. 15; **40**: Abb. 34) deutlich, dass sich der Coronatincharakter des Duftes durch Einführung des Azids gegenüber dem Duftprofil nach Elicitierung mit **31** erhöht hat. Die Homoterpene und MeSA haben deutlich zugenommen und das Verhältnis zwischen dem durch JA induzierten Duftmuster und dem Alamethicin/Stress-Muster ist identisch mit dem im Coronatin-Duft. Insgesamt ist allerdings die Menge der Duftstoffe geringer, was man durch Vergleich der internen Standards (IS) feststellen kann.

Der Substituent an der 6-Position ist für den Unterschied zwischen JA- und Coronatin-Mimik verantwortlich. Hier scheint eine elementare Stelle für die Steuerung der

Wirkung des Elicitors zu liegen. Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang werden in Kapitel 3.3.1 erläutert.

Die Tatsache, dass die photolabile Gruppe selbst einen so großen Einfluss auf die biologische Aktivität hat, macht Hoffnung, dass der Photoaffinitätsmarker (**40**) sehr tief in der Rezeptortasche sitzt und somit nach der Markierung auch entsprechend genaue Informationen über dieses Zentrum gewonnen werden können.

### **Rankenkrümmung („tendrils coiling“)**

Ein zweiter Bioassay, der an dieser Stelle die biologische Aktivität des Markers deutlich machen soll, ist das schon in der Einleitung erwähnte „tendrils coiling“ (Rankenkrümmung). *Bryonia dioica* (Zaunrübe, Abb. 35) benutzt ihre Ranken, um sich an Zäunen, Büschen oder Bäumen festzuhalten. Berührt eine solche Ranke einen Gegenstand, so wird dieser mechanische Reiz weitergeleitet und löst einen Auxintransport in die gegenüberliegende Seite der Ranke aus. Diese wächst dadurch schneller als die andere Seite. Innerhalb weniger Stunden ist die Ranke spiralisiert und hat sich um den Gegenstand gewickelt.



Abb. 35: *Bryonia dioica* (Zaunrübe) mit Ranken

Der mechanische Reiz der Berührung kann auch durch chemische Elicitoren ausgelöst werden (Abb. 36). Dazu wird die Ranke abgeschnitten und in eine Lösung des Elicitors gestellt. Vergleicht man nach einigen Stunden die Rankenkrümmung der Proben mit der der Kontrollen, so zeigt dieser Assay Spiralisierung mit Jasmonsäure **20** bei Konzentrationen von 0,5-1 mM und höher. Für Coronatin **28** sind Konzentrationen von 1-10  $\mu\text{M}$  ausreichend.<sup>45,73</sup>

In Abb. 36 sind die Effekte nach Applikation verschiedener Konzentrationen des Azidoindanoyl-L-Isoleucinmethylesters (**40**) im Vergleich zu einer Jasmonsäure-Positiv-Kontrolle und einer Wasser-Negativ-Kontrolle gezeigt.

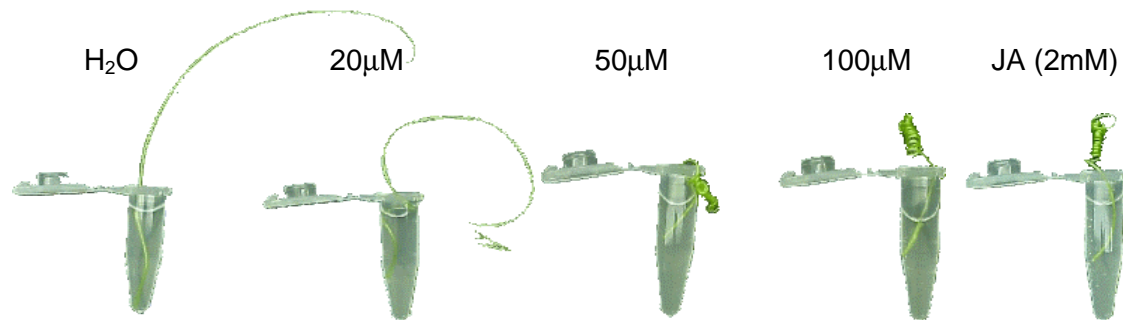


Abb. 36: Rankenkrümmung bei *Bryonia dioica* in Wasser, in Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von **40** und in Jasmonsäurelösung

Die Leerprobe zeigt keine Reaktion. Die beiden höheren Konzentrationen der Elicitorlösungen sowie die Jasmonsäurelösung führen zu einer starken Spiralisierung. Die sehr schwache Rankenkrümmung bei 20 µM deutet darauf, dass in diesem Bereich die Grenzkonzentration liegt, die zur Auslösung der Reaktion bei der Ranke notwendig ist. Diese liegt um den Faktor 20 bis 50 unterhalb der von Jasmonsäure, jedoch immer noch 10 bis 20fach höher als die von Coronatin.

Auch in diesem Bioassay zeigt sich wieder ein ähnliches Ergebnis wie beim Duftassay: Coronatin wirkt schon in deutlich geringeren Konzentrationen als Jasmonsäure. Das könnte daran liegen, dass Coronatin mit einem potentiellen Rezeptor oder Bindeprotein eine bessere Wechselwirkung ausbilden kann. Der Photoaffinitätsmarker liegt in seiner Aktivität wiederum zwischen den beiden Naturstoffen.

### Genexpression von JIP 23 in Gerstenblättern

Gerste produziert nach Verwundung oder nach Elicitierung mit Jasmonaten eine ganze Reihe neuer Proteine. Eines der größten, das JIP 23 (*jamonate-inducible protein*), wurde identifiziert und das Gen sequenziert.<sup>74</sup> Allerdings ist seine Funktion noch unbekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass die JIPs eine wichtige Rolle bei mikrobiellen Infektionen spielen, so ist JIP 15 z.B. ein Blatt-Thionin mit hoher Fungizität.<sup>20,75</sup>

In früheren Versuchen wurde bereits die Aktivierung der Genexpression für das Protein JIP 23 durch Indanone getestet. Dies geschah wie auch beim Azid in Kooperation mit WASTERNAK vom IPB in Halle.

Dieser Bioassay ist besonders wichtig um sicherzustellen, dass der neue Photoaffinitätsmarker auch wirklich qualitativ die biologische Aktivität des Coronatins imitieren kann, denn die bisherigen Indanon-Konjugate (z.B. **31**) zeigten im Gegensatz zu JA, MeJA und Coronatin keine Expression von JIP 23.<sup>54,76</sup>

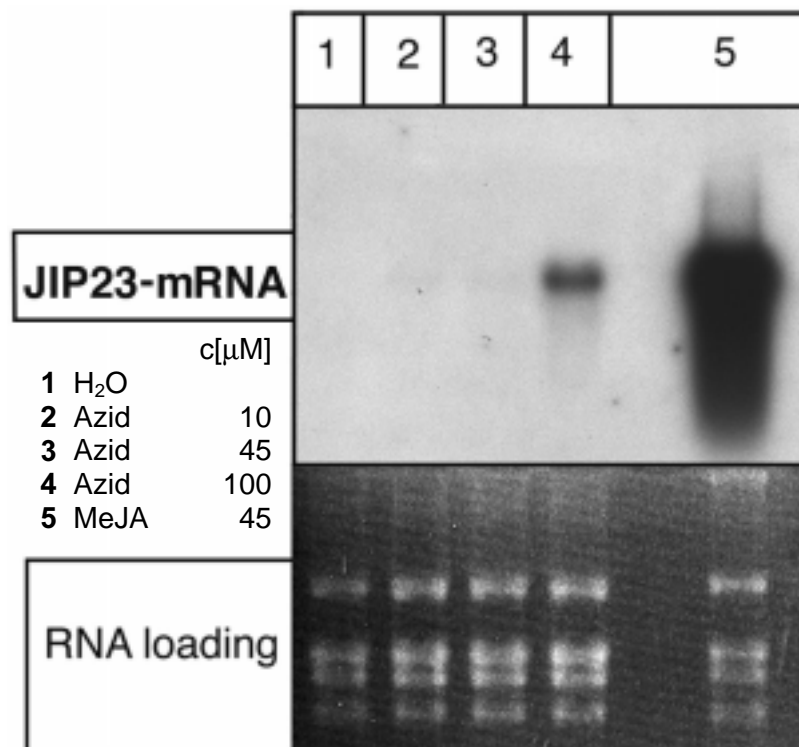


Abb. 37: Northernblot der JIP 23 Genexpression nach 24 h an Gerste mit Azidoindanon-Isoleucinmethylester (**40**) als Elicitor.

Im Gegensatz zu diesen bisherigen Ergebnissen wird im Northernblot nach Elicitierung mit der Azido-Verbindung (**40**, 100  $\mu$ M) eine deutliche Bande der mRNA von JIP 23 beobachtet. Es ist auch zu erkennen, dass JA in diesem Assay aktiver ist. JA zeigt schon bei 45  $\mu$ M eine deutlich stärkere Expression. Für Coronatin sind schon Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M ausreichend, um eine entsprechende Expression zu induzieren.<sup>76</sup>

Das Azid (**40**) zeigt in diesem sehr empfindlichen Test biologische Aktivität. Diese ist zwar deutlich geringer als die des Coronatins (**28**), aber hier wird wieder deutlich, dass durch Einführung des Azids an die Indanon-Leitstruktur **31** die strukturelle Ähnlichkeit zu Coronatin und somit die biologische Aktivität stark erhöht wurde.

### 3.1.5 Photolyse und Ausbildung eines reaktiven Intermediates

Wie schon in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, haben die Arylazide verschiedene Möglichkeiten, nach Bestrahlen mit UV-Licht zu zerfallen und mit einem Rezeptor zu reagieren. Die Substituenten am Aromaten beeinflussen dabei die photochemische Reaktion und prägen die Reaktivität des gebildeten Intermediates. Das vereinfachte Schema (Abb. 39) zeigt die unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten des Singulett-Nitrens **52** nach Bestrahlung des Azids **40** und der Abspaltung von Stickstoff (Abb. 38).

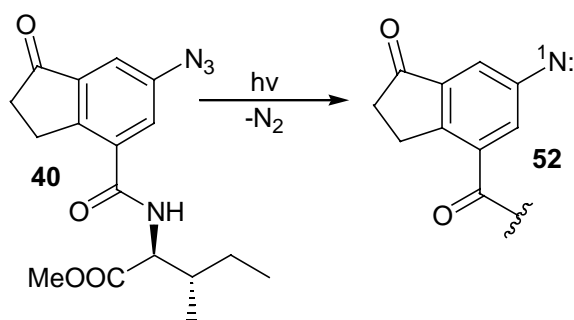


Abb. 38: Ausbildung des Singulett-Nitrens **52** aus dem Azid **40** nach Bestrahlen mit UV-Licht

Das Singulett-Nitren reagiert in einer unspezifischen Einschubreaktion mit beliebigen Aminosäuren oder mit dem Lösungsmittel. Das Didehydroazepin reagiert dagegen nur mit geeigneten Nucleophilen, z.B. Cystein- und Histidinseitenketten. Häufig sind Aminosäuren mit Hydroxylgruppen oder protonierten Seitenketten wie Lysin nicht nucleophil genug. Die Radikalchemie des Triplett-Nitrens ist nicht gut voraussagbar. Die Art des reaktiven Intermediats spielt somit eine wichtige Rolle zum Verständnis der Photochemie des Markers. Es ist deshalb nützlich zu wissen, welche reaktive Spezies sich vorwiegend bildet. Zudem muss man zeigen, dass der Photoaffinitätsmarker wirklich eine kovalente Bindung mit einem Zielmolekül ausbilden kann, wenn er bestrahlt wird.

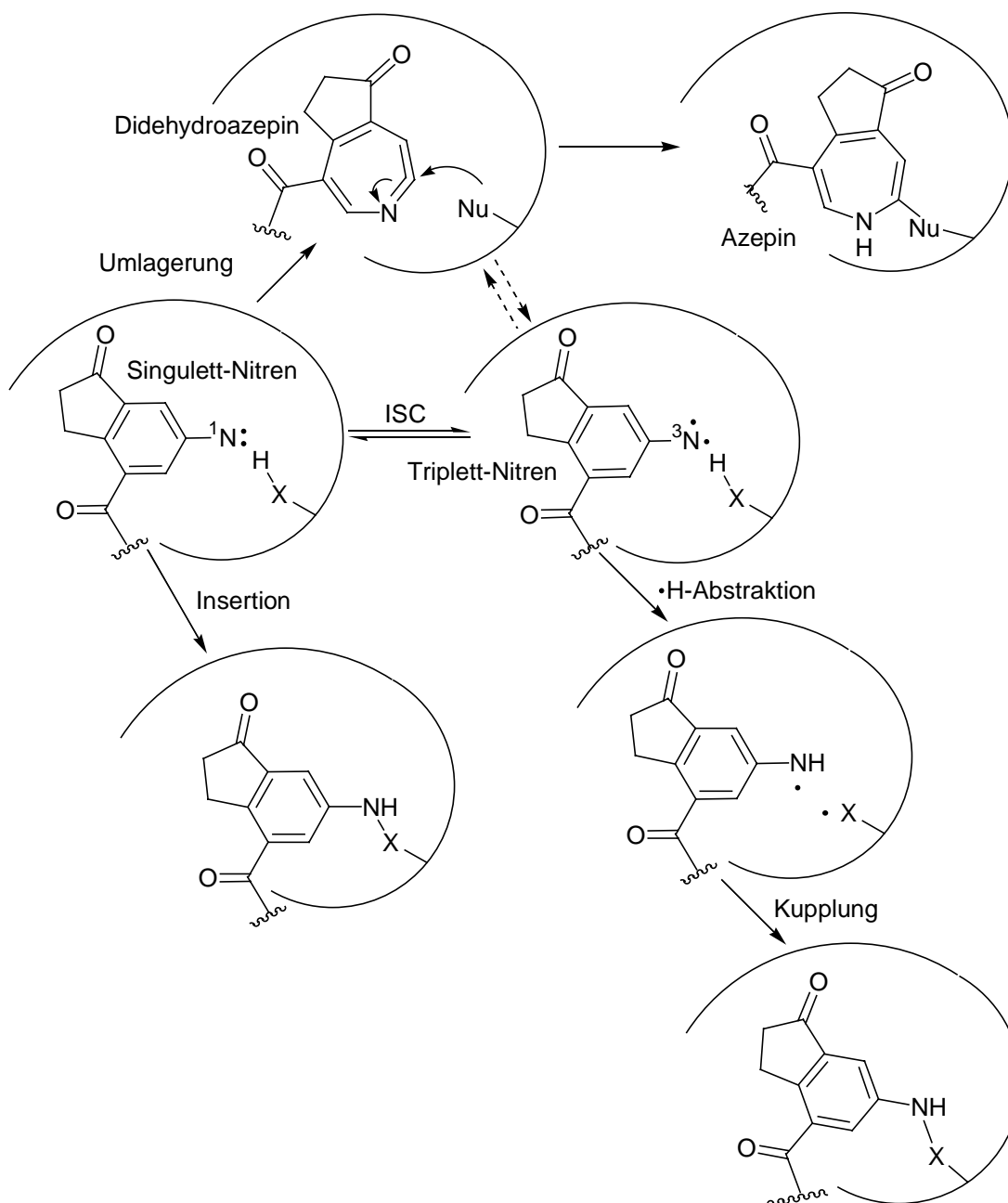


Abb. 39: Mechanistische Alternativen der Kupplung von Arylnitrenen an biologische Rezeptoren.<sup>65</sup> ISC: *Intersystem Crossing*

Für diesen Versuch wurde **40** in THF gelöst (1mM) und mit einem 100fachen Überschuss an Diisopropylamin versetzt. Das Amin sollte als Nucleophil fungieren und das Intermediat abfangen. Die Mischung wurde 2 Stunden mit UV-Licht bestrahlt und die Produkte anschließend analysiert.

Das Hauptprodukt der Photoreaktion (ca. 42 %) ist eins der beiden Moleküle **54** oder **56** (Abb. 40). Aufgrund der Geometrie der möglichen Produkte sind die beiden Moleküle **54** und **56** im NMR nicht zu unterscheiden.

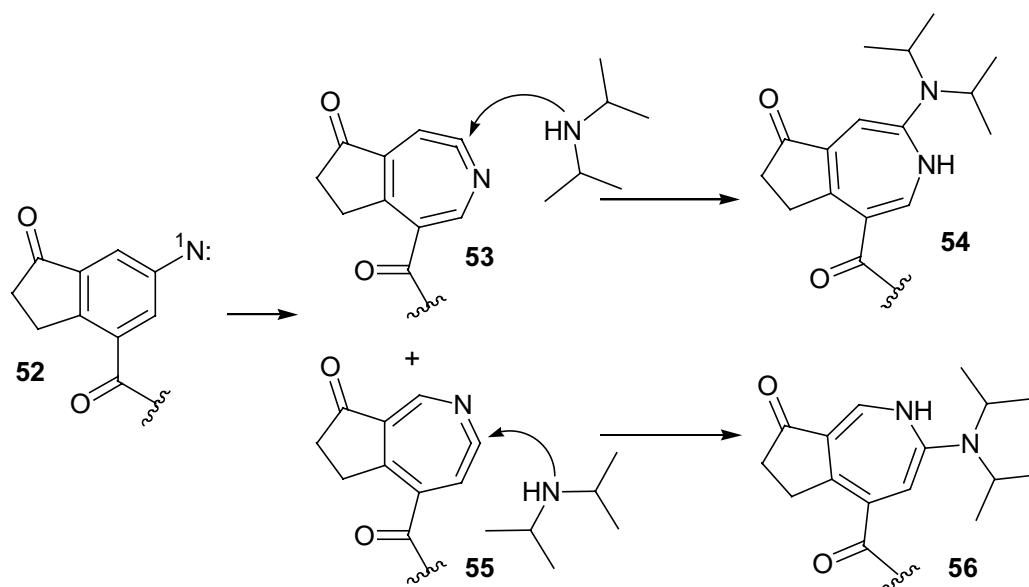


Abb. 40: Hauptprodukte (**54**, **56**) der Reaktion von **40** in THF in Gegenwart von Diisopropylamin

Der Versuch zeigt, dass ein großer Teil des Singulett-Nitrens über das Didehydroazepin abreagiert. Es ist somit anzunehmen, dass der Photoaffinitätsmarker (**40**) bevorzugt mit nucleophilen Aminosäuren des Rezeptors reagieren wird.

### 3.1.6 Bestimmung der Reaktionsordnung bei Zerfall

Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde die Reaktionsordnung des lichtinduzierten Zerfalls des Azids untersucht. Wieder wurde das Azid (**40**) in THF (1mM) gelöst und mit einem 100fachen Überschuss an Diisopropylamin versetzt. Die Photolyse mit wenig intensivem UV-Licht (6W, 254 nm) wurde diesmal in einer UV-Küvette (d= 1 cm) vorgenommen. Die Lösung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Bestrahlung am UV-Spektrometer vermessen (Abb. 41).



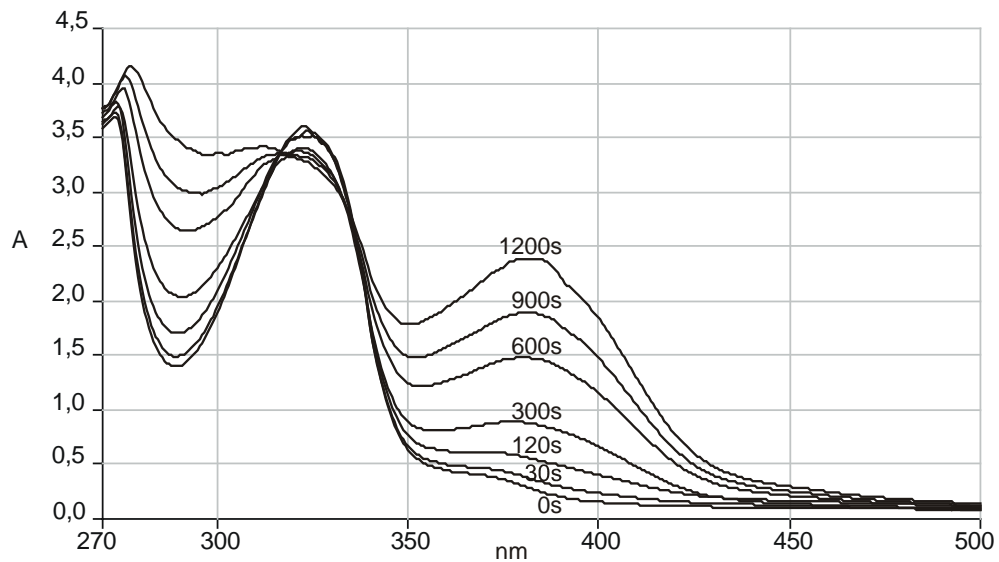


Abb. 41: UV-Spektren des Reaktionsgemisches von **40** und Diisopropylamin nach unterschiedlichen Belichtungszeiten

Trägt man die Zunahme der Absorption des Chromophors  $[\Delta A]$  gegen die Zeit auf, so erhält man eine Kurve (Abb. 42), aus der man die Halbwertszeit und die Reaktionsordnung ermitteln kann. Um die Fehler durch Absorption des Eduktes möglichst gering zu halten, wurde die Zunahme der Absorption bei 400 nm gemessen.

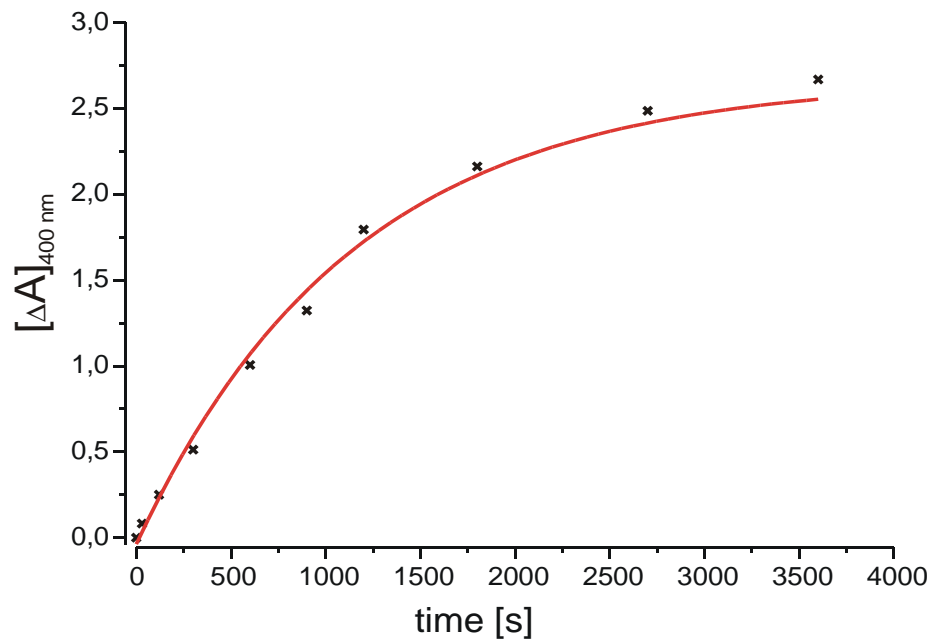


Abb. 42: Zunahme der Absorption bei 400 nm  $[\Delta A]$  während des Reaktionsverlaufs

Man erhält einen umgekehrt exponentiellen Verlauf. Dies ist nur bei Reaktionen erster Ordnung der Fall. Dabei gilt:

$$[A] = [A_0] e^{-kt}$$

Aus den Messwerten ergibt sich bei diesen Reaktionsbedingungen eine Reaktionskonstante von  $k = 0.877 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  und daraus über die Beziehung

$$t_{1/2} = (\ln 2) / k$$

eine Halbwertszeit des Eduktes von 790 sec.

Aus der Tatsache, dass es sich um eine Reaktion erster Ordnung handelt, kann man ableiten, dass es ein einfacher Zerfall ist, der nur von der Konzentration des Eduktes beeinflusst wird und keine langlebigen Zwischenstufen beinhaltet.

### 3.1.7 Überprüfung der Reaktionsfähigkeit mit Makromolekülen

Neben der Reaktionsfähigkeit mit kleinen Nucleophilen wie dem Diisopropylamin war auch interessant, ob der potentielle Photoaffinitätsmarker außerdem mit nucleophilen Seitenketten von Proteinen reagieren kann. Um diese Eigenschaft zu überprüfen, wurde Myoglobin als Test-Protein mit günstigen MS-Eigenschaften eingesetzt. Eine wässrige Myoglobinlösung wurde mit einer wässrigen Lösung der Azido-Verbindung (40) vermischt, so dass das Azid im großen Überschuss vorlag. Wiederum wurde die Mischung bei 254 nm 20 min bestrahlt. Das Wasser wurde *in vacuo* entfernt und die Probe im MALDI-TOF-MS vermessen. Als Vergleich wurde eine identisch behandelte Probe ohne Azidzugabe gemessen.

Spektrum a) (Abb. 43) zeigt die Messung des Myoglobins mit Sapininsäure als Matrix. Spektrum b) zeigt die Messung der bestrahlten Mischung aus Azid und Protein. Neben dem Signal des Proteins (16956 Da) sind verschiedene weitere Signale zu sehen, deren Differenz zum Protein jeweils einem Vielfachen der Masse des reaktiven Intermediats 53 (316 Da) entspricht.

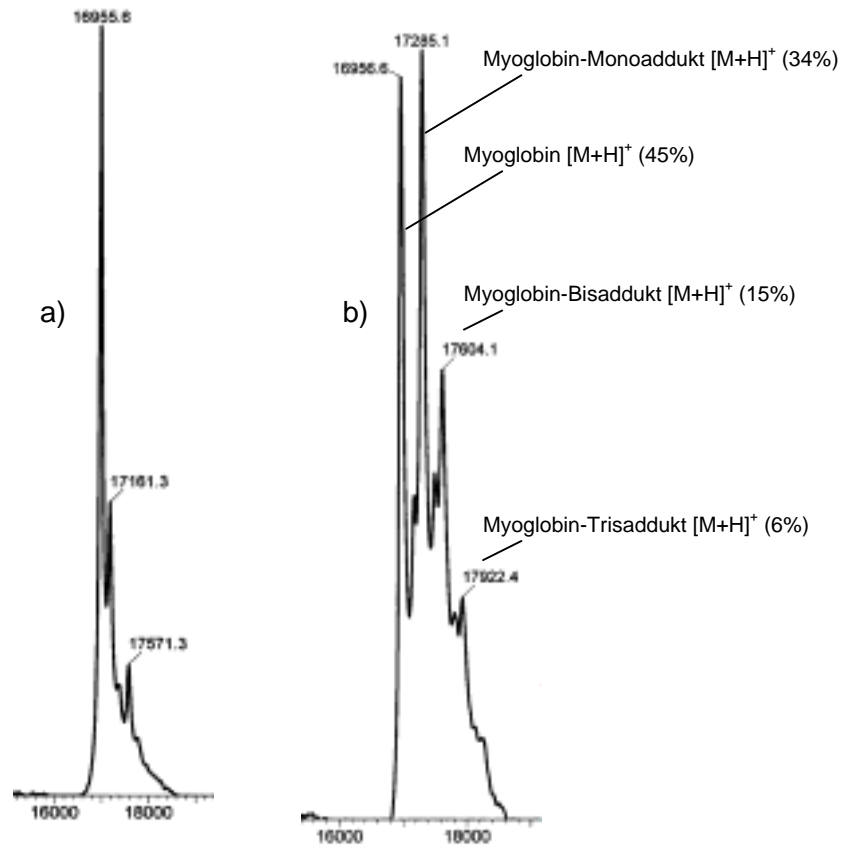


Abb. 43: MALDI-TOF Spektren von a) Myoglobin; b) Myoglobin mit Azid bestrahlt

Diese Adduktbildung ist natürlich völlig unspezifisch. Sie kommt möglicherweise nur dadurch zustande, dass sich ein Teil des im großen Überschuss zugegebenen Markers an hydrophobe Bereiche des Proteins anlagert und dann dort nach Bestrahlung mit dem Myoglobin reagiert. Dennoch erbringt dieser Versuch den Nachweis, dass eine kovalente Bindung auch mit Makromolekülen ausgebildet werden kann.

### 3.1.8 Fluoreszenz des Zerfallsproduktes

Ein interessantes Ergebnis aus dem Versuch in Kapitel 3.1.5 ist die sehr große Fluoreszenz des Reaktionsproduktes **54**. Das Didehydroazepin mit den chromophoren Carbonylgruppen (Abb. 44) schafft die Voraussetzung für die Fluoreszenz.

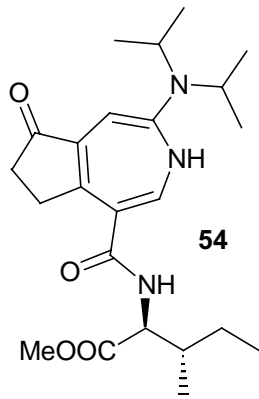


Abb. 44: Hauptprodukt des Bestrahlungsversuchs aus Kapitel 3.1.5

Schon während der Reaktionskontrolle mittels DC fällt die hellblaue Fluoreszenz des Produktes auf. Die entsprechende Fluoreszenzmessung zeigt eine starke Absorption bei 375 nm und eine Emission um die 486 nm (Abb. 45).

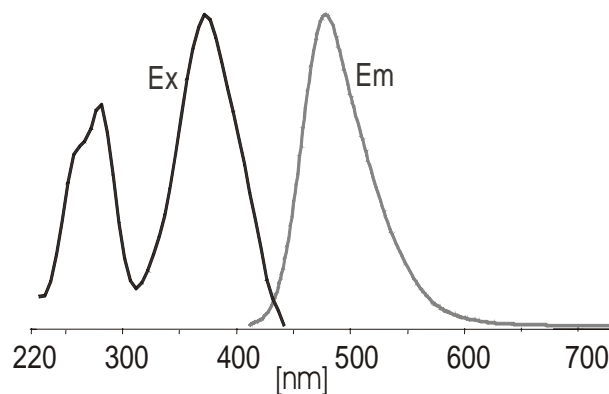


Abb. 45: Fluoreszenzspektrum (**54**) Ex:375 Em: 486 in Acetonitril

Es stellte sich die Frage, ob man die starke Fluoreszenz nicht zur Detektion bei der Photoaffinitätsmarkierung nutzen kann. Die Detektion mittels Fluoreszenz statt Radioaktivität wäre zwar weniger empfindlich, aber deutlich einfacher, billiger und würde keine Synthese mit radioaktiven Vorstufen erfordern.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde das „markierte“ Myoglobin aus dem Versuch in Kapitel 3.1.7 (Seite 42) mit einem Fluoreszenzmikroskop auf seine Fluoreszenz getestet. Während normales Myoglobin bei Anregung mit UV-Licht zwischen 300 und 400 nm keine Fluoreszenz zeigt, konnte man beim Myoglobin-Azid-Addukt ein deutliches bläuliches Leuchten beobachten (Abb. 46).

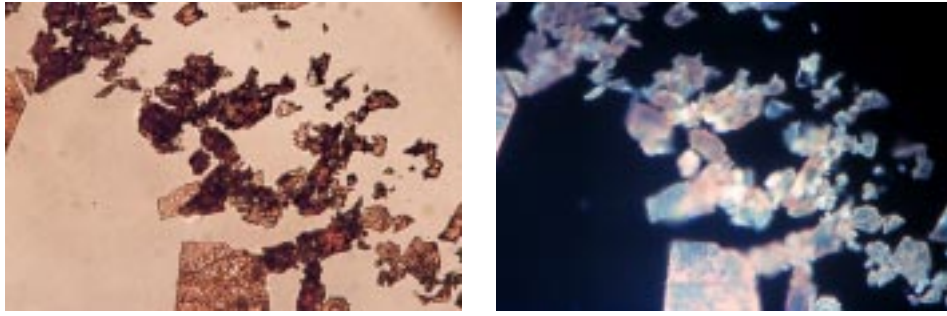


Abb. 46: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (links: Hellfeld, rechts: Fluoreszenz)

Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Fluoreszenz um Artefakte eingelagerter Marker handelt, die nicht kovalent an das Protein gebunden sind, wurde das Produkt aus Myoglobin und Azid nach der Bestrahlung mittels RP-HPLC und einem Fluoreszenz-Detektor untersucht (Abb. 47).

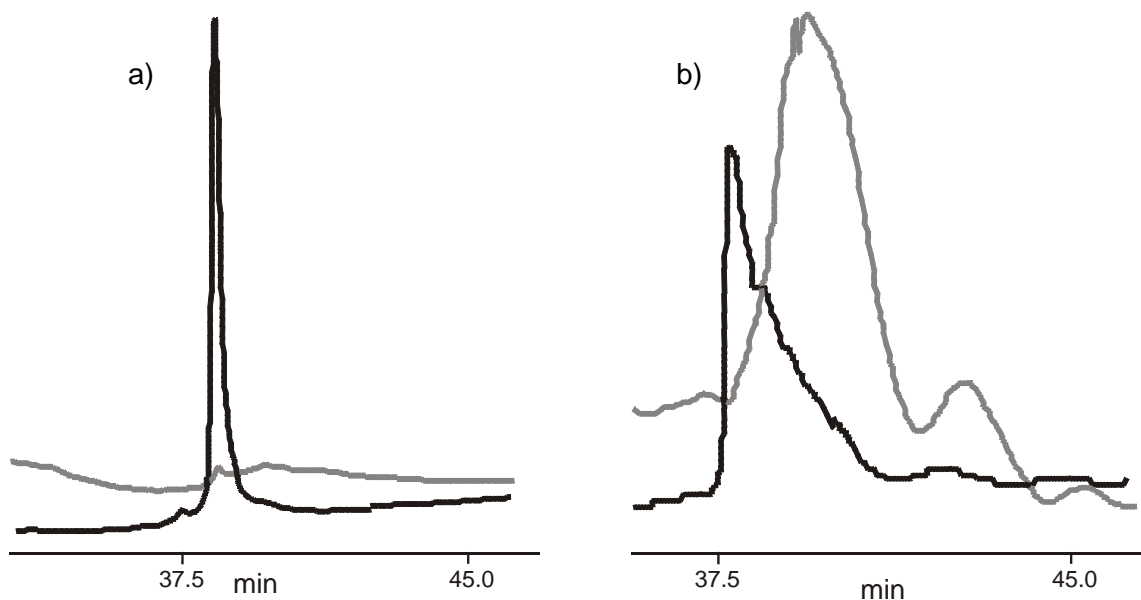


Abb. 47: HPLC-Chromatogramme von a) Myoglobin und b) Myoglobin mit Azid bestrahlt. schwarz: UV 214 nm; grau: Fluoreszenz Em 375 nm Ex 484 nm (Bedingungen siehe Seite 100)

Im Chromatogramm a) ist reines Myoglobin vermessen worden, und es ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Bei b) dagegen ist der UV-Peak sehr viel breiter, und man sieht eine starke Fluoreszenz, die zeitlich versetzt ihr Maximum hat. Dieses Maximum ist um ca. 3 min verschoben und somit nicht mit dem Leervolumen zwischen UV- und Fluoreszenzdetektor zu erklären. Die Wiederholung dieses Experiments mittels LC/MS brachte die nötige Erklärung.

Während das LC/MS-Profil für reines Myoglobin wieder nur einen schmalen Peak zeigt, kann man beim bestrahlten Gemisch erneut die verbreiterte Peakform erkennen (Abb. 48), die bei diesen Chromatographiebedingungen sogar einzelne Schultern zeigt.

Analysiert man das Signal genauer, so erkennt man, dass es aus mindestens fünf verschiedenen Produkten zusammengesetzt ist, deren Verhältnis in etwa mit dem der Markeraddukte des MALDI-TOF-Experiments korreliert. Im frühen Bereich des Peaks (0, Abb. 48) ist nur Myoglobin zu detektieren. Im weiteren Zeitverlauf schließen sich die Bereiche der verschiedenen Myoglobin-Azid-Addukte (1-4) an, die sich gegenseitig stark überlappen. Diese Tatsache macht die genaue Analyse kompliziert, da die Massen aus den mehrfach geladenen Ionen der Proteine durch Dekonvolution zurückgerechnet werden müssen. Die schematische Darstellung zeigt die ungefähre Verteilung der Addukte im Peak (Abb. 48).

Diese Verteilung erklärt zum einen die Verschiebung der Fluoreszenz um bis zu drei Minuten, aber auch die Intensität der Fluoreszenz. Im hinteren Bereich des Peaks ist sie am größten, da sich hier drei und mehr Fluorophore am Myoglobin befinden (Abb. 47).

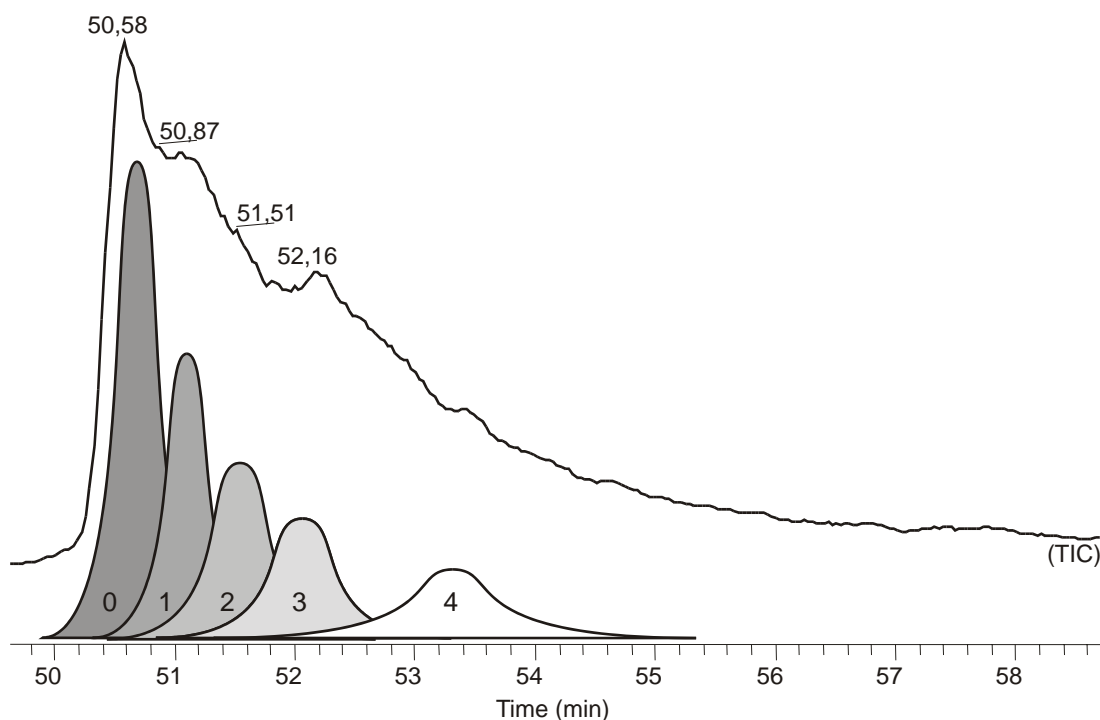


Abb. 48: Schematische Darstellung der Verteilung der verschiedenen Markeraddukte (1-4) am Myoglobin (0) im Peak.

Dieser Versuch zeigt, dass die beobachtete Fluoreszenz des Myoglobins tatsächlich durch die Markeraddukte zustande kommt und dass dadurch die Detektion sehr

geringer Mengen Proteins möglich ist. Es ist allerdings zu überprüfen, ob die enorme Steigerung der Detektionsempfindlichkeit um einen Faktor >100 im Vergleich zum UV-Detektor wirklich ausreicht, um diese Methode bei der Photoaffinitätsmarkierung zu nutzen.

## 3.2 Coronatin-Analoga

### 3.2.1 Bedeutung und Nutzen

Coronatin (**28**) hat in den vergangenen Jahren immer wieder das Interesse auf sich gezogen, da es die biologische Aktivität des zentralen Signalmoleküls Jasmonsäure (**20**) nachahmen kann.<sup>44</sup> Neben Coronatin haben sich auch andere Aminosäurekonjugate von CFA (**29**), insbesondere mit Norcoronamsäure, L-Isoleucin und L-Valin, isolieren lassen und biologische Aktivität gezeigt.<sup>77</sup> Coronatin induziert in höheren Pflanzen ein weites Spektrum von Antworten: diffuse Chlorose,<sup>44</sup> Rankenkrümmung an *Bryonia dioica*,<sup>45</sup> Emission von Ethylen<sup>78</sup> und die Biosynthese von Terpenoiden und anderen Duftstoffen.<sup>43</sup>

Obwohl einige Pflanzensysteme nach Behandlung mit Coronatin (**28**), OPDA (**18**) und Jasmonsäure (**20**) Unterschiede zeigen,<sup>48</sup> scheint Coronatin generell die Wirkung der biologisch aktiven Substanzen des Octadecanoidwegs nachzuahmen.<sup>45</sup> Dabei ist für die Anwendung besonders interessant, dass Coronatin in den meisten Assays eine deutlich höhere Aktivität zeigt als die Pflanzenhormone selbst.

Diese Eigenschaft macht Coronatin zu einem wichtigen Werkzeug, um die Wirkung der Octadecanoide zu studieren und allgemein den Sekundärstoffwechsel von Pflanzen zu aktivieren. Beispielsweise stimuliert Coronatin die Produktion des antitumoraktiven Paclitaxel (Taxol®) in Zellkulturen von *Taxus media* deutlich besser als Jasmonsäure oder Methyljasmonat.<sup>53</sup>

Solche Verbesserungen der Wertstoffproduktion aus Pflanzen haben eine große wirtschaftliche und wissenschaftliche Bedeutung. Daraus ergibt sich ein Bedarf für große Mengen dieses hocheffektiven Elicitors, dessen Gewinnung bisher ausschließlich über die Extraktion von Bakterienkulturüberständen gelingt. Eine effiziente Synthesemethode mit hohen Ausbeuten wäre sehr wünschenswert, um einen einfachen Zugang zu Coronatin (**28**) oder analogen CFA-Konjugaten zu bekommen.

### 3.2.2 Synthesen von Coronafacinsäure

Bisher gibt es zur Darstellung der Coronafacinsäure (**29**) etwa 15 Synthesen, die prinzipiell einer von drei unterschiedlichen Synthesestrategien folgen.<sup>44</sup> CFA wurde durch inter- und intramolekulare Diels-Alder-Reaktionen,<sup>79-82</sup> intramolekularen Ringschluss von Carbonylverbindungen<sup>79,83,84</sup> oder durch Spaltung von tricyclischen Vorstufen synthetisiert (Abb. 50).<sup>85,86</sup> Keine der bisher publizierten Synthesen ist in der Lage, große Mengen der Coronafacinsäure oder verwandter Verbindungen in wenigen Stufen und hoher Ausbeute zu liefern.

Die Problematik liegt offensichtlich in der aufwendigen Synthese der verschiedenen Stereozentren der CFA (**29**). Bisher hat es außer den Indanonkonjugaten von KRUMM und einigen Derivaten von BLECHERT<sup>73</sup> keine weiteren erfolgreichen Versuche gegeben, die biologische Wirkung von Coronatin durch eine strukturell ähnliche und synthetisch einfacher zugängliche Verbindung zu erreichen.<sup>55</sup>

### 3.2.3 Strukturüberlegungen

KRUMM hat mit seinem Indanoyl-Aminosäure-Konjugat **31** einen möglichen Weg zu Octadecanoid-Analoga vorgegeben. Die einfach zugängliche Indanoncarbonsäure (**44**) stellt den Vorläufer und die Leitstruktur für ein neues planares CFA-Mimik dar.

Die Synthese des Photoaffinitätsmarkers **40** mit einer Azidofunktion an der 6-Position des Indanons zeigt eine erhöhte Aktivität. Allerdings ist dieses Molekül durch die photolabile Gruppe nicht universell einsetzbar. Ersetzt man das Azid durch eine Ethylgruppe ergibt sich eine deutlich größere strukturelle Ähnlichkeit (Abb. 49) zu Coronatin, und die Verbindung verliert zudem ihre Lichtempfindlichkeit.

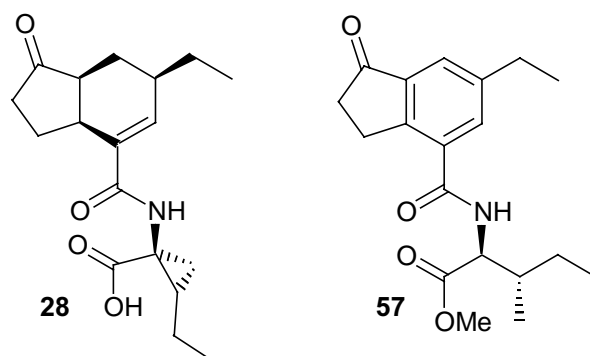


Abb. 49: Coronatin (**28**) und 6-Ethylindanoyl-Isoleucinmethylester (**57**)



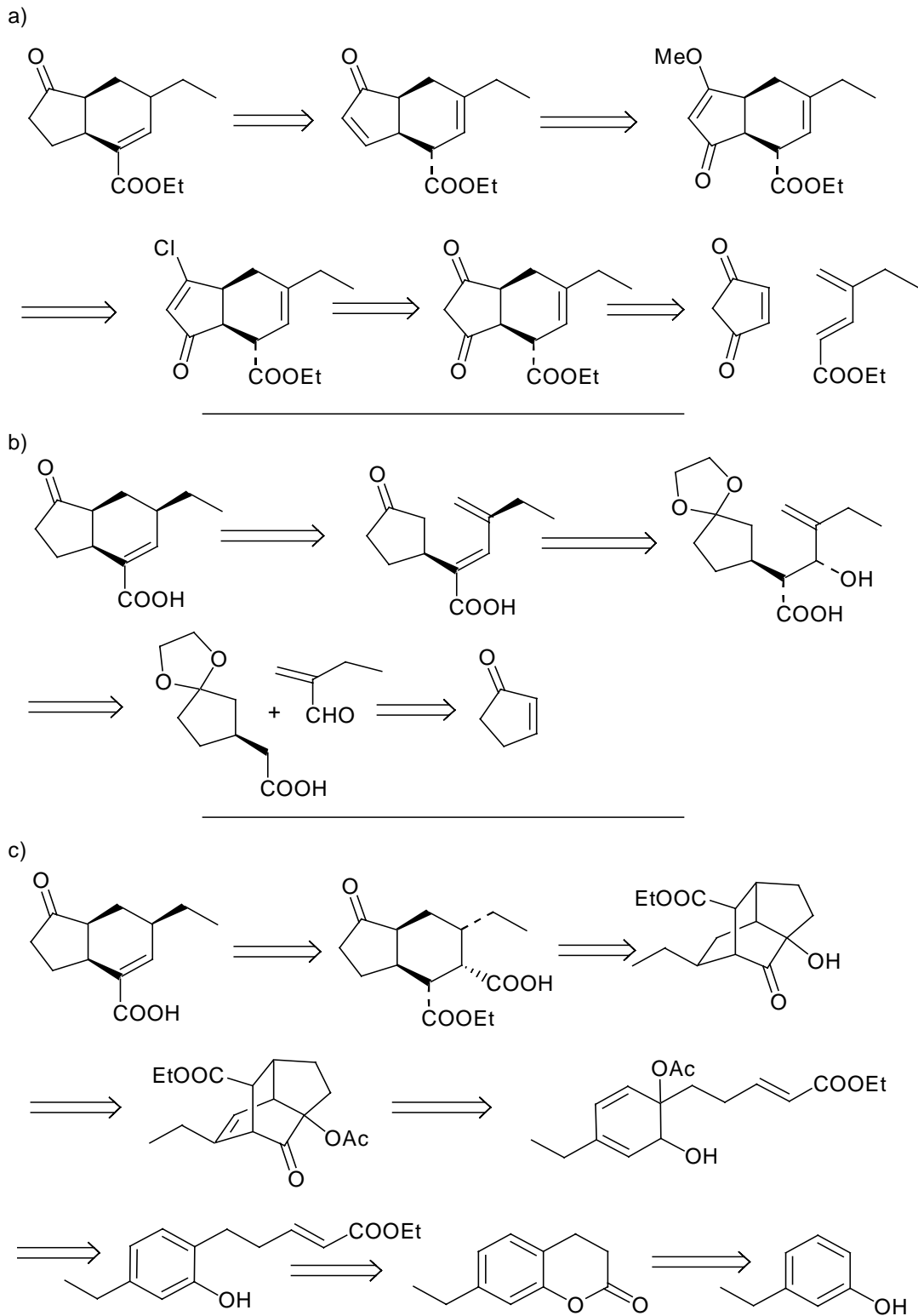


Abb. 50: Schematische Darstellung verschiedener synthetischer Zugänge zur CFA. a) inter- und intramolekulare Diels-Alder-Reaktionen;<sup>81</sup> b) intramolekularer Ringschluss von Carbonylverbindungen;<sup>83</sup> c) Spaltung von tricyclischen Vorstufen.<sup>85</sup>

Die Coronamsäure (**30**) ist ebenfalls äußerst aufwendig zu synthetisieren und wird durch ihre biosynthetische Vorstufe, das L-Isoleucin, ersetzt. Dieser Tausch hat den Nachteil, dass die Amidbindung nun nicht mehr durch eine  $\alpha, \alpha$ -dialkylierte Aminosäure vor Hydrolyse durch Enzyme geschützt ist.

### 3.2.4 Synthese

Der generelle Unterschied in der Synthese zwischen der Azido- **40** und der Ethylverbindung **57** liegt darin, dass im zweiten Fall eine C-C Bindung neu geknüpft werden muss. Dies gestaltet sich aufwendiger als die Umwandlung einer Nitroverbindung **48** zum Azid **41**.

Eine metallkatalysierte C-C-Bindungsknüpfung über die Iodverbindung **59**, ausgehend von der Aminoindanoncarbonsäure (**58**) (Abb. 51), wurde verworfen, weil die Sandmeyer-Reaktion zur Iodverbindung sehr schlechte Ausbeuten ergab (ca. 15%).

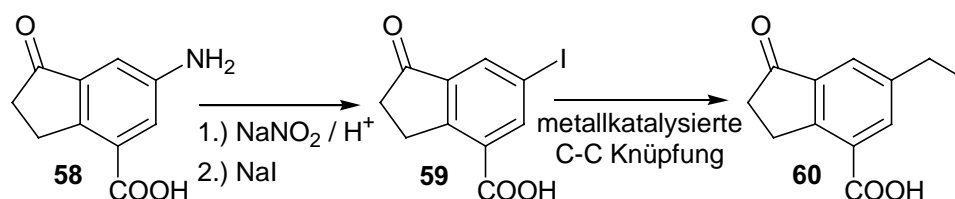


Abb. 51: Verworfenen Syntheseroute zur Ethylindanoncarbonsäure

Weil auch andere Methoden, den Aromaten an der 6-Position zu funktionalisieren, nicht erfolgreich waren (Abb. 26), wurde nach alternativen Ansätzen gesucht.

Ein effizienter alternativer Ansatz liefert nach zwei Reaktionsschritten durch Acylierung von Tetrahydronaphthalin (Abb. 52) und oxidative Spaltung des Addukts zu **64** das richtige Substitutionsmuster am Aromaten (Abb. 53).<sup>87</sup> In Gegenwart von Aluminiumtrichlorid und Acetylchlorid reagiert das Tetralin **61** über eine Reihe von Zwischenstufen zu einem Diketon **62**.

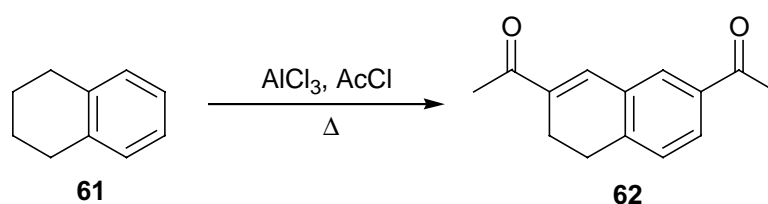


Abb. 52: Synthese des Diketons aus Tetrahydronaphthalin (**61**)

Die Tatsache, dass diese Reaktion nur mit einer Ausbeute von 31% abläuft, wird durch extrem billige Edukte (Tetrahydronaphthalin ist Terpentinersatz) und eine einfache Aufarbeitung durch Destillation ausgeglichen.

Die nachfolgende Oxidation mit wässriger Kaliumperoxidlösung (Abb. 53) verläuft glatt und ausschließlich unter Spaltung der nichtaromatischen Doppelbindung über ein Triketon **63** als Intermediat, das weiter zur Dicarbonsäure **64** oxidiert wird.<sup>87</sup>

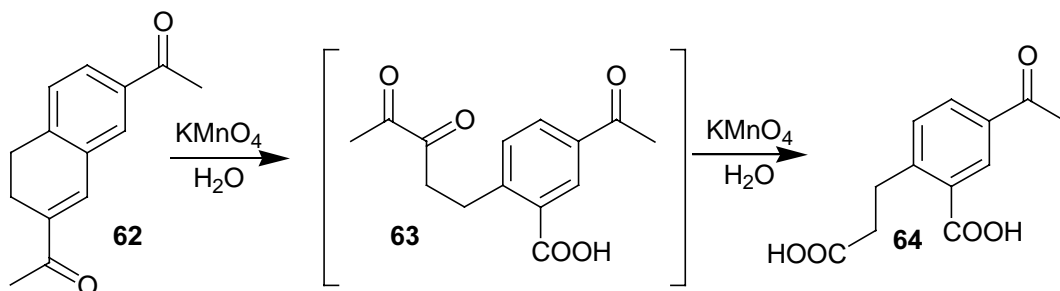


Abb. 53: Oxidation über ein Triketon **63** zur Dicarbonsäure **64**

Die Spaltungsreaktion über das vicinale Diketon ist von hohem synthetischen Wert, weil dabei der einfach ungesättigte Ring aufgebrochen und die überflüssige zweite Acylgruppe elegant entfernt wird. Das so erhaltene Produkt besitzt bereits das richtige Substitutionsmuster für die spätere intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung. Die Reaktion verläuft mit 62% Ausbeute und ergibt einen leicht gelblichen Feststoff.

Die bisherige Reaktionssequenz kann vielfältig angewandt werden, denn die Acylierung funktioniert analog auch mit anderen Säurehalogeniden.

Vor dem intramolekularen Ringschluss muss zunächst die Acylgruppe **64** zur gewünschten Ethylgruppe **65** reduziert (Abb. 54) werden, da die Carbonylgruppe den Aromaten zu stark deaktiviert. Dies gelingt sehr glatt und mit fast 90% Ausbeute durch die Huang-Minlon-Variante<sup>88</sup> der Wolff-Kishner Reaktion, welche dann zur 5-Ethyl-dicarbonsäure **65** führt.

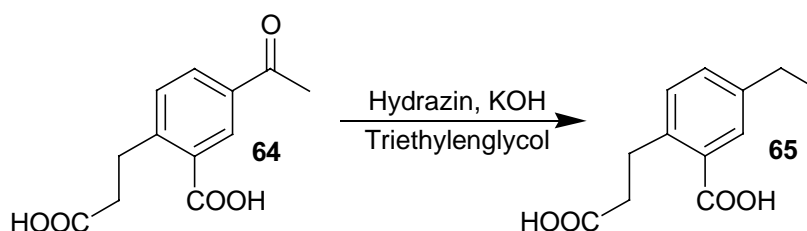


Abb. 54: Huang-Minlon-Reaktion zur Reduktion der Acetylgruppe

Nun kann die Dicarbonsäure in 71% Ausbeute cyclisiert werden (Abb. 55). Erhitzen mit Aluminiumtrichlorid und Natriumchlorid ergibt die 6-Ethylindanon-4-carbonsäure (**60**) als neues CFA-Analogon.

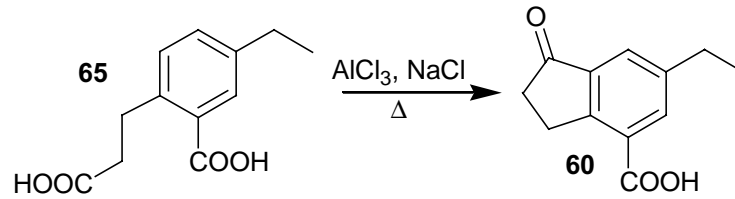


Abb. 55: Friedel-Crafts-Acylierung führt zum intramolekularen Ringschluss

Für die Kupplung des CFA-Analogons mit dem Isoleucinmethylester (Abb. 56) hat sich ein modernes Reagenz bewährt. Durch die Verwendung von HATU (*O*-(7-Aza-1-benzotriazolyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) als Kupplungsreagenz kann die Ausbeute dieser Reaktion auf fast 90% gesteigert werden. Dabei bildet sich im Übergangszustand eine aza-analoge Struktur, in der das Amin wahrscheinlich in der Nähe der Carboxylgruppe fixiert werden kann.<sup>89</sup>

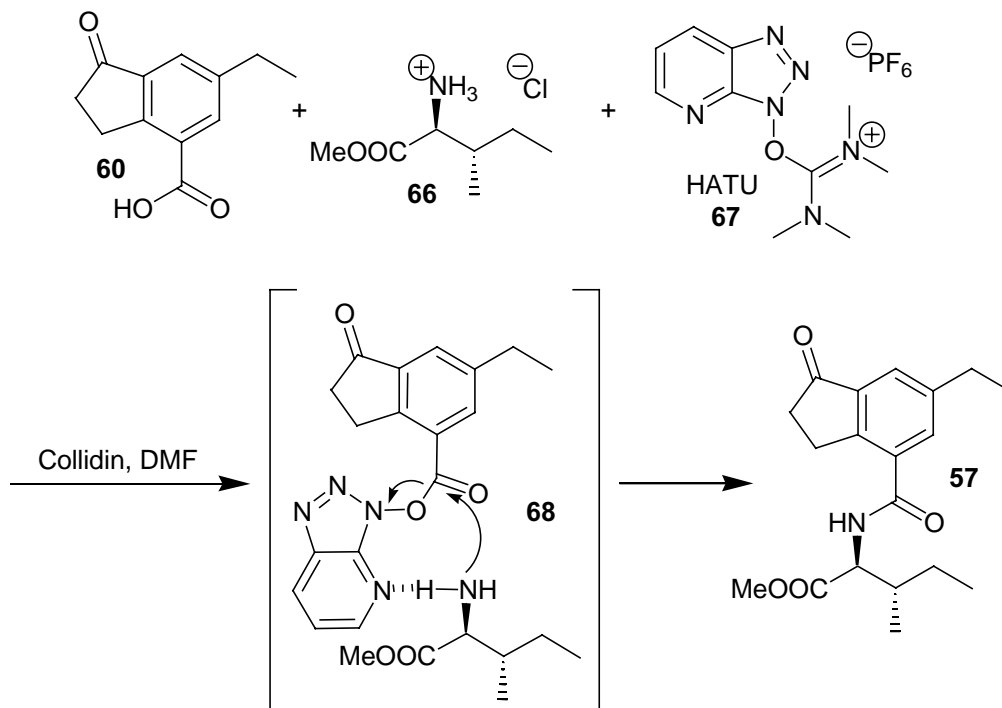


Abb. 56: Amidkupplung zwischen der Ethylindanoncarbonsäure (**60**) und L-Isoleucinmethylester (**66**) mit HATU (**67**) als Hilfsreagenz

Diese Methode ist der HOBt-Methode mit Ethylmorpholin und DCC deutlich überlegen, weil die Ausbeute höher ist, sich weniger Nebenprodukte bilden und somit die Aufarbeitung der Reaktionsmischung einfacher wird.

Das aromatische Analogon der Coronafacinsäure ist in vier einfachen Schritten mit einer Ausbeute von 34 % mit sehr einfachen Methoden günstig herzustellen (Abb. 57). Alle Reaktionsschritte können auch mit größeren Mengen durchgeführt werden und benötigen keine aufwendigen Bedingungen oder Reagenzien. Die Aufreinigung erfolgt durch einfaches Umkristallisieren.

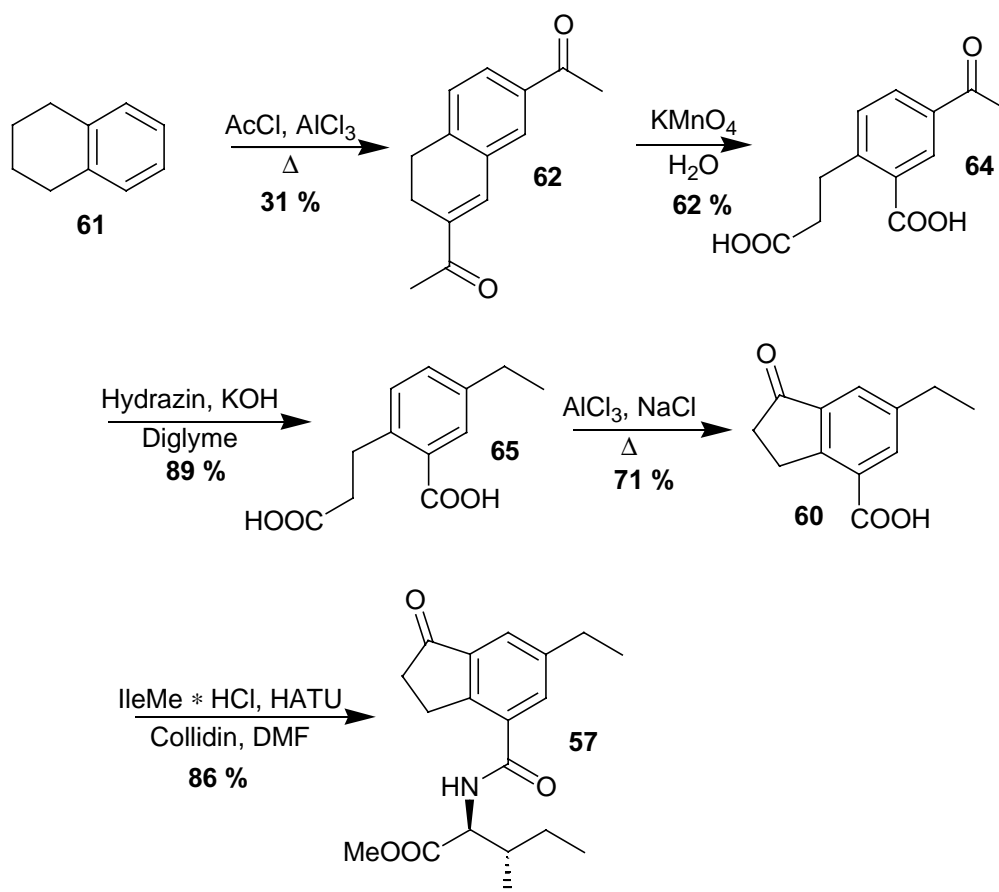


Abb. 57: Übersicht der Gesamtsynthese des Ethylindanoylisoleucinmethylesters **57**

Das Aminosäurekonjugat **57** kristallisiert aus Petroleumbenzin/Essigester (95:5) in monoklinischen farblosen Prismen. Die Röntgenstruktur (Abb. 58) wurde dankenswerterweise von Dr. Helmar Görts vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena aufgenommen. Die Messbedingungen sind der Literatur<sup>90</sup> zu entnehmen.

Zwei Paare symmetrisch-unabhängiger Moleküle des Ethylindanoyl-Konjugats **57** liegen zusammen in einer Elementarzelle. Die beiden aromatischen Systeme sind sandwichartig fixiert und werden durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den schwach sauren Amidn  $\text{-N-H}$  (N1) und den freien Molekülorbitalen der Sauerstoffatome der Ketofunktionen (O1) zueinander in einer *anti*-Orientierung gehalten (Abb. 59).

Die Synthese der 6-Ethylindanoncarbonsäure (**60**) (Kapitel 3.2.4) bietet eine große Flexibilität, da statt des Acetylchlorids auch andere Säurechloride verwendet werden können.

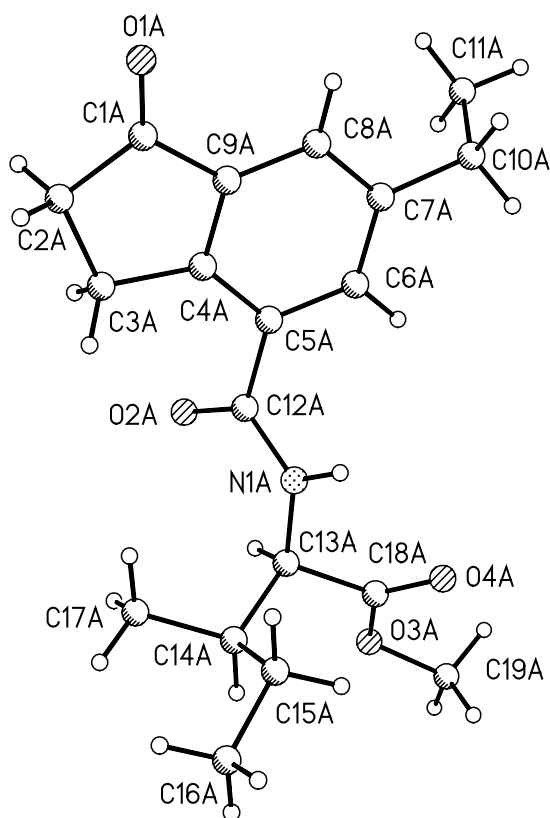


Abb. 58: Röntgenkristallstruktur des Coronatinanalogons **57**

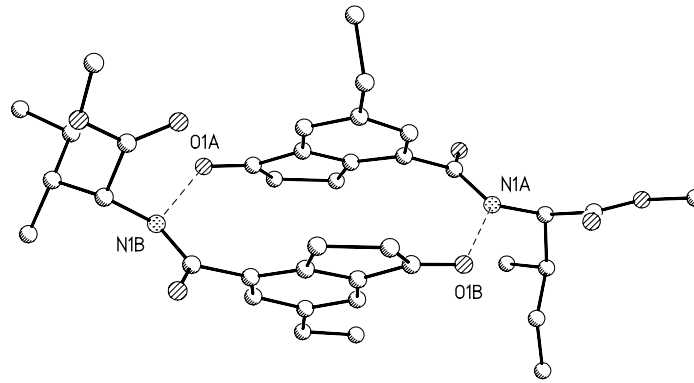
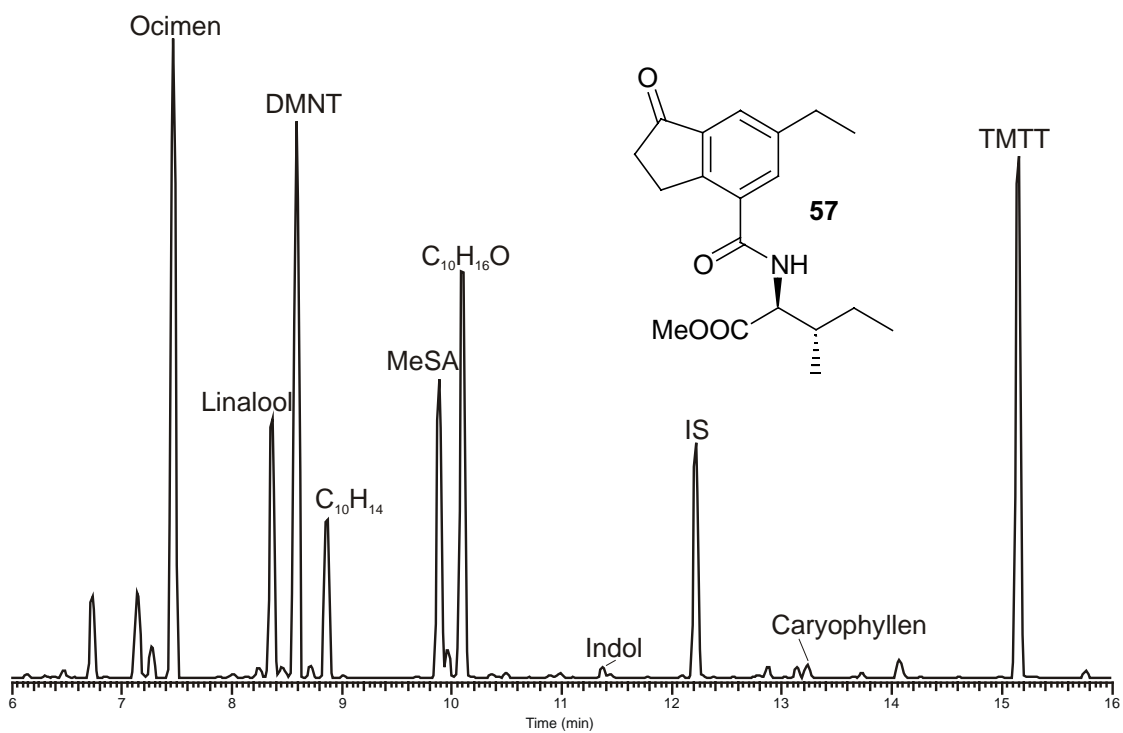


Abb. 59: Sandwichartige Fixierung der Aromaten zueinander

### 3.2.5 Biologische Aktivität

#### Duftstoff-Biosynthese

Als wichtiger Test für die biologische Aktivität des Ethylindanoyl-Konjugats **57** dient die Induktion der Biosynthese von Duftstoffen bei der Limabohne (*P. lunatus*, siehe Einleitung). Dargestellt ist ein Chromatogramm nach 24 h Inkubation, wobei wieder eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung verwendet wurde.

Abb. 60: Duftprofil von *P. lunatus* nach Inkubation mit dem Coronatinanalogon **57**

Das Chromatogramm zeigt eine ähnlich große Vielfalt an Duftstoffen wie nach Elicitierung mit Coronatin (Abb. 14). Nicht nur die typischen JA-induzierbaren Duftstoffe sind vorhanden, sondern auch die drei bei ALA oder Stress zu beobachtenden Komponenten (37, 38 und MeSA) sind sehr ausgeprägt. Die Homoterpene (DMNT und TMTT) sind sogar stärker vertreten als nach Elicitierung mit Coronatin.

Die biologische Aktivität wurde qualitativ vom normalen Indanoyl-Konjugat 31 zum Ethylderivat 57 deutlich verbessert und zeigt nun eine große Analogie zum Coronatin. Auch quantitativ hat die Einführung der Ethylseitenkette die Aktivität stark erhöht. Selbst bei sehr geringen Mengen Elicitor (10  $\mu$ L einer 100  $\mu$ M-Lösung) erhält man ein zu Abb. 60 identisches Chromatogramm. Im direkten Vergleich der beiden durch 57 und 31 induzierten Duftprofile wird der Unterschied besonders deutlich (Abb. 61).

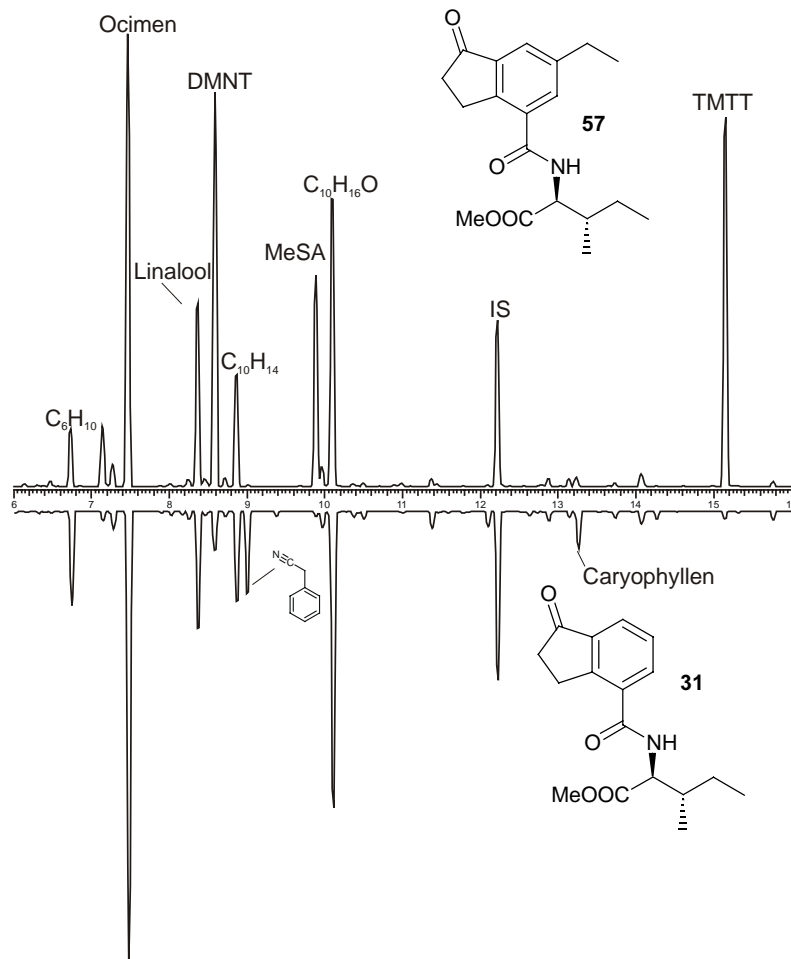


Abb. 61: Direkter Vergleich zwischen 57-induziertem und 31-induziertem Duft



Beide Chromatogramme zeigen die JA-typischen Duftkomponenten wie Ocimen, Linalool, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub> und C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O. Die Homoterpene (DMNT und TMTT) sowie Methylsalicylat sind nur nach Elicitierung mit **57** zu sehen bzw. im Fall von DMNT dort deutlich mehr induziert worden. Andererseits ist durch die zusätzliche Ethylgruppe in der Verbindung **57** die Emission von Benzylnitril, Methylantranilat und den meisten Sesquiterpenen reduziert.

In diesem Experiment wird die Annäherung der induzierenden Eigenschaften durch die zusätzliche Ethylgruppe hin zum Coronatin besonders deutlich.

### Rankenkrümmung

Auch im Rankenkrümmungs-Bioassay an *B. dioica* zeigt das Coronatinanalogon **57** eine weitaus höhere Aktivität (Tab. 1) als die Verbindung **31** ohne Ethylgruppe. Im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen<sup>76</sup> kann auch **31** eine Spiralisierung in der Ranke hervorrufen, jedoch sind die Konzentrationen, die nötig sind, um eine komplette Spiralisierung (+++) zu bewirken, um den Faktor 20-50 höher als mit dem Ethyl-Derivat **57**. Die Ranke zeigt bei Coronatin in Konzentrationen um 2 µM jedoch immer noch fast die gleiche Aktivität wie das Ethylindanon bei 10 µM.

Konzentration / Elicitor	500 µM	100 µM	10 µM	2 µM
Indanoyl- Konjugat <b>31</b>	++	+	-	-
Ethylindanoyl- Konjugat <b>57</b>	+++	+++	+	-
Coronatin <b>28</b>	+++	+++	++	+

Tab. 1: Vergleich der Aktivität der Indanon-Konjugate mit Coronatin bei der Rankenkrümmung von *B. dioica* mit unterschiedlichen Konzentrationen (-: keine Krümmung, +++: vollständige Spiralisierung)

Betrachtet man die biologische Wirkung der Substanz **57** in diesem Bioassay, dann ist sie wie erwartet deutlich größer. Im Vergleich zum Duftbioassay bei der Limabohne, bei dem vor allem die qualitative Annäherung an Coronatin durch den zusätzlichen Ethylsubstituenten deutlich wurde, tritt in diesem Assay die quantitative Verbesserung der Aktivität besonders hervor.

### Endogene Salicylatlevel

Neben den äußerlich zu beobachtenden Reaktionen der biologischen Systeme auf Elicitoren ist auch die Betrachtung des Einflusses auf die Phytohormone wichtig. In der Einleitung wurde schon beschrieben, welche wesentliche Rolle die beiden Phytohormone Jasmonsäure (20) und Salicylsäure (26) in der pflanzlichen Abwehr spielen. Deshalb ist eine Betrachtung dieser Substanzen zur Einschätzung der Wirkung der neuen Elicitoren unerlässlich.

Der zeitliche Verlauf endogener Jasmonsäurelevel nach Applikation von Coronatin und dem unsubstituierten Indanoyl-Konjugat 31 bei *Phaseolus lunatus* wurde bereits früher gemessen. Außer einem frühen verletzungsbedingten Anstieg von JA nach Abschneiden der Pflanze zeigte sich kein weiterer Einfluss auf dieses Phytohormon durch beide Elicitoren.<sup>56,63</sup> Aus diesem Grund wurde beim Ethylindanoyl-Konjugat 57 auf eine solche Messreihe verzichtet.

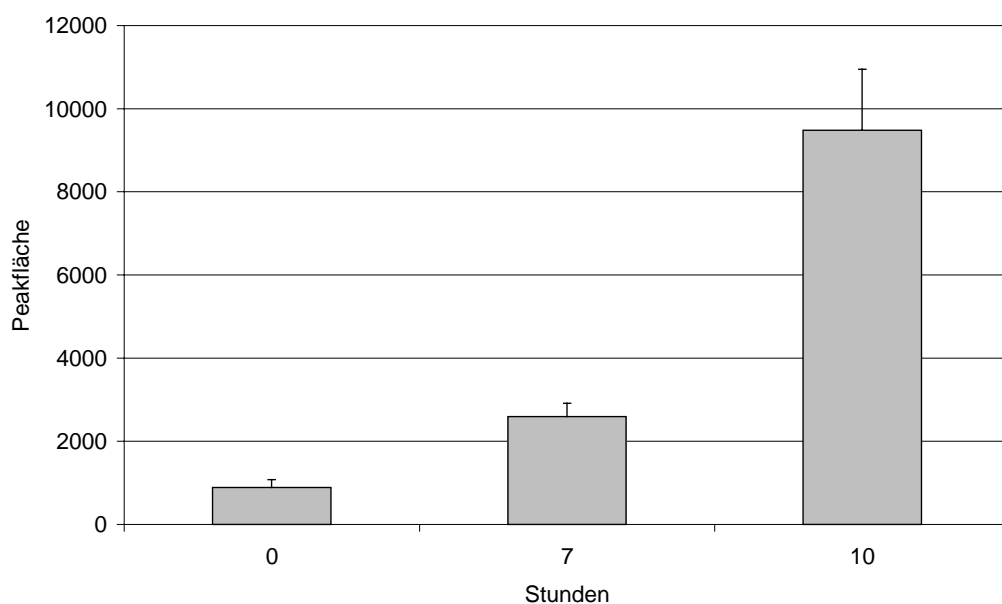


Abb. 62: Peakflächen entsprechend den endogenen Salicylatleveln nach Elicitierung mit Ethylindanoyl-Iseucinmethylester (57)

Bei früheren Messungen der endogenen Gehalte von Salicylat gab es dagegen Unterschiede. Entsprechend der Emission von Methylsalicylat - möglicherweise einer Form der „Entsorgung“ für große Salicylatmengen - zeigt sich bei Coronatinapplikation ein Anstieg der endogenen Salicylatkonzentration, beim Indanon

**31** dagegen nicht. Aus diesem Grund war die Wirkung des Elicitors **57** zur Einschätzung der Coronatinanalogie sehr wesentlich.

Wie schon durch das Duftprofil angedeutet, in dem große Mengen Methylsalicylat vorhanden waren (Abb. 60), zeigt der Elicitor eine große Wirkung auf den endogenen Salicylatlevel. Nach sieben Stunden hat sich die Salicylsäurekonzentration in den Blättern der Limabohne verdreifacht und nach 10 Stunden verzehnfacht. Die Eigenschaften des neuen Elicitors **57** entsprechen damit deutlich mehr dem Coronatin als der unsubstituierten Verbindung **31**.

### Genexpression von JIP 23 in Gerste

Analog zum Versuch mit dem Photoaffinitätsmarker **40** (Seite 36) wurde wieder in Zusammenarbeit mit WASTERNAK am IPB in Halle die Genexpression von JIP 23 in Gerstenblättern nach Elicitierung mit dem Coronatinanalogon **57** untersucht.

Es wurden 5 cm große Blattsegmente von 6 Tage alten Keimlingen von *Hordeum vulgare* var. Salomé für 24 h auf Lösungen von MeJA als Standard und vom Ethylindanoyl-Konjugat **57** als Testsubstanz flotiert. Die RNA wurde extrahiert und 10 µg davon mit markierter JIP 23 cDNA hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 30 min.

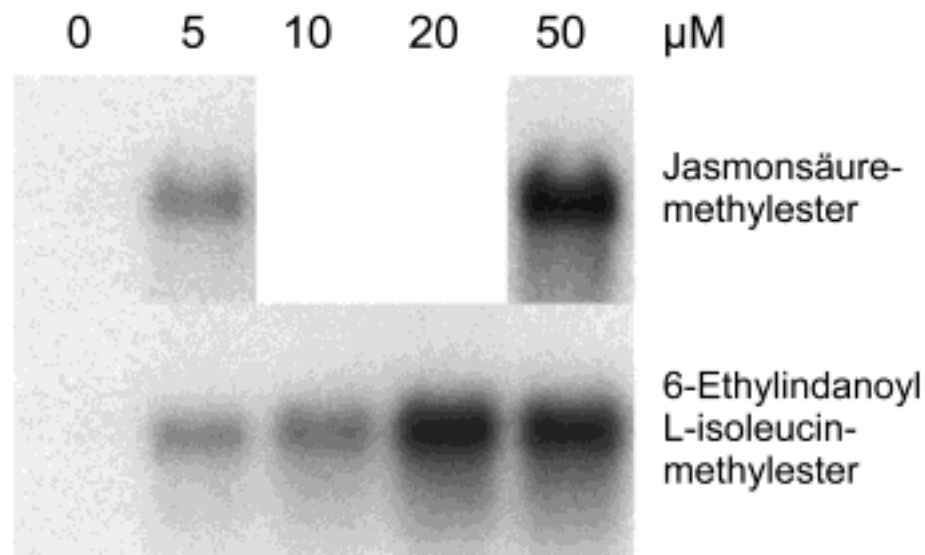


Abb. 63: Genexpression von JIP 23 in Gerstenblättern nach Behandlung mit MeJA und **57**.

Während mit der Azidoverbindung **40** eine 100 µM Lösung verwendet werden musste, um eine deutliche Expression zu induzieren, reicht bei der Ethylverbindung **57** eine

5  $\mu\text{M}$  Lösung aus. Die Aktivität von **57** für die Expression des JIP 23 ist damit mindestens ebenso groß wie die des Jasmonsäuremethylesters. Wieder wurde die Aktivität durch den zusätzlichen Ethylsubstituenten im Vergleich zu **31** deutlich erhöht.

### Nikotin-Induktion in Tabakpflanzen

Der Nikotingehalt in Tabakpflanzen kann durch exogene Zugabe von Jasmonat erhöht werden. Diese Nikotin induzierende Aktivität (NIA) wurde von ZHANG mittels verschiedener Elicitoren überprüft.<sup>48</sup> Es zeigte sich, dass MeJA und das Indanoyl-Isoleucinkonjugat (**31**) eine vergleichbare Steigerung des endogenen Nikotingehaltes in den Tabakpflanzen hervorriefen. Diese Arbeit wurde 1997 im Arbeitskreis von Prof. Baldwin durchgeführt. Auch die Substanz **57** wurde auf eine solche NIA in Kooperation mit GONZALEZ und BALDWIN getestet.

Das Experiment wurde analog zum publizierten Versuch durchgeführt.<sup>48</sup> Am ersten Tag des Experiments wurden die *Nicotiana sylvestris*-Pflanzen mit 0,6  $\mu\text{Mol}$  Elicitor behandelt. Nach sechs weiteren Tagen wurden die Pflanzenproben aufgearbeitet und vermessen.

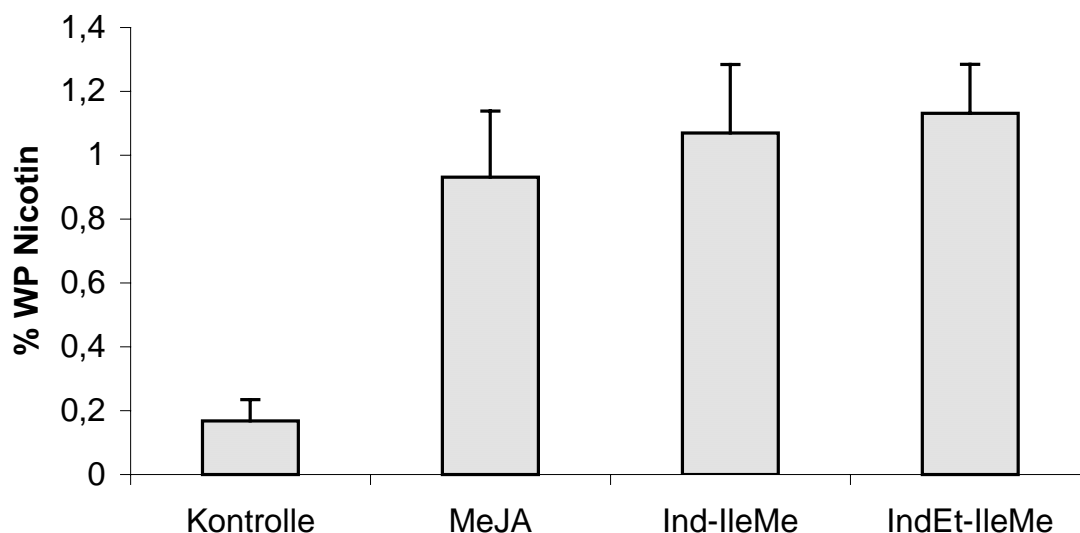


Abb. 64: Nikotingehalt der ganzen Pflanze (WP= *whole plant*) in Prozent nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren (600 nMol)

Insgesamt zeigen die drei verwendeten Elicitoren keine großen Unterschiede. In allen Fällen steigt der Nikotingehalt in den Blättern ca. um das Sechsfache (ca. 10  $\mu\text{g}$  Nikotin/mg) im Vergleich zur Kontrolle. Der Nikotingehalt ist zwar bei dem

Ethylindanon-Konjugat **57** höher als bei MeJA, jedoch ist diese Steigerung kaum signifikant. Möglicherweise ist bei diesen Konzentrationen das NIA-Maximum oder die maximale Nikotinproduktion erreicht, und eventuell würde man mit niedrigeren Elicitor Mengen eine bessere Aussage zum Vergleich der drei Elicitoren erhalten.

Es lässt sich jedoch für **57** mit Sicherheit feststellen, dass das Konjugat auch in diesem Bioassay eine sehr große Aktivität aufweist. Diese liegt zum Beispiel auch deutlich über der Wirkung der 12-Oxophytodiensäure (**18**), die früher getestet wurde und nur eine sehr geringe Aktivität auswies. Schwieriger fällt der Vergleich mit Coronatin. Das Phytotoxin wurde 1997 auch getestet. Es hatte jedoch einen negativen Einfluss auf das Wachstum und damit auf die Gewichtszunahme der Pflanzen, so dass diese kaum größer wurden und man so den Nikotingehalt nicht vergleichen konnte. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Gewichtszunahme der Pflanzen in diesem Versuch (Abb. 65), so sollte man aufgrund der größeren Strukturanalogie zu Coronatin eine stärkere Hemmung des Wachstums durch die Ethylverbindung **57** als durch die unsubstituierte Verbindung **31** erwarten. Der Elicitor **31** ohne Substituent an 6-Position bewirkt jedoch eine geringere Gewichtszunahme als die Ethylverbindung **57**. Dieser gegenläufige Effekt ist sehr interessant und zeigt, dass das Coronatinmimik sich nicht in allen Eigenschaften an das Coronatin angenähert hat.

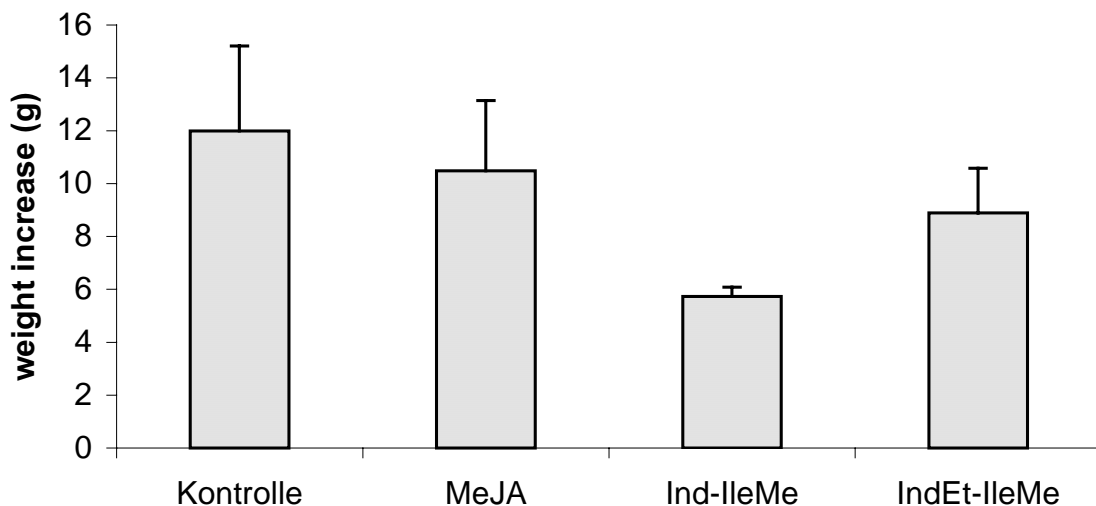


Abb. 65: Durchschnittliche Gewichtszunahme der Pflanzen 6 Tage nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren

### Induktion der Biosynthese von Benzo[c]phenanthridinen

KUTCHAN *et. al.* haben ein einfaches Testsystem entwickelt, das auf der Akkumulation von Benzo[c]phenanthridin-Alkaloiden (Abb. 66) in *Eschscholzia californica* Zellkulturen beruht.<sup>91,92</sup> Es wurde eingesetzt, um ganze Reihen von potentiellen Elicitoren zu testen.<sup>60</sup>

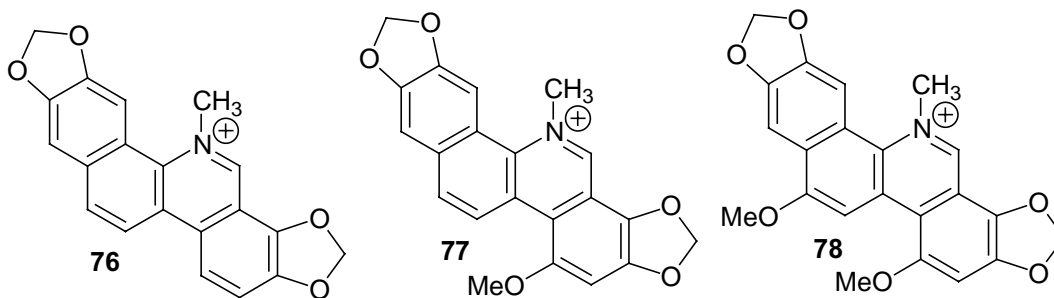


Abb. 66: Benzo[c]phenanthridin Alkaloide von *E. californica*

Dabei wurde gezeigt, dass sowohl JA **20**, MeJA und OPDA **18** als auch verschiedene Derivate von **18** die Produktion der Alkaloide in den Zellkulturen induzieren können. Obwohl auch Coronatin (**28**) und CFA-Ile eine große biologische Wirkung haben, konnte das Indanoyl-Isoleucinkonjugat **31** keine deutliche Induktion hervorrufen.

In diesem Bioassay erreichte **31** weder die Wirkung der Jasmonsäure noch die des Coronatins. Es war deshalb von besonderem Interesse, ob das Ethylderivat **57** diese Eigenschaft besitzt.

Im Arbeitskreis von Prof. Kutchan wurde der Elicitor **57** analog zu den bisherigen Versuchen getestet.<sup>60</sup> Dabei wurde zu jeweils 1 ml Zellkulturlösung 1 bzw. 3 µl Elicitorlösung gegeben. Die erreichten Gesamtkonzentrationen lagen dabei zwischen 0,1 und 300 µM. Die Proben wurden 4 Tage bei 23 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und die Probe nach weiterer Aufarbeitung<sup>60</sup> bei 490 nm im UV-Spektrometer vermessen. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Ergebnisse (Abb. 67) zeigen für das Indanon-Derivat **31** zwar einen leicht erhöhten Level, aber keine Konzentrationsabhängigkeit. Die Grafik zeigt, dass die sehr deutliche Aktivität der Ethylverbindung **57** vergleichbar mit der von MeJA ist (0.1-100 µM). Die Konzentrationsabhängigkeit der Alkaloidproduktion ist gut zu erkennen.

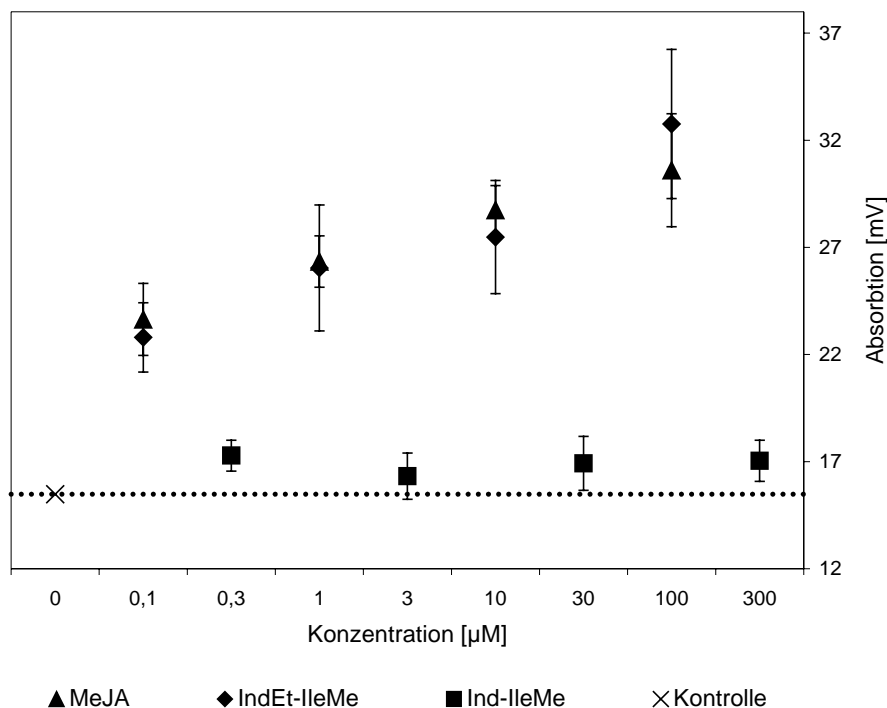


Abb. 67: Elicitierungsversuche an *E. californica* zur Alkaloidproduktion (Linie= Kontrolle)

Das Ethylindanoyl-Konjugat **57** zeigt in diesem Bioassay eine genauso große Aktivität wie der beste bisher bekannte Elicitor, der Methyl ester der Jasmonsäure. Die Erweiterung der Indanoyl-Leitstruktur **31** zeigt hier sehr deutlich seine Wirkung. Zudem ist dies ein sehr gutes Beispiel, dass diese Substanz auch für den kommerziellen Einsatz zur Wertstoffproduktion mit Pflanzenzellkulturen geeignet sein könnte.

### 3.3 Untersuchungen an pflanzlichen Signalwegen

#### 3.3.1 Vergleich von Duftprofilen nach Behandlung mit verschiedenen Indanoyl-Konjugaten

Die bisherigen Versuche haben deutlich gemacht, wie sehr die Struktur einer Substanz ihre biologische Wirkung bestimmt, während umgekehrt eine bestimmte biologische Wirkung nicht auf eine einzige Struktur als Elicitor beschränkt ist. So ahmt das unsubstituierte Indanoyl-Isoleucin Konjugat **31** die Wirkung von Jasmonsäure **20** sehr gut nach, obwohl die strukturellen Ähnlichkeiten nicht besonders groß sind. Wird

zusätzlich ein neuer Substituent z.B. eine Ethylgruppe eingeführt, die die strukturelle Ähnlichkeit zur JA erhöht und nicht senkt, so erhält man eine sowohl quantitativ als auch qualitativ stark veränderte biologische Wirkung.

Um den Einfluss eines Substituenten an der 6-Position des Indanoyl-Isoleucinmethyl-esters **31** genauer zu studieren, werden im Folgenden die verschiedenen Konjugate **31**, **57** und **40** sowie **51** als Isoleucinkonjugat vergleichend betrachtet. Es wurde jeweils 24 h die Duftproduktion an *Phaseolus lunatus* mit 100  $\mu$ M Elicitorlösungen gemessen. Danach wurden die Peakflächen der einzelnen Komponenten von mindestens fünf Chromatogrammen gegen einen internen Standard (IS=1) normiert und in einem Mittelwert zusammengefasst. Die Werte für eine Duftkomponente wurden nach Induktion mit verschiedenen Elicitoren verglichen.

### Homoterpene und Methylsalicylat

Aus den bisherigen Daten (Kapitel 3.1.4 und 3.2.5) wurde deutlich, dass der Einfluss des Ethylsubstituenten auf die Produktion der beiden Homoterpene (DMNT, TMTT) und auf Methylsalicylat am größten ist. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch hier wieder (Abb. 68). Durch die Wahl eines entsprechenden Substituenten lässt sich die Menge von DMNT im Duft steuern. Je größer die strukturelle Ähnlichkeit des Elicitors zum Coronatin (**28**) wird, umso stärker wird die Produktion der Homoterpene (Abb. 68).

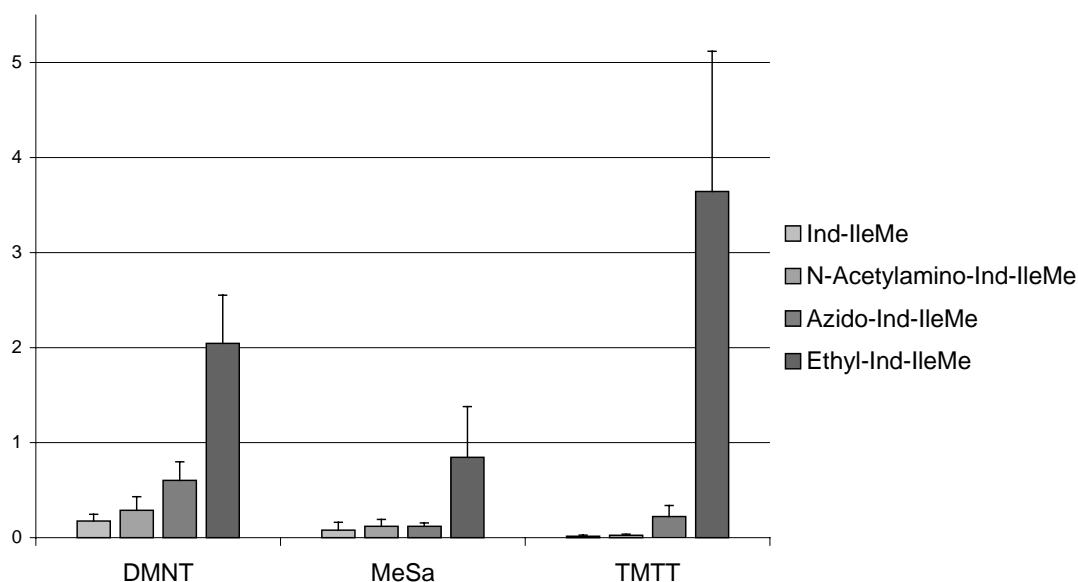


Abb. 68: Einfluss des Substituenten auf die Emission von DMNT, Methylsalicylat und TMTT (100  $\mu$ M)



Auch für die Biosynthese von TMTT gibt es einen solchen Trend, jedoch ist der Einfluss sehr viel drastischer. Der Wechsel von einer *N*-Acetylaminogruppe in **51-IleMe** zur Azidofunktion in **40** bewirkt eine 9-fache Steigerung der TMTT Produktion, und der Wechsel zur Ethylgruppe erhöht die Menge des produzierten Homoterpens dann zusätzlich um das 17-fache.

Der Einfluss auf die Produktion von Methylsalicylat dagegen wird nur durch den Ethylsubstituenten **57** verändert. Hier erhält man einen 8-fach erhöhten Wert im Vergleich zu allen anderen Indanon-Konjugaten. Die Werte zeigen, dass die Biosynthese der Homoterpene nicht mit der Produktion von Methylsalicylat gekoppelt ist. Denn während die Homoterpenproduktion in dieser Reihe der Elicitoren zunimmt, steigt die Menge des Salicylats erst beim Ethylindanonkonjugat **57** deutlich an. Natürlich stammt das Methylsalicylat aus einem ganz anderen Biosyntheseweg als die Homoterpene, aber weil diese Duftstoffe fast immer gemeinsam auftreten, hätte man auf eine gemeinsame, parallele Induktion schließen können. Stattdessen deutet der sprunghafte Anstieg der MeSA-Menge auf einen unabhängigen Auslöser innerhalb der Pflanze hin, der die verstärkte Produktion von Methylsalicylat oder von Salicylsäure als biosynthetische Vorstufe auslöst. Möglicherweise ist die Bildung von Salicylat eine Folge der steigenden Toxizität des Elicitors, die durch die erhöhte strukturelle Analogie zum Coronatin größer wird. Auch durch Kanalbildner wie Alamethicin (Abb. 71) wird bei der Pflanze sehr großer Stress ausgelöst, auf den sie möglicherweise unter anderem mit der Biosynthese von Salicylat reagiert. In diesem Kontext sind jedoch noch viele Fragen offen: Welche Ursache hat der Wechsel vom komplexen Duftprofil zur ausschließlichen Produktion der beiden Homoterpene? Welche Rolle spielt die zusätzliche Salicylatbildung in diesen Fällen?

### **Terpenoide und andere Duftstoffe des durch JA-induzierten Duftmusters**

Betrachtet man die anderen Duftstoffe, so erhält man auch hier eine klare Aussage. Mit dem unsubstituierten Indanon- **31** und dem *N*-Acetylamino-Indanon-Konjugat **51-IleMe** induziert man die Emission aller Duftstoffe, die klassischerweise zum JA-induzierten Duftmuster gehören. Zu diesen Substanzen, deren Produktion normalerweise durch die Wundantwort der Pflanze über den Octadecanoidweg induziert wird, gehören Ocimen, das unbekannte Terpen  $C_{10}H_{14}$  und sein Oxidationsprodukt  $C_{10}H_{16}O$  (Abb. 69), sowie der 2-Aminobenzoesäuremethylester (2ABAME) und das Caryophyllen (Abb. 70).

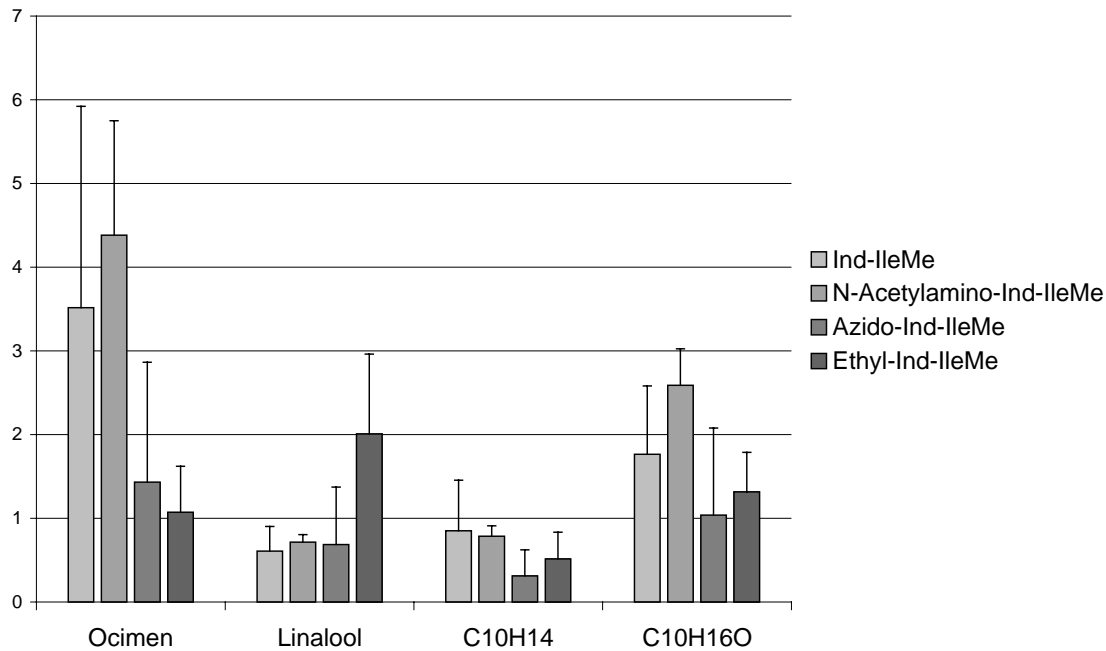


Abb. 69: Einfluss des Substituenten auf die Emission von Ocimen, Linalool, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub> und C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

Bei Ocimen, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O und Caryophyllen sieht man eine sehr deutliche Präferenz für die JA-ähnlichen Elicitoren. Die Coronatinanaloga **57** und **40** lassen die Pflanze nur ca. halb so viel dieser drei Duftstoffe produzieren.

Bei Linalool und dem unbekanntem Sesquiterpen haben die drei ersten Elicitoren **31**, **51-IleMe** und **40** eine ähnlich geringe Wirkung, während das Coronatinanalogon mit Ethylgruppe **57** die emittierte Menge dieser Substanzen mehr als verdoppelt bzw. verzehnfacht. Dieses Verhältnis bei der Aktivität der Elicitoren ist mit der bei der Methylsalicylatemission vergleichbar. Möglicherweise gibt es bei diesen Substanzen einen gemeinsamen Auslöser für die erhöhte Biosynthese.

Ein Konzept, das bei der Interpretation dieser Ergebnisse helfen kann, ist das des „Crosstalks“, der Wechselwirkung zwischen dem Octadecanoidweg, der im Allgemeinen für das JA induzierte Duftmuster zuständig ist und dessen Inhibierung durch Salicylat, das bei der Ausbildung der SAR eine wesentliche Rolle spielt (siehe Einleitung). In Kapitel 3.3.2 wird gezeigt, dass in der Pflanze durch Vorinkubation mit Alamethicin die Biosynthese großer Mengen endogenen Salicylats ausgelöst wird. Bei der nachfolgenden Elicitierung mit Cellulysin entsteht kein Duftmuster, das dem JA induzierten analog ist, obwohl Cellulysin eine Wundantwort der Pflanze durch Aktivierung des Octadecanoidwegs auslöst. Der Grund ist die Inhibierung eben dieser Signalkette durch das Salicylat.

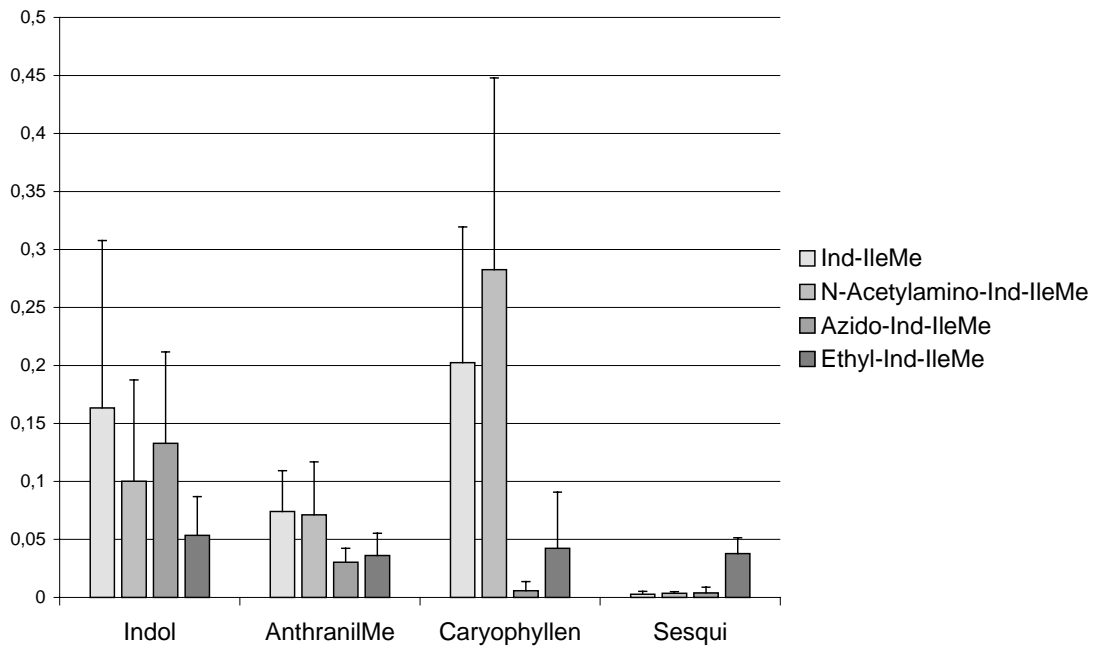


Abb. 70: Einfluss der Struktur des Indanons auf die Emission von Indol, Anthranilsäuremethyl-ester (AnthranilMe), Caryophyllen und ein noch unbekanntes Sesquiterpen

Auch hier sieht es so aus, als ob die coronatinähnlichen Indanone **40** und **57**, die die Produktion endogenen Salicylates auslösen (Seite 58), die Komponenten des JA-induzierten Duftes reduzieren. Man könnte dies wiederum auf eine Inhibierung des Octadecanoidwegs zurückführen. Jedoch darf man nicht vergessen, dass diese Elicitoren ja gar nicht selber den Octadecanoidweg aktivieren, sondern direkt eben diese oder noch unbekannte Octadecanoide nachahmen und dadurch die Duftproduktion auslösen. Dieser auslösende Mechanismus sollte demnach nicht durch SA gehemmt werden können.

Es könnte bei diesem relativen Vergleich der Duftkomponenten auch einfach eine Konkurrenz um zelluläre Ressourcen auftreten. Sowohl Monoterpene wie Ocimen als auch die verschiedenen anderen Terpenoide haben das Isopentenylidiphosphat als Vorstufe bei der Biosynthese (Abb. 13). Somit beschränkt dessen Vorrat die Gesamtmenge der produzierten Terpene. Man sollte in allen Versuchen, bei denen es um die Verhältnisse der terpenabgeleiteten Duftstoffe und Duftmuster zueinander geht, diese Tatsache bei der Interpretation der Ergebnisse nicht aus den Augen verlieren.

### 3.3.2 „Crosstalk“ – Die Wirkung von Salicylat auf den Octadecanoidweg

Die Forschung an der Wechselwirkung und Inhibierung zwischen JA und SA macht eine leistungsfähige Analytik für diese Phytohormone erforderlich. Zusätzlich musste für die Untersuchungen zur Inhibierung des Octadecanoidwegs durch SA eine Messmethode für OPDA als Zwischenstufe der JA-Biosynthese entwickelt werden.

Intensive Studien verschiedener Kanalbildner an der intrazellulären Membran haben die biologische Wirkung dieser neuen Klasse von Elicitoren des Sekundärmetabolismus von Pflanzen untersucht.<sup>58</sup> Diese Kanalbildner sind z.B. Peptaibole, deren Effekte als Antibiotika bereits sehr gut untersucht sind. Ihre Wirkung auf Pflanzen war bisher jedoch weitgehend unbekannt. Bei den von ENGELBERTH durchgeführten Untersuchungen war das emittierte Duftmuster von elicitierten Limabohnenblättern von besonderem Interesse.

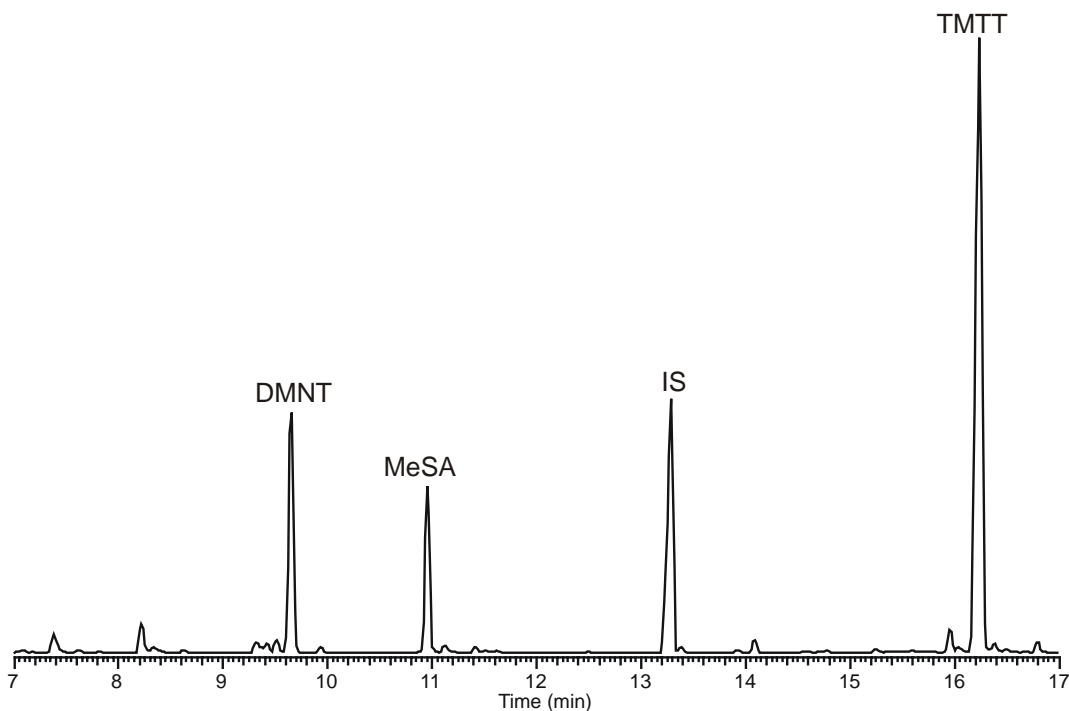


Abb. 71: Duftspektrum von *P. lunatus* mit Alamethicin als Elicitor

Einige dieser Kanalbildner, besonders Alamethicin (ALA), sind in der Lage, ein neues, noch nicht beobachtetes Duftmuster zu induzieren (Abb. 71). Schon mit Lösungen, die ALA nur in Konzentrationen von 50 pM enthalten, ist eine biologische Antwort in Form von emittierten Mengen DMNT, TMTT und Methylsalicylat hervorzurufen. Der

Duft von *P. lunatus* enthält in diesen Experimenten neben diesen beiden Homoterpenen und großen Mengen MeSA keine weiteren wesentlichen Duftkomponenten.<sup>58</sup>

Untersuchungen von KOCH zeigen, dass neben einem starken Anstieg der endogenen SA-Konzentrationen (90fach), die die großen Mengen emittierten Methylsalicylats erklären, auch eine enorme Steigerung des JA-Gehaltes der Blätter erfolgt (20fach), der später wieder bis auf den Grundlevel abnimmt (Abb. 72).<sup>93</sup> Dieser Verlauf der JA-Konzentration entspricht dem der Elicitierung durch Cellulysin und sollte eigentlich ein JA-ähnliches Duftmuster zur Folge haben.<sup>56</sup>

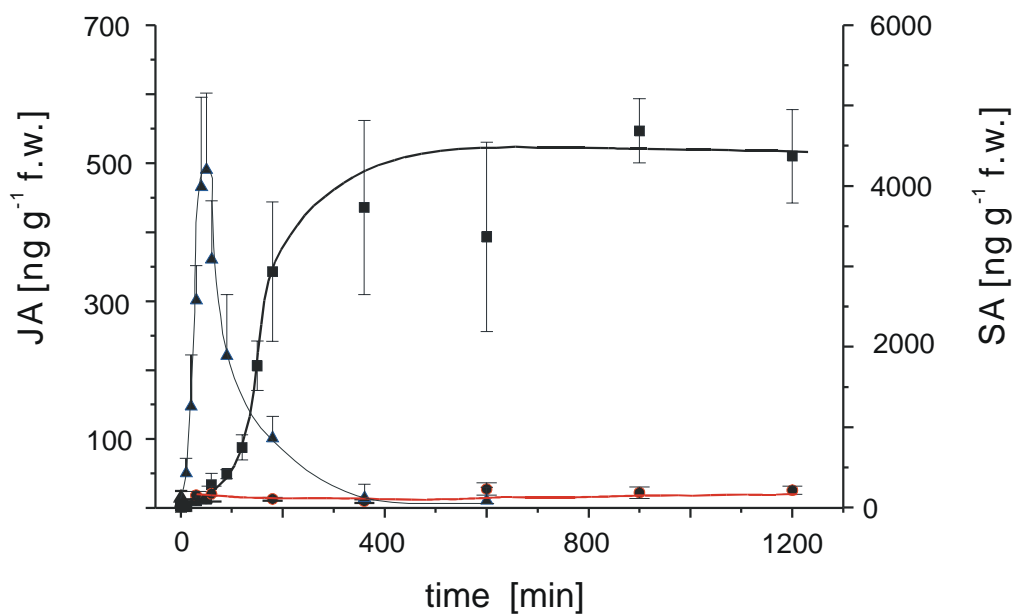


Abb. 72: Zeitabhängige Bestimmung der endogenen JA (▲) und SA (■) Konzentrationen nach ALA-Elicitierung (Kontrolle: ●)

Cellulysin, eine rohe Mischung von Cellulasen des parasitären Pflanzenpilzes *Trichoderma viride*, ist ein potenter Elicitor der Pflanzenduftbiosynthese. Es handelt sich um eine Mischung mehrerer Zellwand-abbauender Enzyme, die in vielen Pflanzen ein Duftmuster hervorrufen kann, das der Behandlung mit JA oder Herbivorenfraß entspricht.<sup>94</sup>

In ersten Versuchen wurde die Fähigkeit von ALA getestet, die Biosynthese und Emission der Terpene des JA-induzierten Duftmusters zu unterdrücken. So wurden Limabohnen mit einer ALA-Lösung vorinkubiert und nach einer bzw. zwei Stunden in eine Elicitorlösung mit Cellulysin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestellt. Während man in der einstündig vorinkubierten Lösung noch Mengen von Terpenoiden des Cellulysin-induzierten

Duftes finden konnte, zeigten die zweistündig mit ALA vorkinkubierten Pflanzen keinerlei Duftkomponenten mehr, deren Produktion durch JA über den Octadecanoidweg induziert wird.<sup>93</sup>

Die Wirkung der großen Mengen des durch ALA-Elicitierung produzierten Salicylats wurde diskutiert, denn neben der Bedeutung der Salicylate für die Ausbildung der SAR (*systemic acquired resistance*) ist auch ihr Einfluss auf den Octadecanoidweg bekannt (Seite 12). So postulierte PEÑA-CORTÉS eine Wechselwirkung mit den frühen Schritten der JA Biosynthese,<sup>95</sup> genauer eine Inhibierung der frühen Stufen vor der Bildung von OPDA. Dagegen haben LAUDERT und WEILER Beweise für die Hinderung des Transports von OPDA aus dem Plastid in das Cytosol durch SA gefunden. Damit wird eine weitere Verarbeitung der OPDA zu JA inhibiert.<sup>96</sup> Nach DOARES soll SA die durch erhöhte JA Konzentration bedingte Genexpression inhibieren.<sup>97</sup>

In den Untersuchungen von ENGELBERTH und KOCH war die Biosynthese von JA offensichtlich nicht inhibiert, sondern der endogene Level zeigt die typische Akkumulation in den ersten 90 min (Abb. 72). In den ersten 2 h ist die Menge an SA noch sehr gering, so dass eine Hinderung der JA-Biosynthese in diesem Zeitraum unwahrscheinlich ist. Dies wäre jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 4-5 h) durch die dann vorhandenen, sehr hohen SA-Mengen durchaus möglich.

Um einen besseren Einblick in die Verhältnisse in der Pflanze zu bekommen und um die SA-Inhibierung des JA-induzierten Duftes genauer zu untersuchen, sollten die Konzentrationen von JA (20) und OPDA (18) mit und ohne Vorinkubation mit Acetylsalicylsäure (AcSA) nach ALA-Elicitierung untersucht werden. Aspirin (AcSA) wurde als exogene Applikationsform für SA verwendet, da es eine deutlich bessere Wirkung zeigt. Diese ist wahrscheinlich auf die besseren Transporteigenschaften der unpolaren Acetylverbindung durch Membranen und die nachfolgende Hydrolyse zur freien Salicylsäure zurückzuführen.

### **Quantifizierung der 12-Oxophytodiensäure**

Im Gegensatz zur etablierten Quantifizierungsmethode von JA/SA mittels GC/MS-SIM als Methylester ist die derivatisierte OPDA nicht zufriedenstellend GC-gängig.

Allerdings hat OPDA durch die zur Ketogruppe konjugierte Doppelbindung einen größeren Chromophor als JA und ist deshalb mit einem UV-Detektor gut zu quantifizieren.



Blattgewicht) und signifikante Mengen JA ( $450 \text{ ng g}^{-1}$  Blattgewicht). Vorbehandlung mit Aspirin hat keinen Einfluss auf den Gehalt an endogener OPDA ( $13,5 \mu\text{g g}^{-1}$  Blattgewicht), aber offensichtlich werden spätere Schritte nach der OPDA im Octadecanoidweg blockiert, denn in diesem Fall überschreitet die JA-Konzentration nicht den Ruhegehalt ( $20\text{-}40 \text{ ng g}^{-1}$  Blattgewicht).

In Gegenwart von großen Mengen AcSA schon zu Beginn der ALA-Behandlung wird der Effekt der SA auf den Octadecanoidweg besonders deutlich. Der Biosyntheseweg wird deutlich hochreguliert, aber im Verlauf blockiert, was zu einer leichten Anreicherung von OPDA führt. Der oxidative Abbau zur JA tritt nicht auf (Abb. 74). Die Akkumulation der frühen Octadecanoide wie Linolensäure und OPDA kann nun dazu führen, dass diese als Elicitoren für das zu beobachtende Duftmuster dienen. Dies wurde bereits von KOCH beschrieben.<sup>56</sup> Dieses Experiment zeigt die unterschiedliche Rolle der frühen und späten Octadecanoide im Netzwerk der Signalwege der Limabohne. Allerdings sollten weitere Experimente die Wirkung von OPDA und Linolensäure in *Phaseolus lunatus* sicherstellen. So wären Inkubationen mit Sauerstoffderivaten der OPDA, die nicht durch  $\beta$ -Oxidation zu JA abbaubar sind, denkbar, um die Signalfunktion zu beweisen.

### 3.3.3 Überlegungen zur induzierten Homoterpen / Methylsalicylat-Biosynthese

Die Bedeutung des durch Alamethicin (ALA) induzierten Duftmusters bei *P. lunatus* und dessen Zustandekommen ist durch die Arbeit von KOCH<sup>56</sup> und den in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Versuchen noch lange nicht vollständig verstanden.

Mit der „Crosstalk“-Hypothese kann man jedoch gut erklären, warum Coronatin nicht nur ein Duftmuster bei der Limabohne induziert, das dem durch JA induzierten entspricht, sondern außerdem auch die Produktion von Homoterpenen und Methylsalicylat aktiviert. Coronatin ist nicht nur mit seinem CFA-Teil (**29**) ein JA-Analogon, sondern als Aminosäurekonjugat auch eins der 12-Oxophytodiensäure (**18**).<sup>45</sup> Somit wirkt es auf die Duftproduktion (Abb. 14) sowohl als JA<sup>98</sup> als auch als OPDA<sup>56</sup>.

Durch die Entdeckung, dass ALA neben der Methylsalicylat- nur noch die Homoterpen-Biosynthese eliciert<sup>58</sup> (Abb. 71), gibt es aber noch zwei weitere Möglichkeiten der Erklärung. ALA als Ionophor bewirkt eine drastische



Depolarisierung an der Membran. Zum einen könnte sich dieser Effekt als Startpunkt einer weiteren Signalkaskade auswirken, zum anderen könnte er durch das Zusammenbrechen der Potentiale an den Membranen eine weitreichende toxische Wirkung auf die Pflanze haben, was als Reaktion die Produktion dieses Duftmusters zur Folge hat.

Auch für Coronatin ist die starke toxische Wirkung bekannt (Kapitel 1.3.2). So stellen Tabakpflanzen beispielsweise nach Inkubation mit Coronatin ihr Wachstum fast völlig ein (Seite 60).<sup>48</sup>

Auch Schwermetalle haben einen starken toxischen Einfluss auf Pflanzen. Möglicherweise spielt dabei auch die Depolarisation der Membran wieder eine wichtige Rolle, denn Schwermetalle haben Einfluss auf die Wirkung der Lipoxygenasen (LOX) beim Abbau der Biomembranen. LOX sind universell vorhandene Enzyme, die die Hydroperoxidierung von ungesättigten Fettsäuren aus den Membranen katalysieren. Sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der Membranlipid-Peroxidation während der Pflanzenalterung.<sup>99,100</sup> Zu den Abbauprodukten gehören freie Radikale, Peroxide, Malondialdehyd und Jasmonsäure.<sup>16</sup> Alle diese Substanzen bewirken einen weiteren Abbau der Membranlipide.<sup>101</sup> Dies führt wieder zur Depolarisation an der Membran durch erhöhten Austausch der Elektrolyte.<sup>102</sup> Der Membranschaden, der durch Alterung und abiotischen Stress, einschließlich Schwermetallsalze, ausgelöst wird, entsteht meist durch Membranlipid-Peroxidation.<sup>100,103</sup> Es gibt Berichte über die Beteiligung von freien Radikalen bei der Membranzersetzung, hervorgerufen durch Schwermetallsalze.<sup>103,104</sup>

Um die Wirkung von toxischen Einflüssen auf die Duftproduktion zu testen, wurden Limabohnen in Schwermetall-Lösungen gestellt. Kupfersulfat und Quecksilberchlorid-Lösungen mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurden als exogene Stressfaktoren verwendet.

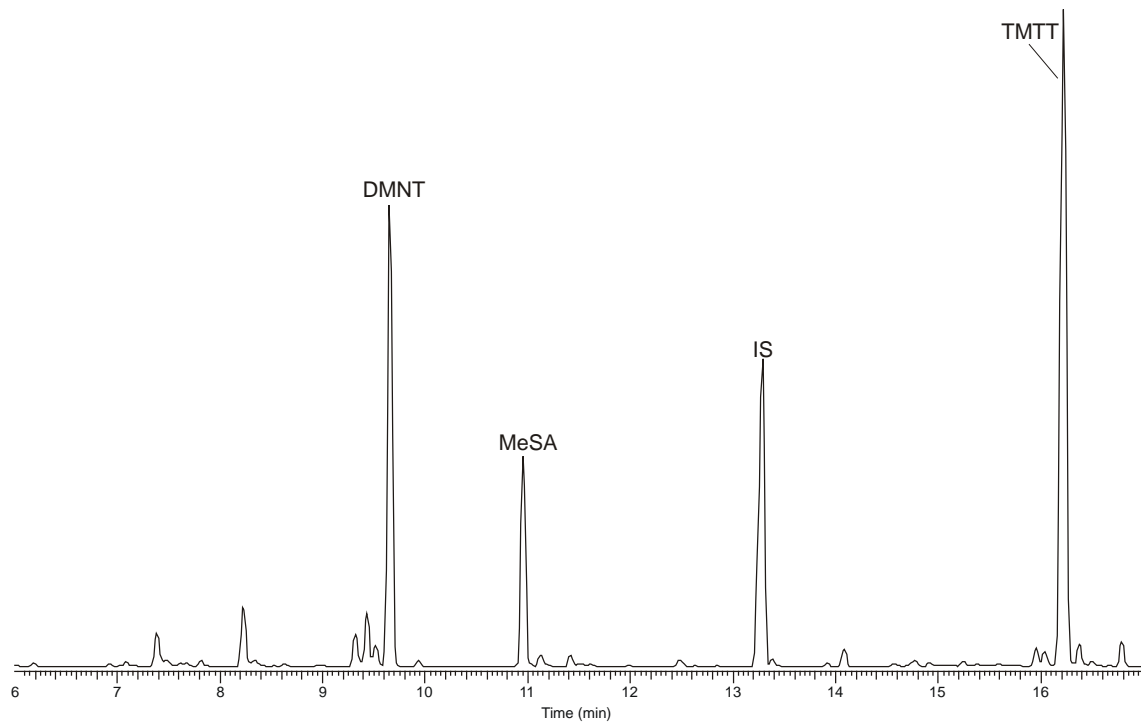


Abb. 75: Duftprofil von *P. lunatus* nach Elicitierung mit Schwermetalllösung

Mit diesen relativ hochkonzentrierten Lösungen erhält man ein Duftprofil, das bis auf die Gesamtmenge exakt dem durch Alamethicin (Abb. 71) hervorgerufenen Duft entspricht. Ist das auf toxische Effekte zurückzuführen oder ein Resultat der Depolarisierung der Biomembranen?

Als Zusatz zu all diesen Beobachtungen gibt es eine Arbeit, die zeigt, dass exogen applizierte Salicylsäure die indirekt depolarisierenden Effekte von Quecksilber- und Bleisalzen ausgleichen kann.<sup>105</sup> Möglicherweise versucht das die Limabohne auch, wenn sie nach der Depolarisation der Biomembran durch ALA oder schwermetallunterstützte LOX-Aktivität große Mengen von Salicylsäure produziert, die wir im Duft wiederfinden. Dies ist eine von mehreren möglichen Hypothesen, deren Klärung ein wichtiger Schritt zum Verständnis der pflanzlichen Antwort auf die unterschiedlichen Elicitierungen sein wird. Die Depolarisierung der Membranen könnte dabei eine wichtige Schlüsselrolle spielen.

### 3.3.4 Verbesserte Methoden zur Quantifizierung von organischen Säuren

Ein Schlüssel zum Verständnis der Steuerung des Sekundärstoffwechsels in Pflanzen ist die akkurate und zuverlässige Messung von Konzentrationen der wichtigsten Phytohormone und Signalmoleküle. Leider liegen viele dieser Substanzen in extrem

geringen Konzentrationen in den Pflanzen vor, so dass man entweder auf große Mengen Pflanzenmaterial angewiesen ist, um eine nachweisbare und messbare Menge dieser Substanzen zu erhalten, oder aber teure Analysegeräte verwenden muss, um die Nachweisgrenze herabzusetzen. Eine einfache, kostengünstige Alternative, die auf einer Analytik beruht, die in vielen Laboren bereits vorhanden ist, wäre wünschenswert.

Eine Detektionsmethode, die es ermöglicht, in sehr niedrige Konzentrationsbereiche vorzudringen, ist die Messung der Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt, je nach Fluorophor, um mindestens zwei Ordnungen höher als die Detektion mittels UV bei Substanzen mit durchschnittlicher UV-Absorption.

Betrachtet man die unterschiedlichen Analyten, die für eine solche Messung in Frage kommen, so gibt es neben den schon erwähnten Substanzen wie zum Beispiel Jasmonsäure (20), 12-Oxophytodiensäure (18) und Salicylsäure (26) noch weitere Verbindungen, die eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Sekundärmetabolismus von Pflanzen spielen und deren gemeinsame Erfassung bei einer einzelnen Messung höchst wünschenswert wäre.

Auxin oder Indol-3'-essigsäure (79, IAA) ist in Pflanzen für das Streckungswachstum im Spross zuständig. Die Wirkung der IAA besteht darin, das Streckungswachstum der Zellen zu fördern. Bei Krümmungswachstum wie Rankenspiralisierung wird Auxin lateral zu einer Seite transportiert und bewirkt so ein unterschiedliches Wachstum beider Seiten.

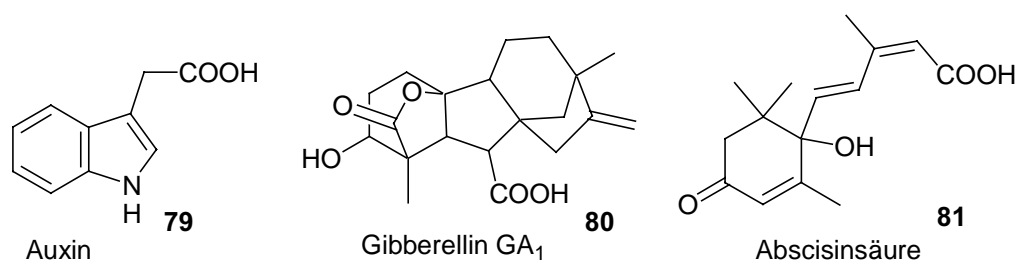


Abb. 76: Weitere pflanzliche Signalstoffe: Auxin (IAA), Gibberellin GA<sub>1</sub> und Abscisinsäure (ABA)

Gibberelline 80 bilden eine große Klasse von Verbindungen, von denen einige biologisch aktiv und für das Längenwachstum von Stengeln verantwortlich sind. Zudem regeln sie die Anlage von Früchten, deren Wachstum und die Auslösung der Samenkeimung. Die Abscisinsäure (81, ABA), die sich von den Carotinoiden ableitet,

kontrolliert den Wasserhaushalt von Pflanzen. Sie initiiert das Schließen der Spaltöffnungen bei Wassermangel und löst über Genexpression die Dormanz von Samen und Knospen aus.

Vergleicht man alle diese wichtigen Signalsubstanzen miteinander, so stellt man eine wichtige Gemeinsamkeit fest: Es handelt sich hierbei durchgehend um organische Säuren. Man benötigt demnach ein Derivatisierungsreagenz, das einen starken Fluorophor bei organischen Säuren einführt. Eine hohe Reaktivität zeigen dabei Diazoalkane, die in leicht saurem Medium bei Raumtemperatur ohne Störung durch Wasser mit den organischen Säuren entsprechende Ester bilden.

In der Literatur sind Diazoalkane als Derivatisierungsreagenzien beschrieben, deren hohe Reaktivität mit der guten Detektierbarkeit von Fluorophoren verbunden wird.<sup>106</sup> Es gibt bereits eine große Menge fluoreszenter Gruppen, die dabei genutzt werden: z.B. Coumarinderivate, Anthracen-, Naphtyl-, Phenanthrene- und Pyrenylverbindungen sowie Fluoresceinanaloga.

Zur Kupplung mit den Carboxyfunktionen wurden Alkylhalide, Amine, Hydrazide, Alkohole, Carbodiimide und auch Diazoalkane benutzt. Die bisherigen Anwendungen liegen ausschließlich im biomedizinischen Bereich.<sup>107</sup>

Bisher gibt es keine Verwendung dieser Methode im Bereich der Phytohormone. Um die Anwendbarkeit dieser Technik auf die Detektion der Signalstoffe in Pflanzen zu überprüfen, wurde zunächst ein geeignetes Derivatisierungsreagenz ausgewählt. Wegen seiner hohen Fluoreszenzintensität und der kommerziellen Verfügbarkeit fiel die Wahl auf 1-Pyrenyldiazomethan (**82**, PDAM). Die Anregungs- und Emissionsmaxima liegen bei PDAM bei 340 nm und 395 nm. Es ist vergleichsweise stabil und bei Raumtemperatur 20 Tage haltbar. Mit diesem Reagenz wurden zuvor verschiedene Fettsäuren in Mengen von 30 Femtomol nachgewiesen.<sup>108</sup> PDAM reagiert mit organischen Säuren zu stabilen Estern (Abb. 77), die durch sehr starkes UV-Licht wieder spaltbar sind.

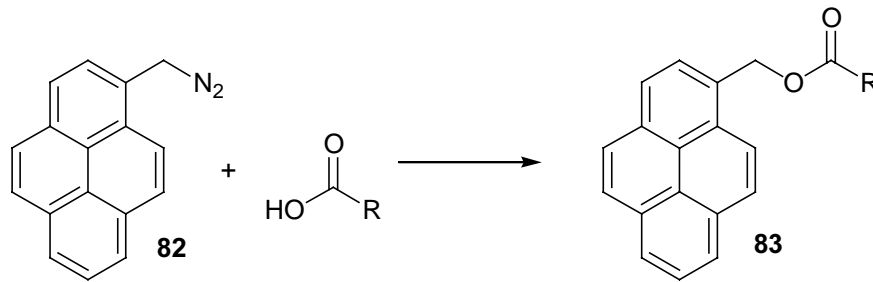


Abb. 77: Reaktion von PDAM mit einer organischen Säure

Dieses Vorsäulenderivatisierungsreagenz **82** ist stark orange gefärbt und wird hell gelb nach der Reaktion. Das Reagenz wird in Chloroform:Methanol vorgelöst, im Überschuss zu den wässrigen oder festen Proben gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktion verläuft quantitativ. Um den Überschuss an Reagenz abzufangen, gibt man Essigsäure zu.

Die Chromatographie erfolgt durch *reversed-phase* HPLC an einer C8 Säule mit einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril (siehe Experimenteller Teil). Die Bildung der Ester wurde am Beispiel der Jasmonsäure (**20**) und der OPDA (**18**) mittels LC/MS überprüft. Die Detektion erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor bei den Anregungs- und Emissionswellenlängen des Pyrenylrestes.

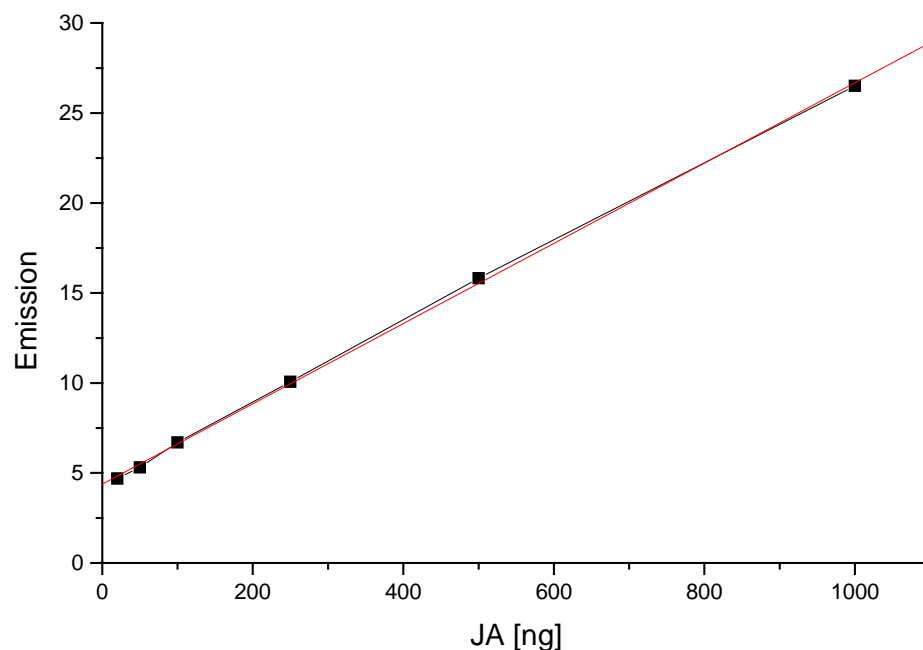


Abb. 78: Eichgerade mit der Emission bei 395 nm für verschiedene Mengen JA mit linearer Regression ( $R^2=0,99974$ ). Die Anregung erfolgt bei 340 nm.

Die Abb. 78 zeigt die Messung einer Eichgeraden mit JA-Mengen von 20 bis 1000 nMol. Die Ergebnisse zeigen eine große Genauigkeit sowohl im Bereich kleiner Mengen mit sehr großem Reagenzüberschuss als auch bei größeren JA-Mengen, wenn dieser Überschuss deutlich kleiner wird.

Die Messung von pflanzlichen Proben, in Zusammenarbeit mit Thomas Koch und Anja Biedermann, zeigt deutlich die Schwächen des PDAMs. Im unten gezeigten Chromatogramm (Abb. 79) kann man die Fettsäuren einfach unterscheiden, jedoch liegen im vorderen Bereich des Chromatogramms die Substanzen alle sehr nah beieinander und werden nicht mehr sauber getrennt. Dies liegt am Verhältnis des sehr großen, hydrophoben Pyrenylfluorophors zum Rest des Moleküls. Der Einfluss der kleinen Signalmoleküle auf das HPLC-Laufverhalten ist deshalb sehr gering. Die langen Fettsäuren haben dagegen einen größeren Einfluss auf ihr Laufverhalten bei der Chromatographie.

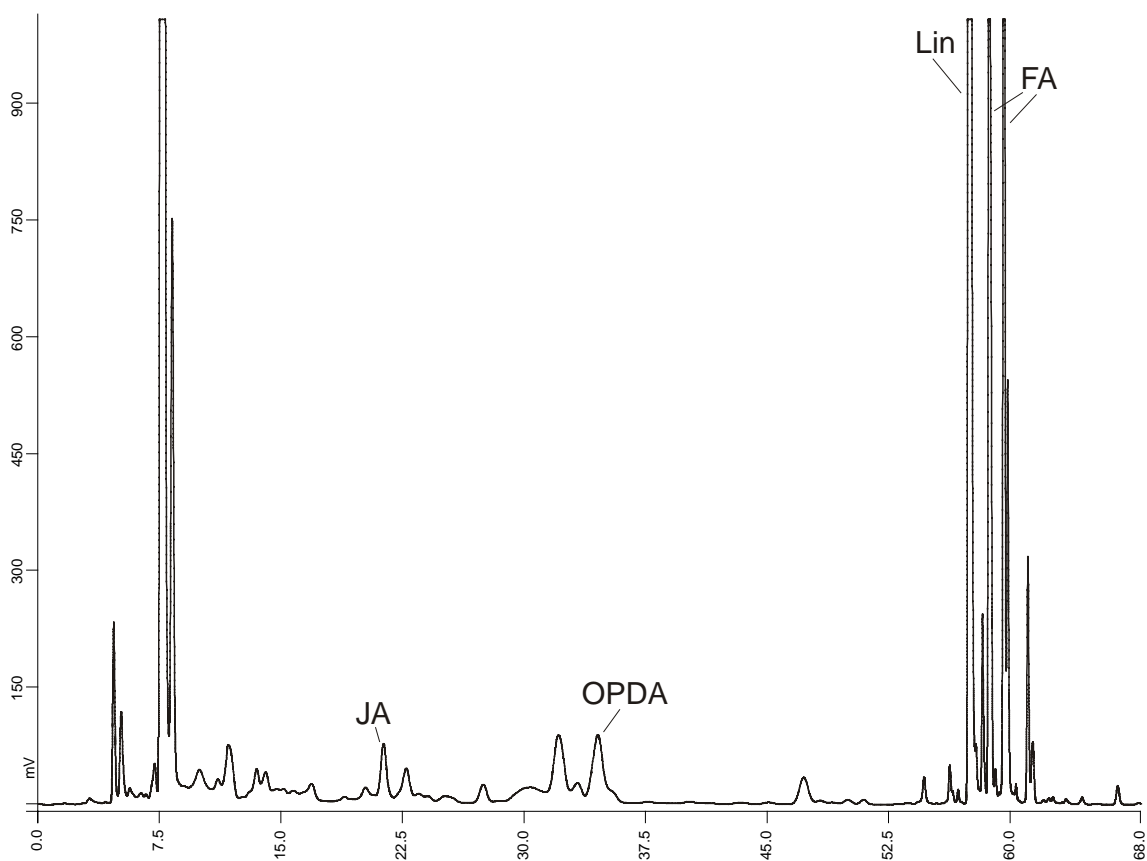


Abb. 79: Chromatogramm einer ALA elicierten Pflanzenprobe (1 g); Lin = Linolensäure; FA = Fettsäure

In diesem Fall wurde die große Fluoreszenzintensität mit einer stark erschwerten Trennung erkauft. Leider war es aus zeitlichen Gründen nicht möglich, diese Technik

bis zu einem Abschluss weiterzuentwickeln, jedoch liegt in dieser Methode noch reichlich Potential für Verbesserungen. Die analytischen Möglichkeiten zur Studie der endogenen Phytohormonlevel sind sehr vielversprechend.

Es empfiehlt sich nach den bisherigen Erfahrungen, einen anderen Fluorophor zu verwenden, der einen kleineren, weniger hydrophoben Rest besitzt. Dies sollte die Trennleistung verbessern und die Dauer eines Trennungslaufs verkürzen. Für zukünftige Versuche würden sich die bisher noch nicht verwendeten Dansyl- **84**, Methoxynaphtyl- **85** oder das bewährte Coumarindiazoalkan **86** (Abb. 80) empfehlen, auch wenn dies bedeutet, dass man durch die verminderte Fluoreszenz nicht mehr im 100 fmol-Bereich messen kann.

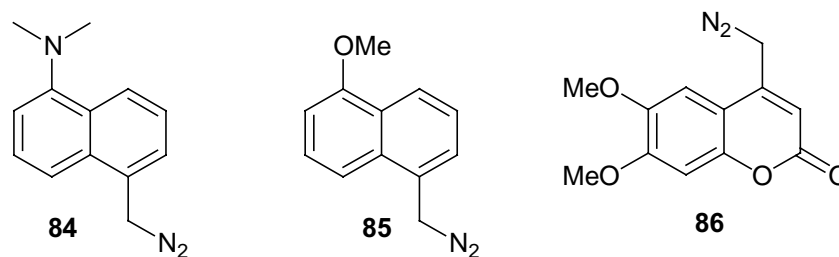


Abb. 80: alternative Derivatisierungsreagentien: Dansyl-, Methoxynaphtyl- und Coumarindiazoalkan

### 3.3.5 Induktion der Glyceollinproduktion an Sojabohnen

(Kooperation mit Prof. Ebel, LMU München)

#### Einleitung

Die Photoaffinitätsmarkierung an ganzen Pflanzen ist sehr aufwendig. Sehr viel einfacher ist die Suche nach Rezeptoren und Bindeproteinen in Zellkulturen. Prof. Ebel und seine Mitarbeiter von der LMU München arbeiten seit vielen Jahren mit einem Sojabohnen-Zellkultursystem, an dem sie Anfang der neunziger Jahre den Rezeptor eines Hepta- $\beta$ -glucosids für die Phytoalexinproduktion in der Sojabohne identifiziert haben.<sup>109</sup> Dieses etablierte System könnte ein guter Startpunkt für erste Photoaffinitätsmarkierungen sein. Jedoch musste zunächst gezeigt werden, dass das photolabile Coronatin-Analogon **40** in den Sojabohnenzellkulturen die Produktion von Glyceollin (Abb. 4) und anderen Phytoalexinen induziert.

## Ergebnisse

Axel Mithöfer aus der Münchener Arbeitsgruppe testete sowohl die Azidoverbindung **40** als auch die Indanon-Verbindungen **31** und **57**. Daneben wurden 12-Oxophytodiensäure (**18**), Jasmonsäure (**20**) und Methyljasmonat untersucht. Als Positivkontrolle diente eine angereinigte Fraktion des Hepta- $\beta$ -glucosids (RE). Die Zellkulturproben wurden 24 h auf einem Kreisschüttler bei 100 rpm im Dunkeln mit den angegebenen Konzentrationen des Elicitors inkubiert. Das filtrierte Medium wurde mit Ethylacetat extrahiert. Der Rückstand wird nach Trocknen und Einengen der organischen Phase mit Ethanol aufgenommen und auf einer RP-18 Säule mittels HPLC untersucht. Die Peakfläche des Glyceollins im Chromatogramm dient zur Mengenbestimmung.<sup>110</sup> Es wurden jeweils mindestens drei Messungen durchgeführt.

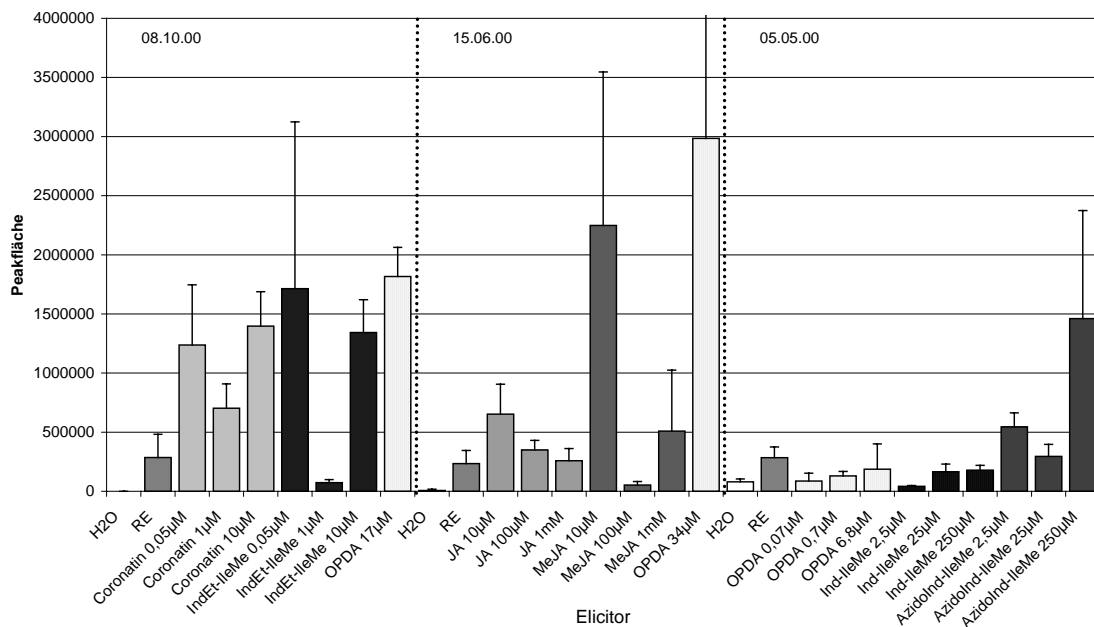


Abb. 81: Relative Mengen des Glyceollins im Extrakt von 1 g Zellkultur (Frischgewicht) mit verschiedenen Elicitoren (RE= Rohelicitor)

In Abb. 81 sind die Ergebnisse von drei Experimenten gezeigt. Vergleicht man die Mengen nach Elicitierung mit dem Rohelicitor (RE), dann erkennt man die gute Reproduzierbarkeit in den drei Messreihen. Leider zeigen einige Konzentrationsreihen eine nicht nachvollziehbare Inkonsistenz. So ist die Glyceollinmenge bei der jeweils mittleren Konzentration von Coronatin, **57**, MeJA und **40** geringer als erwartet, und bei Jasmonsäure nimmt die Wirkung bei steigender Konzentration ab.



Trotz dieser Unregelmäßigkeiten lässt sich zeigen, dass Coronatin und das Analogon **57** eine ähnlich starke Wirkung auf die Glyceollinproduktion haben. Die unsubstituierte Indanonverbindung **31** zeigt dagegen nur einen Bruchteil dieser Aktivität. Das Azidoderivat **40** hat eine große biologische Wirkung, die allerdings nicht ganz an die des Coronatins heranreicht. OPDA ist unterhalb von Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  nur schwach aktiv, darüber zeigt es dagegen eine überraschend große Aktivität. Leider stammen diese Werte von verschiedenen Versuchen, so dass man die Werte durch eine Konzentrationsreihe in einem Experiment bestätigen sollte. Entgegen früherer Annahmen ist das Sojabohnen-Zellkultursystem in diesem Bioassay nicht JA insensitiv.

Aus der Tendenz dieser Daten kann man schließen, dass die Indanonderivate ihre Rolle als Coronatinanaloge wieder bestätigt haben. Auch der Einfluss des Substituenten am Aromaten entspricht den Ergebnissen der anderen Versuche. Das Sojabohnensystem reagiert auf die Elicitierung mit dem Azidoindanoylisoleucin-methylester (**40**), somit sollte eine Photoaffinitätsmarkierung an der Sojabohne möglich sein.

### **Identifizierung eines neuen Flavons der Sojabohne**

Nach Elicitierung mit dem Azidoindanoyl-Konjugat **40** entdeckte Axel Mithöfer in den Chromatogrammen eine Verbindung, die er bei bisherigen Versuchen aufgrund ihrer geringen Absorption ignoriert hatte. Der Photoaffinitätsmarker **40** induziert die Produktion dieser Substanz, dessen Retentionszeit nicht mit den für Sojabohne bekannten Verbindungen übereinstimmte z.B. Glyceollin, Daidzein oder Genistein. Die Produktion dieser Verbindung wurde mit einer 250  $\mu\text{M}$  Lösung des Azids **40** über 100-mal stärker aktiviert als durch die Leerprobe (Abb. 82). Auch der Rohelicitor, das unsubstituierte Indanoylkonjugat und OPDA (**18**) erreichten nur eine Verdrei- bis Verneunfachung des Grundgehaltes.

Die Kollegen in München konnten etwa 150 mg dieser Substanz sammeln. Sie zeigte eine starke Fluoreszenz mit 351 nm Extinktions- und 413 nm Emissionswellenlänge. Es konnten gute NMR- bzw. Massenspektren von der Substanz aufgenommen und ausgewertet werden.

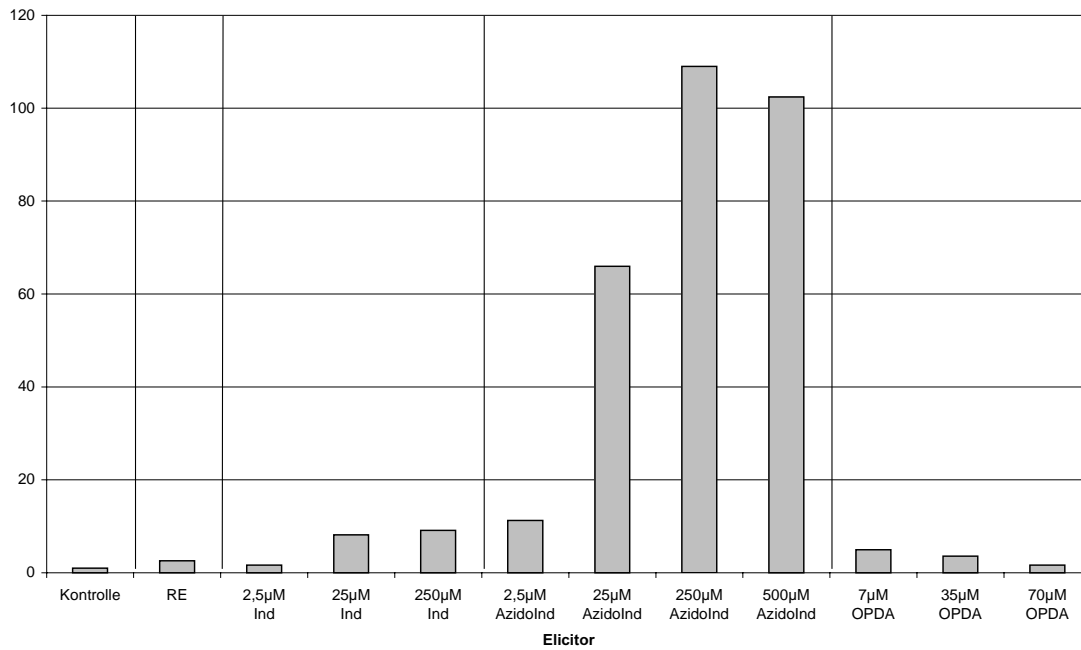


Abb. 82: Produktion einer neuen Substanz nach Elicitierung mit **40**. Dargestellt sind die Peakflächen nach HPLC, kalibriert auf Kontrolle=1 (RE=Rohelicitor)

Die Substanz hat eine Masse von  $254.06 \text{ g mol}^{-1}$  und die Summenformel  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ . Sie zeigt ein für Hydroxyflavone typisches MS-Zerfallsmuster. Mit Hilfe der NMR-Spektren konnte die Substanz als 7, 4'-Dihydroxyflavon identifiziert werden. Diese Substanz ist bereits aus einigen wenigen Pflanzen bekannt, unter anderem aus den Wurzeln chinesischer Lakritze (*Glycyrrhiza aspera*).<sup>111</sup> Jedoch gab es bis jetzt keine Hinweise darauf, dass diese Substanz auch in der Sojabohne vorkommt.

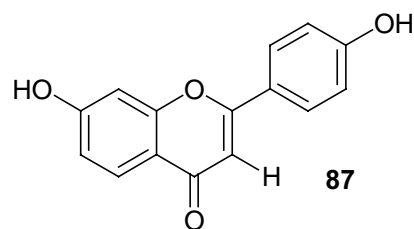


Abb. 83: Identifiziertes 7,4'-Dihydroxyflavon

Die interessante Fragmentierung des Moleküls im Massenspektrum konnte von Dr. Neil Oldham durch die folgende wahrscheinliche Reaktion erklärt werden (Abb. 83).

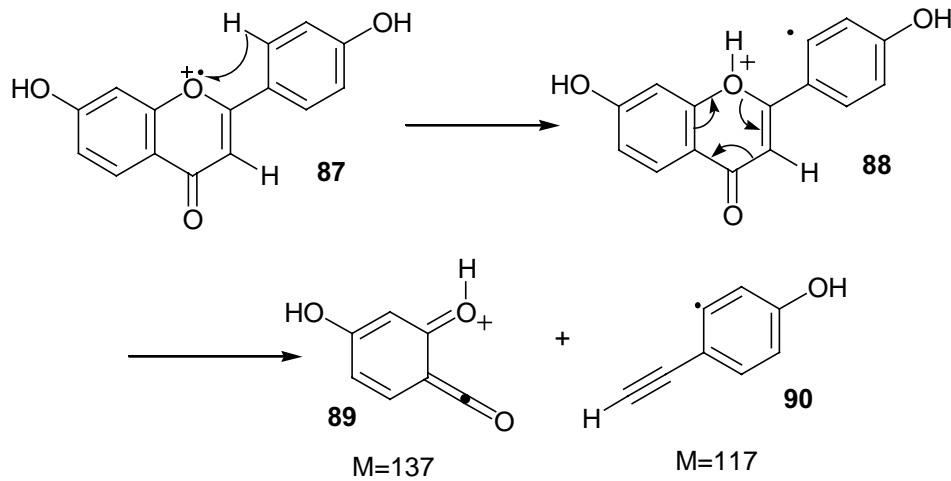


Abb. 84: Postulierte Fragmentierung von **87** im Massenspektrometer

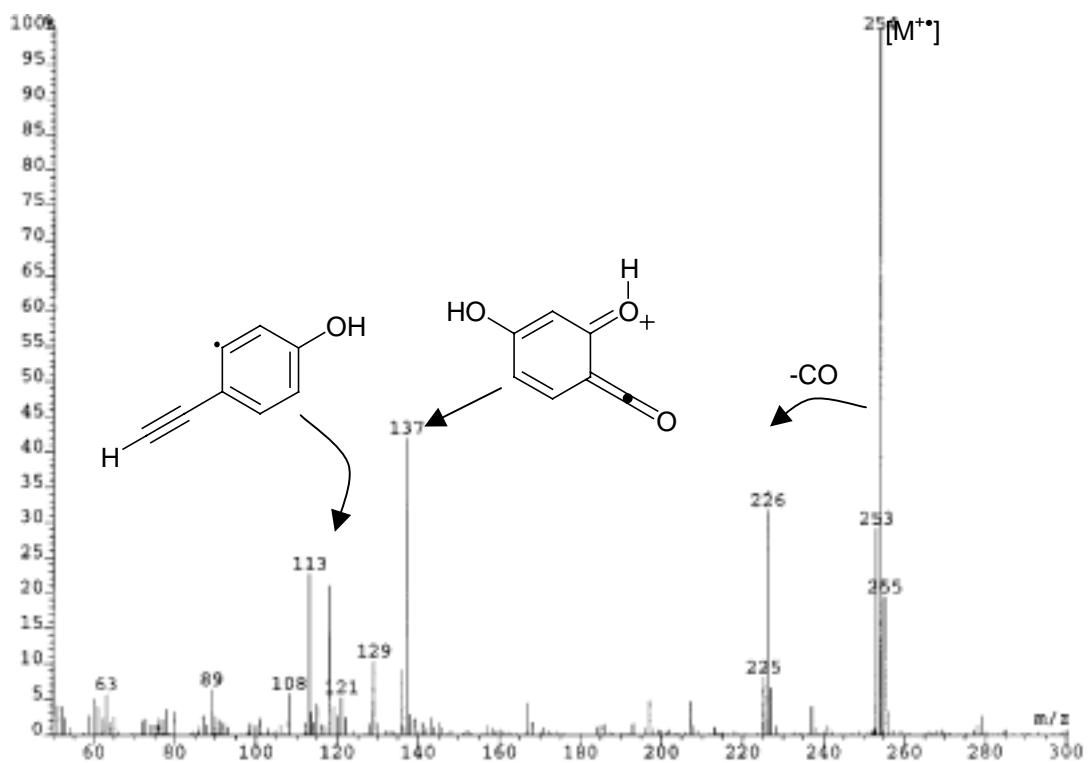


Abb. 85: Massenspektrum des 7,4'-Dihydroxyflavons (**87**)

### 3.3.6 Analytik zur Identifikation von Phytoalexinen in der Limabohne

Zu den bekannten Verteidigungsmechanismen der Limabohne (*P. lunatus*) gehören die cyanogenen Glycoside<sup>4</sup> (siehe Seite 3) und die tritrophe Interaktion mit den natürlichen Feinden der Spinnmilbe über Duftstoffe<sup>13</sup> (siehe Seite 6). Während für andere Bohnenarten z.B. Sojabohne viel über die Verteidigung durch toxische Flavonoide<sup>8</sup>

publiziert ist, sind Verbindungen dieser Klasse für die Limabohne bisher unbekannt. Um zu untersuchen, ob dieses Pflanzensystem ähnliche Substanzen produziert, wurden junge Limabohnen mit zwei vollständig entwickelten Primärblättern mit verschiedenen Elicitorlösungen inkubiert. Analog zum Duftbioassay (siehe Experimenteller Teil) wurden die Pflanzen 24 h in eine Elicitorlösung gestellt. Danach wurden Blätter und Stengel getrennt in flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 100 mg des Pflanzenmaterials wurde mit 1 ml Methanol für 2 h bei 60 °C extrahiert. Durch Zentrifugation und Filtration wurden die festen Bestandteile abgetrennt. Die Proben wurden mittels HPLC an einer RP-18 Säule (H<sub>2</sub>O/MeCN Gradient: 2% bis 98% MeCN in 25 min) getrennt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei 190 nm und durch einen DAD-Detektor.

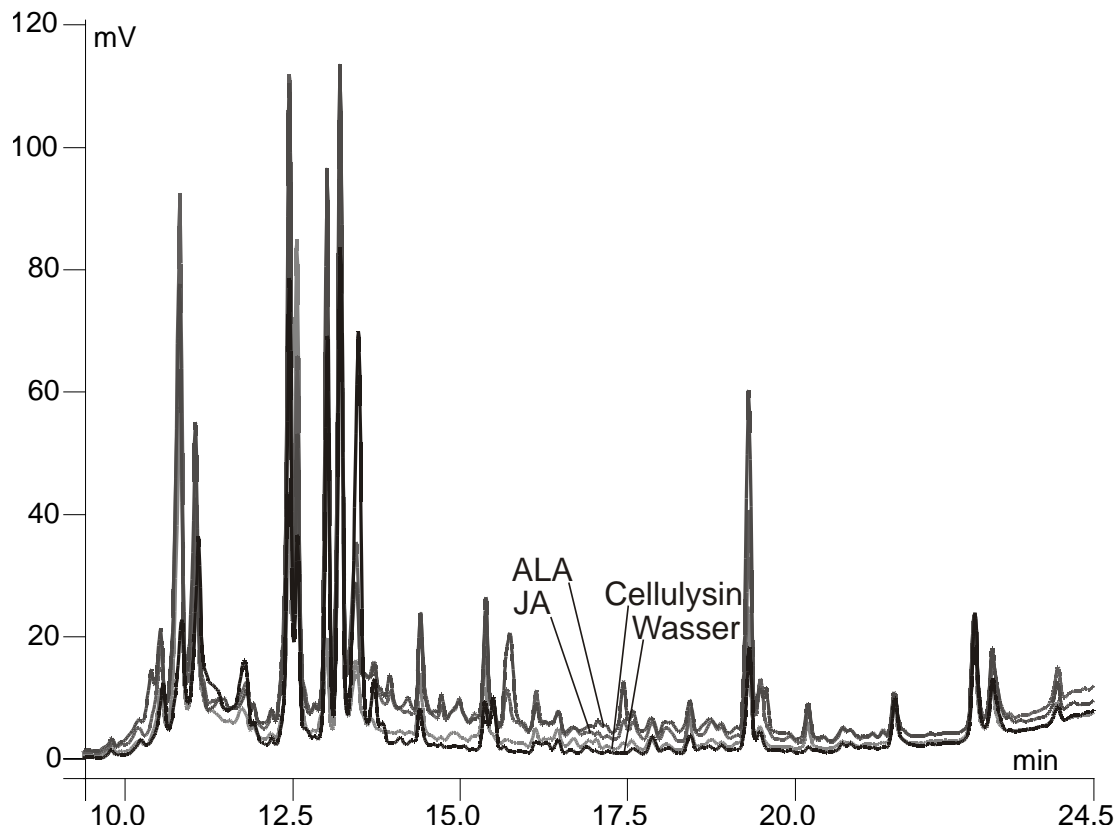


Abb. 86: Chromatogramm eines Blattextraktes von *P. lunatus* nach Elicitierung mit JA (2 mM), Alamethicin (10 µg/ml) und Cellulysin (0,1 mg/ml); Wasser als Negativkontrolle;  $\lambda_{\text{Det}} = 190 \text{ nm}$ ; Säule RP-18

In Abb. 86 sind repräsentative Chromatogramme abgebildet. Die UV-Absorption (190 nm) der Kontrolle, die mit Wasser behandelt wurde, ist dabei fast generell geringer als alle drei Proben von elicitierten Pflanzen. Blatt- und Stänglextrakte zeigten dabei keine elementaren Unterschiede. Einige Signale finden sich nur in den

Chromatogrammen von JA- und ALA-induzierten Pflanzen. Durch Vergleich der zugehörigen UV-Spektren konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Flavone oder davon abgeleitete Verbindungen handelt. Auch entsprachen die Retentionszeiten dieser unbekanntem Verbindungen nicht denen einiger sehr verbreiteter Flavonoide wie Genistein, Daizein, Glyceollin oder Keviton, die als Referenzen vermessen wurden.

Diese ersten Versuche zeigen, dass sich die Produktion verschiedener Verbindungen durch Elicitierung der Limabohne aktivieren lässt. Diese Substanzen gehören jedoch nicht zu den häufig vorkommenden Flavonoiden. Weitere nötige Untersuchungen zur Struktur der induzierten Verbindungen könnten zeigen, ob es sich hierbei vielleicht um Phytoalexine oder pflanzliche Signalstoffe handelt.

### 3.3.7 Photoakustikspektroskopie für Isopren

(Kooperation mit Dr. Frank Kühnemann, IAP Uni-Bonn)

Am Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn werden unter Leitung von Dr. Frank Kühnemann einige der wenigen Photoakustikspektrometer (PAS) weltweit gebaut und verwendet. Diese Technik erlaubt es, die Konzentration von Spurengasen extrem empfindlich und zeitgleich zu messen. Bisher wird dort bereits die Messung von Ethylen sehr erfolgreich durchgeführt. Die Möglichkeit, die Menge des abgegebenen Ethylens, eines der wichtigsten Phytohormone in Pflanzen, online im ppb-Bereich zu verfolgen, eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Ein weiteres leichtes Spurengas neben dem Ethylen ist das Isopren. Es wird von vielen Pflanzen in großen Mengen emittiert (Eukalyptus, Reis) und ist ein wichtiges, wenn auch unterschätztes Treibhausgas. Zudem spielt es eine wichtige Rolle als Produkt im Sekundär- und Terpenstoffwechsel von Pflanzen.

Für den Aufbau eines PAS zur Isoprenmessung wurden Spektren, Referenzsubstanzen und Hilfestellungen bei der nicht-physikalischen Seite des Projekts benötigt.

#### **Funktionsweise der Photoakustikspektroskopie**

Das Grundprinzip der PAS ist immer gleich (Abb. 87). Mit einem abstimmbaren Laserstrahl werden die Gasmoleküle in einer photoakustischen Zelle angeregt und zum Schwingen gebracht. Die angeregten, schwingenden Moleküle geben ihre Energie durch Zusammenstöße mit anderen Molekülen ab, wobei die Schwingungsenergie

übertragen wird. Dadurch kommt es zu einer Temperaturerhöhung in der Zelle. Dies hat eine kurzfristige Druckerhöhung zur Folge. Durch die Unterbrechungen des Lasers durch einen Chopper entstehen periodische Druckschwankungen, die man mit einem Mikrophon nachweisen kann. Die Chopperfrequenz wird so gewählt, dass eine akustische Resonanz der PA-Zelle angeregt wird.

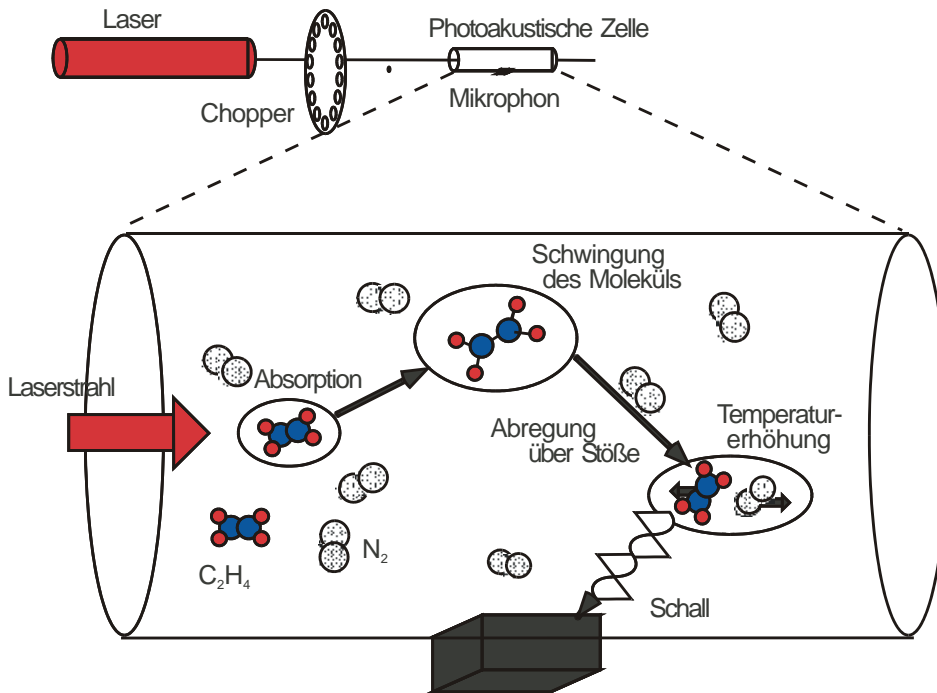


Abb. 87: Allgemeine Funktionsweise eines Photoakustikspektrometers am Beispiel des Ethylens

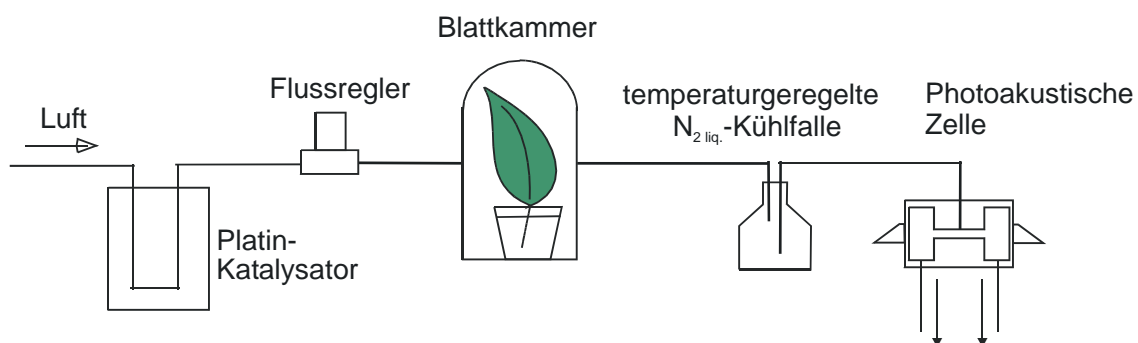


Abb. 88: Schematischer Aufbau eines Photoakustikspektrometers (PAS)

Um pflanzliche Systeme zu messen, leitet man die Luft zunächst zum Reinigen über einen Platinkatalysator. Ein nachfolgender Flussregler steuert den Luftstrom, der durch die Blattkammer fließt und die von der Pflanze emittierten Substanzen aufnimmt. Eine geregelte Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff entfernt alle störenden



### Infrarotspektren der Isoprene

Undeuteriertes und dideuteriertes Isopren wurden vermessen und verglichen. Die beiden IR-Spektren zeigen deutliche Unterschiede (Abb. 91). Besonders groß sind die Verschiebungen der Banden im Fingerprintbereich ( $<2000\text{ cm}^{-1}$ ).

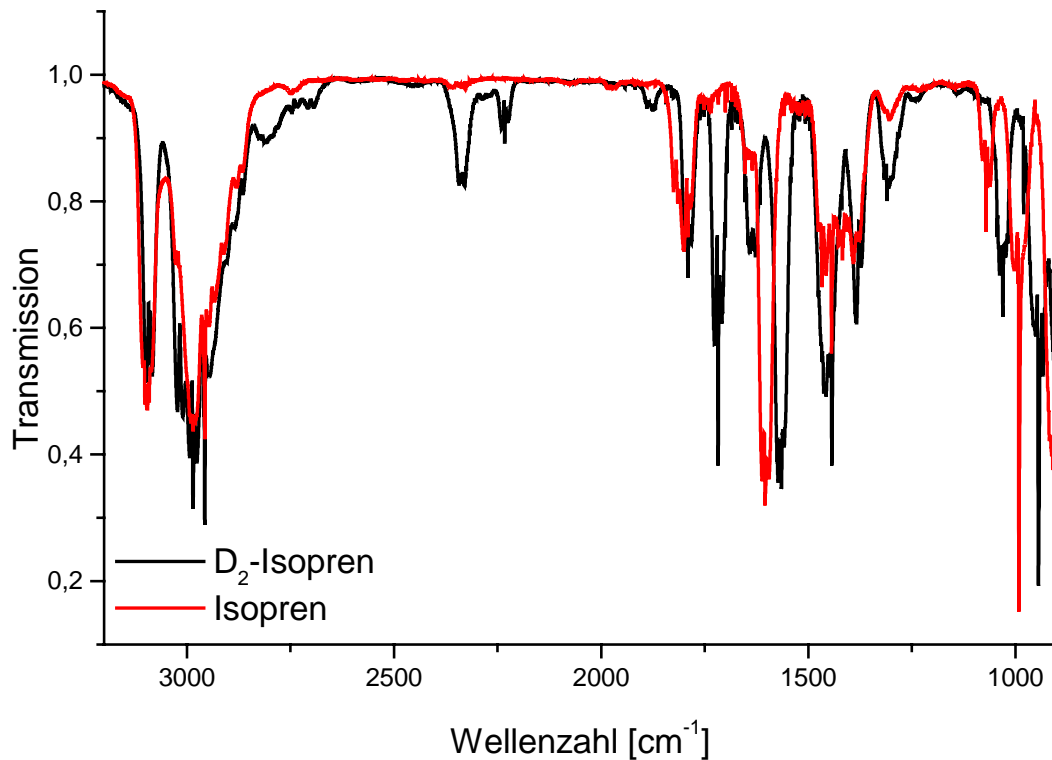


Abb. 91: IR-Spektren der beiden Isoprene in der Gasphase

Wichtiger als die Unterscheidbarkeit im IR-Spektrum sind die Unterschiede im PAS, denn nicht jede Bande im IR ist durch den CO<sub>2</sub>-Laser erreichbar. Nach vergleichenden Messungen mit PAS zeigte sich die ideale Lage erreichbarer, unterscheidbarer Banden (Abb. 92).

Obwohl die beiden Spektren eine Bande bei 10,1 bzw. 10,6  $\mu\text{m}$  haben, ist die des deuterierten Isoprens leider nicht durch den Laser erreichbar. Schließlich liefert die Kombination von sechs verschiedenen Messpunkten und ihr Verhältnis zueinander eine bessere und größere Genauigkeit in der Bestimmung der Konzentrationen in der Gasphase.



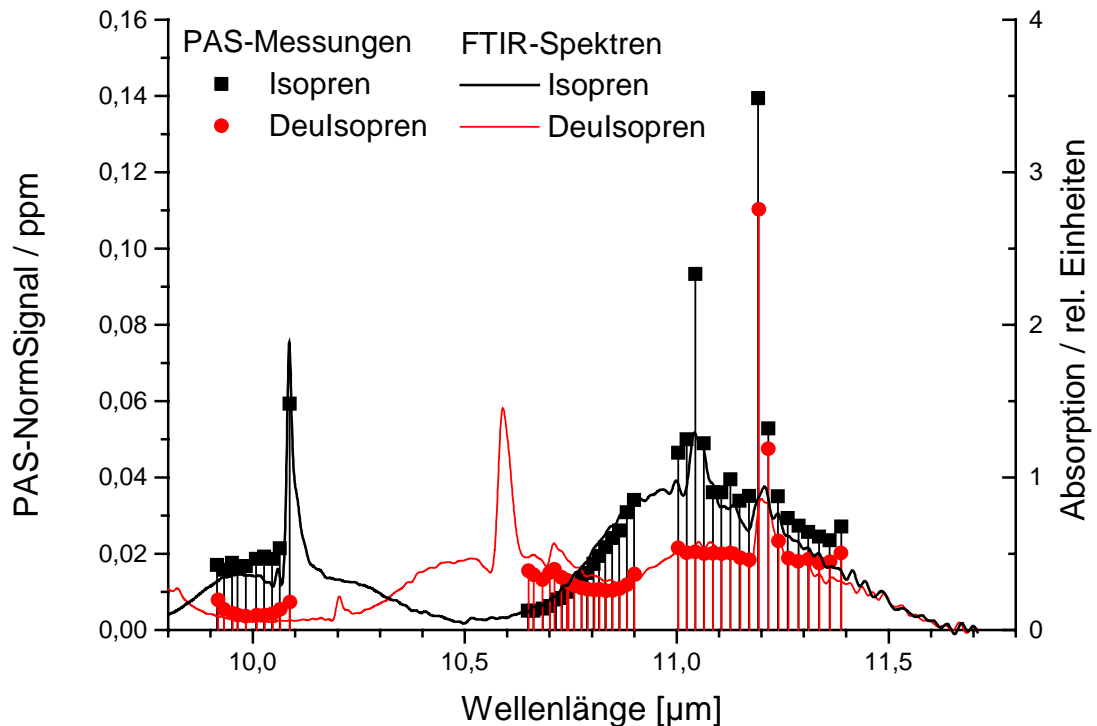


Abb. 92: Vergleich des Fingerprintbereichs der PAS- und der FTIR-Messung zur Unterscheidung von Isopren und 4,4-Dideuteroisopren (Deulsopren)

### Praktische Anwendung

Die gemessenen Werte wurden in das Experiment übertragen und praktisch überprüft. Die unten stehende Grafik zeigt eindrucksvoll die Funktion der neuen Messmethode (Abb. 93).

Die Isoprenemission eines Eukalyptusblatts wurde beobachtet. Dieses gibt schon ohne besonderen Reiz Isopren ab. Die Isopren-Synthetase reagiert sehr empfindlich auf verschiedene äußere Faktoren. So ist sie lichtabhängig und temperaturempfindlich. Dies sieht man sehr deutlich im Versuchsverlauf (Abb. 93), denn die Isoprenemission beginnt erst nach dem Einschalten des Lichtes. Nach der Zugabe von Deutero-DOX wird diese langsam mit eingebaut und die Dideuteroisopren-Emission steigt, während gleichzeitig weniger Isopren gemessen wird.

Durch die Erhöhung der Küvettentemperatur steigt die Syntheserate beider Isoprene durch die erhöhte Aktivität des Enzyms. Die Temperaturerhöhung führt dabei nicht nur zu einer einfachen Erhöhung der Emission. Auf Grund des Temperatursprunges gibt es ein kurzzeitiges "Überschießen" (ca. 20 min) der Emission. Die Plateau-Temperatur von 53 Grad liegt schon über dem Optimum für die Isoprenproduktion, so

dass der steady-state-Wert der Emission des deuterierten Isoprens unter dem für 37 Grad liegt. Schließlich nähern sich die gemessenen Konzentrationen durch Reduktion der Temperatur und durch das Ausschalten des Lichts dem Nullwert an. Die Mengen des undeuterierten Isoprens fallen schneller, da mangels Photosynthese bei der Temperatur kein DOX mehr nachgeliefert wird.

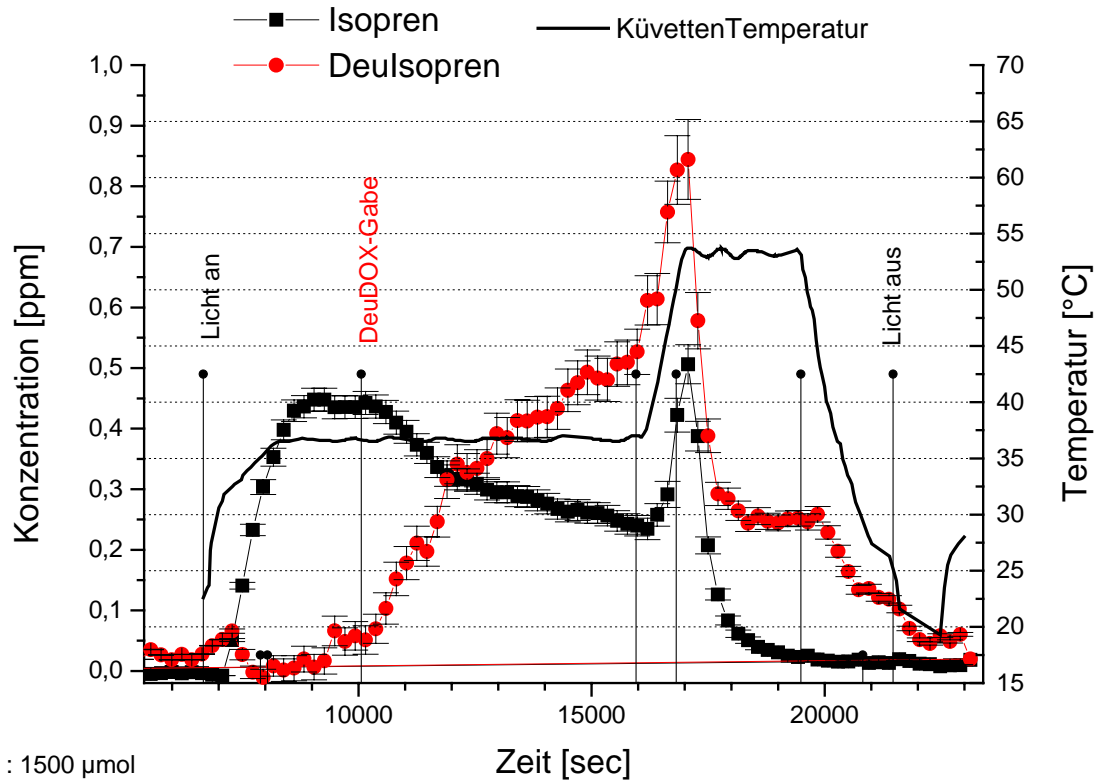


Abb. 93: Test der Funktionstüchtigkeit des neuen PA-Spektrometers

Das Experiment zeigt deutlich die korrekte Funktion des neuen Versuchsaufbaus in Bezug auf Verhalten nach Deutero-DOX-Zugabe, Temperatur- und Lichtempfindlichkeit. Damit steht nun eine neue moderne Methode zur Verfügung, um die Emission von Isopren und die sie beeinflussenden Faktoren mit sehr großer Empfindlichkeit (< 1 ppm) zu untersuchen.

## 4 Zusammenfassung

- Es wurde ein Photoaffinitätsmarker zur Identifikation von potentiellen Bindeproteinen oder Rezeptoren von Coronatin entwickelt und synthetisiert (Abb. 94).

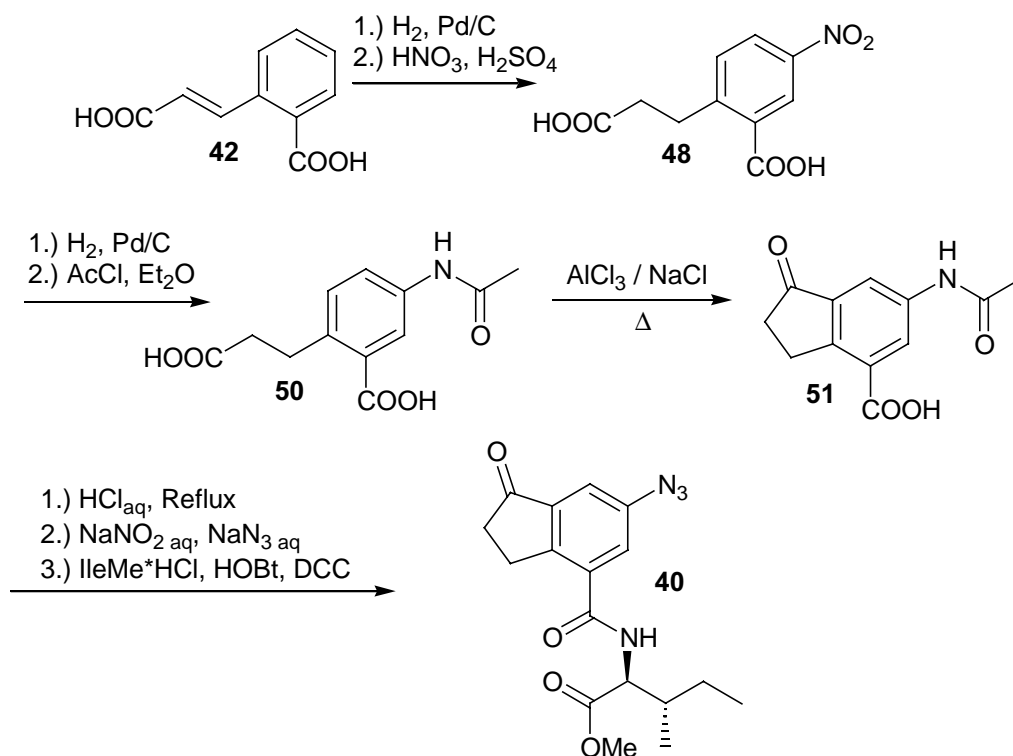


Abb. 94: Darstellung des Photoaffinitätsmarkers 6-Azido-Indanoyl-Isoleucinmethyl ester (**40**)

Der Elicitor **40** zeigt in zahlreichen Bioassays eine große biologische Aktivität, die der des Coronatins weitgehend analog ist (Tab. 2).

Um die Wirksamkeit der photolabilen Azidofunktion für die Photoaffinitätsmarkierung zu überprüfen, wurde der Zerfall des Markers nach Bestrahlung mit UV-Licht studiert und als Reaktion erster Ordnung nachgewiesen. Die reaktive Spezies wurde mit Diisopropylamin abgefangen und zeigte eine intensive Fluoreszenz. Das Azid bindet nach UV-Bestrahlung an Myoglobin und bildet wiederum ein stark fluoreszentes Azepinderivat aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verbindung **40** ein großes Potential als Werkzeug für die Photoaffinitätsmarkierung hat. Durch die zum Coronatin analoge

biologische Aktivität ist weitestgehend sichergestellt, dass eine Wechselwirkung mit denselben Rezeptoren oder Bindeproteinen stattfindet.

**Literatur:** Schüler G, Wasternack C, Boland W. „Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling.“ *Tetrahedron* 1999; 55(13):3897-3904.

Bioassay/Elicitor	JA	Coronatin	40	57
Duftproduktion (Limabohne)	++	+++	++	+++
Rankenkrümmung (Zaunrübe)	-/+	+++	++	++/ +++
Glyceollinproduktion (Sojabohne)	+	+++	++	+++
Nikotinproduktion (Tabak)	+++	n.b.	n.b.	+++
Benzo[c]phenanthridine ( <i>E. californica</i> )	(MeJA) ++	++ <sup>60</sup>	n.b.	++
JIP 23 Genexpression (Gerste)	+++	n.b.	+	+++

Tab. 2: Vereinfachte Darstellung der biologischen Aktivität der Elicitoren in verschiedenen Bioassays (-: keine Aktivität, +++: sehr starke Aktivität)

- Coronatin ist ein wichtiger, aber schwer zugänglicher Elicitor zum Studium des pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Der 6-Ethyl-Indanoyl-Isoleucinmethylester (57) wurde als synthetisch leicht darstellbares und biologisch hochaktives Analogon des Phytotoxins dargestellt. Die neue Synthese (Abb. 95) ist einfach, effektiv, für größere Mengen geeignet und hat sehr kostengünstige Edukte (Acetylchlorid und Terpentinersatz). Der neue Elicitor erweist sich als biologisch hochaktiv (Tab. 2).

Neben seiner wissenschaftlichen Nutzbarkeit zur Untersuchung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels hat der Elicitor 57 auch wirtschaftliche Einsatzmöglichkeiten bei der Produktion von Wertstoffen (z.B. Taxol<sup>TM</sup>) aus Pflanzen und Zellkulturen.

**Literatur:** Schüler G., Görts H., Boland W. „6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine“ *Eu. J. Org. Chem.* 2001, in press

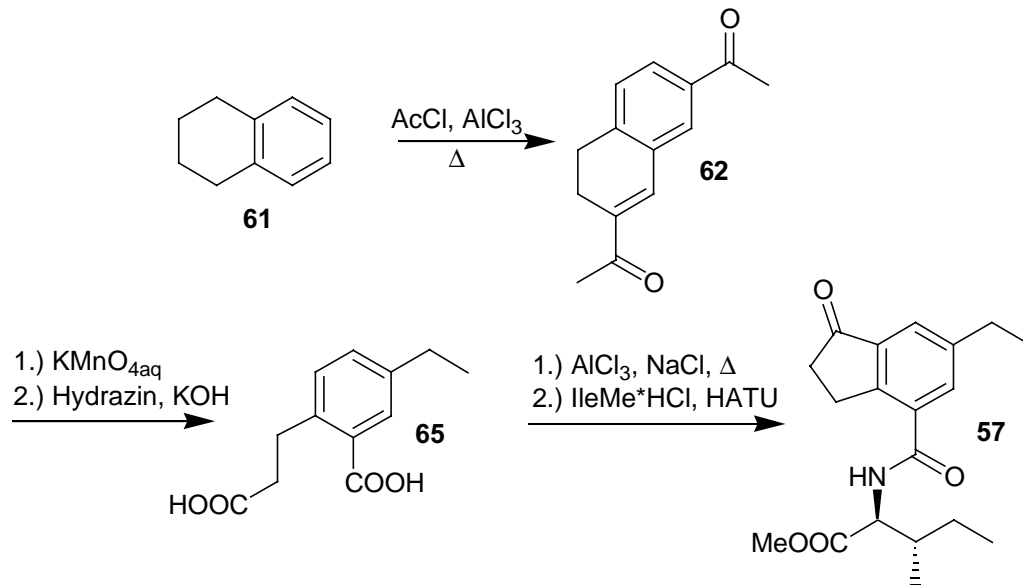


Abb. 95: Darstellung des Coronatinanalogons 6-Ethyl-Indanoyl-Isoleucinmethylester (**57**)

- Anhand der beiden Verbindungen **40**, **57** und anderer Indanoyl-Konjugate wurde der Einfluss eines Substituenten an 6-Position auf die biologische Wirkung beim Duftbioassay an der Limabohne studiert.
- In einem gemeinsamen Projekt mit Thomas Krumm und Jürgen Engelberth wurde eine neue einfache Quantifizierungsmethode für die 12-Oxophytodiensäure aus pflanzlichen Proben auf HPLC-Basis entwickelt. Mit dieser wurde der Einfluss der exogen als Aspirin zugegebenen Salicylsäure auf den Octadecanoidweg gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass bei den mit Salicylsäure vorinkubierten Blättern der Abbau von OPDA zu JA inhibiert wird. Damit wurde ein weiterer wichtiger Beitrag zur Aufklärung des „Crosstalks“ zwischen den pflanzlichen Signalwegen geleistet.

**Literatur:** Engelberth J, Koch T, Schüler G, Bachmann N, Rechtenbach J, Boland W. „Cross-Talk between Jasmonate- and Salicylate Signaling in the Limabean.“ *Plant Physiol.* 2001, 125:369-377

- Die Entwicklung einer neuen hochsensitiven und apparativ wenig aufwendigen Analysemethode für organische Säuren wurde für das System der pflanzlichen Signalstoffe entwickelt. Durch die Derivatisierung (Abb. 96) von Carboxylgruppen als Pyrenylester wurden Substanzen wie Jasmonsäure, OPDA und Fettsäuren leicht über ihre Fluoreszenz detektier- und quantifizierbar. Die Auftrennung der vorgereinigten Proben erfolgt über HPLC. Die durchgeführten Messungen zeigen das Potential dieser Methode und eröffnen eine Reihe von

Verbesserungsmöglichkeiten, um das ganze Spektrum der pflanzlichen Signalstoffe künftig mit einem HPLC-Lauf zu bestimmen.

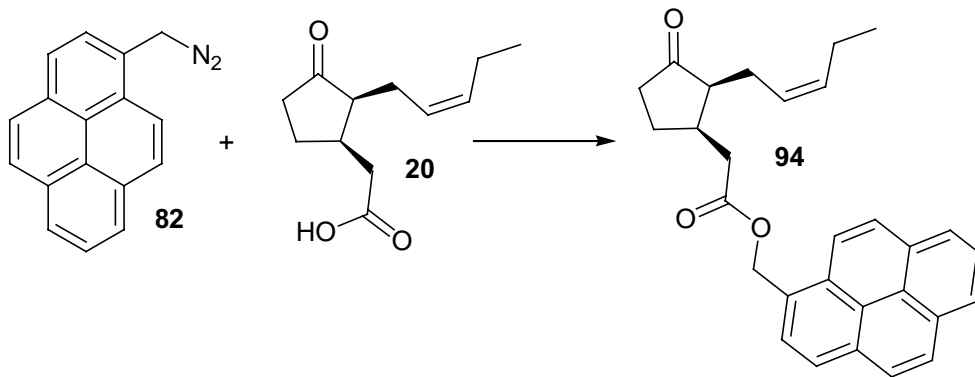


Abb. 96: Fluoreszenzmarkierung von JA (**20**) durch PDAM (**82**)

- Die Bedeutung von Isopren als Atmosphärgas mit einem großen Beitrag zum Treibhauseffekt und seine Emission als Produkt im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel machen die Entwicklung neuer Methoden zur zeitgleichen Spurengasanalyse interessant. In Zusammenarbeit mit Frank Kühnemann wurde ein System für die Photoakustikspektroskopie von Isopren entwickelt.

**Literatur:** Dahnke H, Kahl J, Schüler G, Boland W, Urban W, Kühnemann F. „Online monitoring of biogenic isoprene emissions using photoacoustic spectroscopy.“ Applied Physics B Lasers & Optics 2000;70(2):275-280.

---

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien, Geräte und Methoden

#### 5.1.1 Geräte

NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500
Massenspektrometer	Micromass MasSpec 2
IR-Spektrometer	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
UV-Spektrometer	Perkin-Elmer Lambda 2 Spektrometer
Fluoreszenz-Spektrometer	JASCO FP-750
Elementaranalyse	Elementar Vario EL
Kristallstruktur	Nonius KappaCCD Diffraktometer
Schmelzpunkte	Büchi B-540
GC-MS	Finnigan GCQ
HPLC	Kontron 525 Pumpe, 560 Autosampler, 440 Dioden-Array-Detektor, JASCO FP-1520 Fluoreszenz-detektor
Analytische DCs	PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Firma Merck, Schichtdicke 2 mm
Preparative DCs	Kieselgel 60 der Firma Merck, Körnung 60-100 µm
Strippingpumpen	Miniaturdrehschieberpumpen der Firma Fürgut, 88139 Aitrach, Nennspannung 12 V, Betriebsspannung 9-10 V
HPLC-MS	Finnigan LCQ
MALDI-TOF-MS	Micromass ToFSpec 2E

## 5.1.2 Materialien und Methoden

### Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, sind kommerziell erhältlich.

12-Oxophytodiensäure (OPDA, <b>18</b> )	CAMPRO, Berlin, Deutschland
1-Pyrenyldiazomethan ( <b>82</b> )	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Coronatin und CFA habe ich freundlicherweise von Dr. Matthias Ullrich und Dr. Ina Budde vom MPI für terrestrische Mikrobiologie erhalten bzw. selber aus *P. syringae* gewonnen.

### Pflanzen

Limabohne: *Phaseolus lunatus* Ferry Morse var. „Jackson Wonder Bush“: BASF AG und Kellogs Seeds Inc., USA.

Zaunrübe: *Bryonia dioica* wurde in der Umgebung des Instituts gesammelt.

### Bakterien

*Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* habe ich von Dr. Matthias Ullrich vom MPI für terrestrische Mikrobiologie erhalten.

Bezeichnung	Charakteristika	Quelle
PG4180 (Wildtyp)	COR <sup>+</sup> , CMA <sup>+</sup> , CFA <sup>+</sup>	113
PG4180.D4	Km <sup>r</sup> : COR <sup>-</sup> , CMA <sup>-</sup> , CFA <sup>-</sup>	113
PG4180.615	Km <sup>r</sup> : COR <sup>-</sup> , CMA <sup>-</sup> , CFA <sup>+</sup>	Ullrich, MPI Marburg

### Medien

a) KB-Medium (Vollmedium zur Anzucht von *Pseudomonas syringae*)

King's B Medium<sup>114</sup>

- 20,0 g Pepton
- 1,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,5 g MgSO<sub>4</sub> × 6 H<sub>2</sub>O
- 10,0 ml Glycerin



ad	1 l	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>
pH	7,2	

b) HSC-Medium (Minimalmedien zur Anzucht von *Pseudomonas syringae*)

Hointink-Sinden-Medium optimiert für Coronatin-Synthese<sup>113</sup>

Teil A:

	1,0 g	NH <sub>4</sub> Cl
	0,2 g	MgSO <sub>4</sub> × 6 H <sub>2</sub> O
	4,1 g	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,6 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,3 g	KNO <sub>3</sub>
	10,0 ml	FeCl <sub>3</sub> (2mM)
ad	0,9 l	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>
pH	6,8	

Teil B:

	20,0 g	Glukose
ad	0,1 l	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>

Die Lösungen wurden separat autoklaviert und vor dem Gebrauch im Verhältnis 9:1 gemischt.

### Methoden und Versuchsbedingungen

a) Allgemeine Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen

Die Pflanzenanzucht von *P. lunatus* Ferry Morse var. *Jackson Wonder Bush* erfolgte in handelsüblicher Anzuchterde, die vor Gebrauch 3 Minuten bei 900 W in der Mikrowelle sterilisiert wurde. Die Temperatur schwankte zwischen 22 und 26° C, bei einer Luftfeuchtigkeit von 70-80%. Die Photophase betrug 14 Stunden mit Leuchtstoffröhren (270 μE m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). Jeweils 2 Samen wurden in einem Plastiktopf (Ø = 5.5 cm) 10-15 Tage angezogen, bis sie zwei voll entwickelte Primärblätter hatten.

b) Wachstum von *Pseudomonas syringae*

Wir erhielten ausgestrichene *P. syringae*-Zellen auf MG-Agarplatten und inkubierten diese vier Tage bei 28 °C. Von den frisch gewachsenen Kolonien wurden Flüssigkulturen (HSC, KB) angeimpft. Die Kulturen wurden bei 18 oder 28 °C in einem Brutschrank mit integriertem Schüttler bei 280 Upm inkubiert. Kulturen bis 10 mL

wurden in Reagenzgläsern mit einer Neigung von 45° und größere Volumina (100-200 mL) in 1 l-Erlenmeyerkolben herangezogen.

c) Isolation von Coronafacoyl-Komponenten

Die Extraktion organischer Säuren aus zellfreien Kulturüberständen erfolgte nach einer Methode von Palmer und Bender.<sup>113</sup> Zur Isolation großer Mengen Coronafacinsäure (**29**) und Coronatin (**28**) wurden *P. syringae* Kulturen für 5 Tage bei 18 °C in HSC-Medium inkubiert. Die Extraktion der Coronafacoyl-Komponenten erfolgte mit Ethylacetat aus 1 l Kulturüberstand im Leichtphasenextraktor. CFA und COR wurden anschließend durch Dickschichtchromatographie nach einem Protokoll von Mitchell aufgereinigt.<sup>115</sup> Als Laufmittel diente dabei ein Isopropanol/ Essigsäure/ Wasser/ Ethylacetat (8:1:1:390) Gemisch. Die Detektion von CFA und COR erfolgte unter UV-Licht bei 365 nm. Die entsprechenden Banden CFA ( $R_f = 0,6$ ) und COR ( $R_f = 0,28$ ) wurden vorsichtig herausgekratzt. Die Silica-Partikel wurden für mindestens 1 h in Ethylacetat geschwenkt. Schließlich wurden die Silica-Partikel abfiltriert, das Ethylacetat bei 65 °C verdampft und die verbleibenden Pellets in jeweils 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die aufgereinigten Coronafacoyl-Komponenten wurden bei 4 °C gelagert.

d) Ansetzen von Testlösungen für verschiedene Bioassays

Die Testlösung wurde angesetzt, indem der Elicitor in 10 µl DMSO vorgelöst und diese Lösung dann mit 10 ml Leitungswasser verdünnt wurde. Dabei ist es wichtig, bei den schwerlöslichen Verbindungen die DMSO-Lösung in eine stark rührende Lösung tropfen zu lassen, da die Verbindung ansonsten sofort wieder ausfällt. Eine Testlösung mit 0,1% DMSO zeigte keine biologische Wirkung

e) Duftbioassay an *Phaseolus lunatus*

Pflanzen von *P. lunatus* mit zwei voll entwickelten Primärblättern wurden mit einer Rasierklinge 3 cm unterhalb der Blattansätze abgeschnitten und sofort in Eppendorfgefäße mit der Testlösung (2 ml) transferiert. Wahlweise kann man auch sehr geringe Volumina der Elicitorlösungen in die Gefäße geben und nach der Aufnahme durch die Pflanzen mit Leitungswasser auffüllen.

Je eine Pflanze wird in ihrer Lösung in einen geschlossenen Exsikkator gestellt und dort für 24 h bei 25 °C gehalten, wobei während der ersten 8 Stunden belichtet wurde, gefolgt von 8 Stunden Dunkelheit und weiteren 8 Stunden Licht.

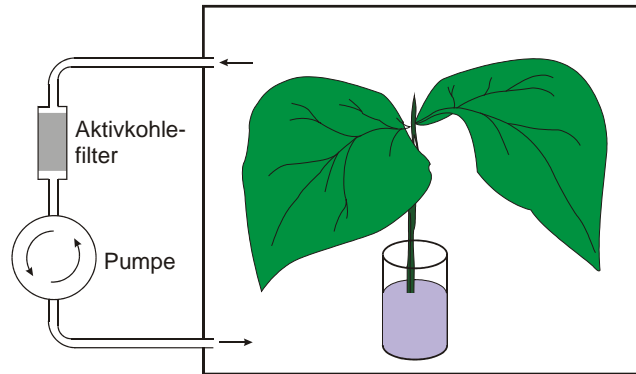


Abb. 97: Schema des „closed-loop“-Verfahrens zum Sammeln von Pflanzendüften

Die Duftstoffe, die von den Pflanzen in den nächsten 24 Stunden abgegeben werden, werden durch kontinuierliches Pumpen der Luft im Exsikkator über einen Aktivkohlefilter (1 mg Aktivkohle, CLSA-Filter, Le Ruisseau de Montbrun, F-09350 Daumazan sur Arize, Frankreich) im sogenannten „closed-loop“-Verfahren (Abb. 97) gesammelt.<sup>116</sup> Nach der Eluation der Duftstoffe vom Aktivkohlefilter mit 40 µl einer Dichlormethanolösung mit internem Standard (50 µM Bromdecan in Dichlormethan) werden die Extrakte per GS/MS vermessen. GC-Bedingungen: DB5 (0,25 µm x 30 m x 0,25 mm). Helium dient mit 40 cm min<sup>-1</sup> als Trägergas. Die Trennung der Verbindungen erfolgte unter programmierten Bedingungen (50 °C für 2 min, dann 10 °C min<sup>-1</sup> bis 200 °C, dann mit 35 °C min<sup>-1</sup> bis 280 °C). MS: Finnigan GCQ, GC-Interface bei 265 °C, Messbreite 35-450 Da. Die einzelnen Verbindungen wurden über ihre Peakflächen im Chromatogramm im Verhältnis zum internen Standard quantifiziert. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

#### f) Rankenkrümmungsassay an *Bryonia dioica*

Um die Fähigkeit der Verbindungen zu testen, Rankenkrümmung bei *Bryonia dioica* zu induzieren, wurden die jüngsten und bestentwickelten Ranken abgeschnitten und direkt in ein Eppendorfgefäß mit 2 ml der Testlösung (s.o.) überführt. Die Stärke der Rankenkrümmung wurde über einen Zeitraum von 24 h verfolgt und auf einer Skala von 0 (keine Krümmung) bis +++ (vollständige Spiralisierung) charakterisiert.<sup>93</sup>

g) Reaktion des Azids **40** mit Myoglobin

Eine Lösung des Azids **40** (4 mg, 11,6  $\mu\text{mol}$ ) in Wasser (10 ml) wird mit 50  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus Myoglobin (ca. 24 nmol) und Wasser (0,4 mg in 0,1 ml) vermischt und mit UV-Licht (254 nm, 6W) für 20 min bestrahlt. Das Wasser wird *in vacuo* entfernt und der resultierende braune Feststoff wird per MALDI-TOF analysiert. Trypsinogen (Bovine) und Cytochrome C (Equine) werden als interne Standards hinzugefügt. Sinapininsäure dient als Matrix.

h) HPLC-Untersuchung des „markierten“ Myoglobins

Die Probe wurde in einer Konzentration von 1 pmol/ $\mu\text{l}$  im Laufmittel (Wasser:Acetonitril 9:1) gelöst. Die Chromatographie besteht aus einer RP-HPLC Säule C4 Nucleosil-300/5. Als Laufmittel sind Wasser (A) und Acetonitril (B) mit jeweils 0,1% Trifluoressigsäure versetzt. Es wird ein Gradient benutzt, ausgehend von 90% A auf 60% A in 45 min.

Gemessen wird mit einem UV-Detektor bei 214 nm und einem Fluoreszenzdetektor mit einer Anregungswellenlänge bei 375 nm und einer Detektion bei 486 nm. LCQ-Quelle: ESI.

i) Quantifizierung endogener OPDA

Blätter von *P. lunatus* (1,0 g Gewebe) wurden eingefroren und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das resultierende Pulver wurde zweimal mit 25 ml Peroxidfreiem Diethylether extrahiert. Mit den vereinigten Extrakten wurde eine Festphasenextraktionskartusche (500 mg Adsorbens, Aminopropyl, Varian, Darmstadt) beladen. Die Kartuschen wurden mit 5 ml einer Lösungsmittelmischung aus Chloroform:Isopropanol (2:1, v/v) gewaschen und die gebundene OPDA mit 10 ml Diethylether:Essigsäure (98:2, v/v) eluiert. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel wurde der Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von 60  $\mu\text{l}$  wurde mittels HPLC analysiert (Kontron System, Autosample 560, Pumpe 525, DAD 440, Säule CC250/4 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey Nagel, Düren), Flussrate 1 ml  $\text{min}^{-1}$ , UV-Detektion bei 221 nm). Mobile Phase: Acetonitril (+0,1% TFA) und Wasser (+0,2% TFA) wurden in einem binären Gradient zur Chromatographie benutzt (40%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5 min), 50% (20 min), 60% (55 min), 98%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5 min); RT(OPDA) = 17,5 min). Die Quantifizierung der OPDA erfolgte über den Vergleich der Peakflächen mit denen einer Eichgerade, die unabhängig mit kommerziell erhältlicher OPDA erstellt wurde.

j) Fluoreszenzdetektion von JA und anderen organischen Säuren aus Pflanzenproben

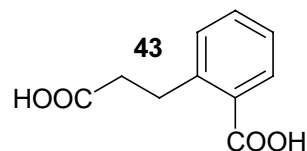
PDAM (**82**) wurde in Chloroform:Methanol (v:v 3:1) mit 1 mg/ml vorgelöst. Die gelösten Pflanzenextrakte (100 µl Methanol) wurden in GC-Vials (1 ml) mit 100 µl der PDAM-Lösung versetzt. Die Proben wurden danach 30 min bei RT geschüttelt. Die Reaktion verläuft quantitativ. Um den Überschuss an Reagenz abzufangen, gibt man 20 µl Essigsäure zu und schüttelt weitere 10 min.

Die Chromatographie erfolgt durch *reversed-phase* HPLC an einer C8 Säule mit einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril mit einem Fluss von 1,2 ml/min: 55%(MeCN) bei 0 min, 60% 1 min, 65% 46 min, 100% 56 min, 100% 70 min. Die Detektion bei 395 nm erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor und einer Anregungswellenlänge von 340 nm.

## 5.2 Synthesen

### 3-(2-Carboxyphenyl)propansäure

Zu einer Lösung von 5 g (26 mmol) 3-(2-Carboxyphenyl)propansäure in 100 ml 0,6 N Natronlauge gibt man 0,5 g Palladium-Aktivkohle-Katalysator (10%) und lässt 48 h bei RT unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre rühren. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird mit 6 N Salzsäure auf pH 1-2 eingestellt



und das ausgefallene Reaktionsprodukt abgesaugt. In Lösung verbliebenes Produkt wird durch dreimaliges Extrahieren des Filtrats mit je 30 ml Diethylether, anschließendes Trocknen der vereinigten Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer gewonnen. Der Katalysator kann nach Waschen mit Wasser und Trocknen an der Luft ohne merklichen Aktivitätsverlust wiederverwendet werden.

Ausbeute: 4,87 g (25,1 mmol, 96,5 %)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)     δ [ppm]: 2,5 (t, 2H, 2-CH<sub>2</sub>); 3,1 (t, 2H, 3-CH<sub>2</sub>); 7,3-7,4 (m, 2H, 7-CH, 9-CH); 7,45 (dd, 1H, 8-CH); 7,8 (d, 1H, 6-CH); 12,5 (s, 2H, COOH)

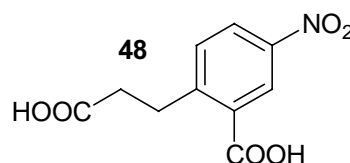
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)     δ [ppm]: 29,1 (3-C); 35,3 (2-C); 126,3 (7-C); 130,3 (5-C); 130,5 (8-C); 130,8 (9-C); 131,8 (6-C); 141,8 (4-C); 168,8 (10-C) 173,8 (1-C)

IR                             ν [cm<sup>-1</sup>]: 2947 (CH<sub>aliph.</sub>); 2562 (OH); 1690 (w, C=O); 1311 (s); 1277 (s); 937 (s)

MS:                            m/z (%): 194 (M<sup>+</sup>, 1); 174 (45); 148 (100); 131 (30); 102 (20); 77 (28)

### 2-(2-Carboxyethyl)-5-nitrobenzoesäure

Eine Mischung aus rauchender Salpetersäure (1,1 g, 0,33mol) und konzentrierter Schwefelsäure (2 g) wird tropfenweise unter Rühren zu einer eisgekühlten



Lösung von 3-(2-Carboxyphenyl)propansäure (**43**) (5 g, 25,8 mmol) in konzentrierter Schwefelsäure (17 g) gegeben. Nach 2 Stunden Rühren gibt man die Mischung auf Eis. Das Produkt fällt aus und kann nach dem Abfiltrieren und gründlichem Waschen aus Wasser umkristallisiert werden. Es bilden sich schwach gelbe Plättchen (Schmelzpunkt 180-182 °C).

Ausbeute: 5,01 g (20,9 mmol, 81,2 %)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2,6 (t, 2H, 2-CH<sub>2</sub>); 3,25 (t, 2H, 3-CH<sub>2</sub>); 7,65 (d, 1H, 9-CH); 8,30 (dd, 1H, 8-CH); 8,55 (d, 1H, 6-CH), 12,93 (s, 2H, COOH)

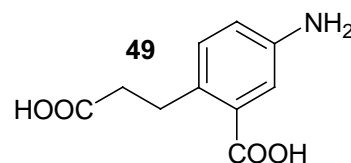
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 28,8 (3-C); 34,5 (2-C); 124,9 (6-C); 125,9 (8-C); 131,6 (5-C); 132,4 (9-C); 145,7 (4-C); 149,6 (7-C); 166,7 (10-C); 173,3 (1-C)

IR v [cm<sup>-1</sup>]: 3065 (CH<sub>arom.</sub>); 2640 (OH); 1697 (C=O); 1520 (NO<sub>2</sub>, s); 1351 (NO<sub>2</sub>, s); 913 (s)

MS: m/z (%): 239,1 (M<sup>+</sup>, 2); 221,0 (20); 193,0 (100); 176,1 (12); 130 (10); 91 (11); 77 (13)

### 5-Amino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure

5-Nitro-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure (**48**) (2.0 g, 8.6 mmol) wird in wässriger Natriumhydroxidlösung (0.6 M, 75 ml) unter atmosphärischem Druck mit Pd/C (10%, 0.10 g) als Katalysator hydriert. Nach 18 stündigem Rühren wird der Katalysator durch Filtration entfernt



und die Lösung vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Die Aminoverbindung fällt nach einiger Zeit aus und wird abfiltriert. Durch Umkristallisieren aus Wasser erhält man farblose Nadeln (Schmelzpunkt 200-202 °C).

Ausbeute: 3,28 g (15,7 mmol, 83 %)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]: 2,4 (t, 2H, 2-CH<sub>2</sub>); 2,95 (t, 2H, 3-CH<sub>2</sub>); 6,65 (dd, 1H, 8-CH); 6,95 (d, 1H, 6-CH); 7,05 (d, 1H, 9-CH)

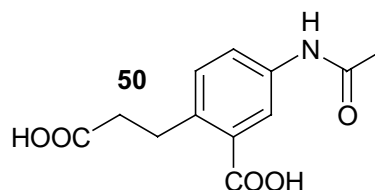
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]: 28,3 (3-C); 35,9 (2-C); 115,4 (8-C); 117,2 (6-C); 128,4 (9-C); 130,4 (5-C); 131,2 (4-C); 146,7 (7-C); 169,0 (10-C); 174,0 (1-C)

IR  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2947 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ); 2653 (OH); 1693 (C=O); 1600 (NH); 1575 (s); 1311 (m); 1277 (s); 1216 (C-N); 937 (s); 752 (s)

MS:  $m/z$  (%): 209,0 ( $M^+$ , 40); 163,1 (50); 150,1 (100); 94 (17); 77,1 (9)

### 5-Acetylamino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure

5-Amino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure (**49**) (1,47 g, 7 mmol) wird in Diethylether (20 ml) und Triethylamin (2.0 ml) suspendiert. Während die Mischung bei 0 °C gerührt wird, gibt man langsam Acetylchlorid (0.60 ml, 8.6 mmol) zu. Nach einer



weiteren Stunde Rühren bei 0 °C lässt man die Reaktionsmischung auf r.t. erwärmen und rührt für weitere 30 min. Der farblose Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen (3 x 5.0 ml) und getrocknet.

Ausbeute: 1.50 g (85%). Fp.: 119-122 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 2,09 (s, 3H- $\text{CH}_3$ ); 2,53 (t,  $J=7,6$ , 2H-C(2')); 3,11 (t,  $J=7,6$ , 2H-C(1')); 7,30 (d, 1H-C(3)); 7,71 (d, 1H-C(4)); 8,09 (s, 1H-C(6)); 10,06 (s, NH)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 23,9 (Me), 28,6 (C-1'), 35,4 (C-2'), 120,8 (C-6), 122,2 (C-4), 130,4 (C-3), 131,1 (C-1), 136,3 (C-2), 137,5 (C-5), 168,4 (CONH), 170,6 (Ar-COOH), 173,8 (COOH)

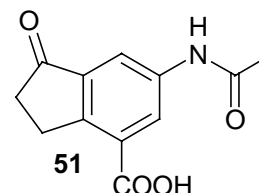
IR (KBr):  $\nu = 3301, 2976, 2677, 2491, 1731, 1704, 1630, 1606, 1552, 1504, 1414, 1394, 1291, 1260, 899, 827 \text{ cm}^{-1}$

MS (70 eV): 251( $M^+$ , 14), 233(7), 205(45), 163(65), 150(100), 146(11), 118(7), 94(12), 77(10)

HR-MS:  $m/z$  berech. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ : 251,0794, gemessen: 251,0787.

### 6-Acetylamino-1-oxo-indan-4-carbonsäure

5-Acetylamino-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure (**50**) (1,40 g, 4,5 mmol) wird intensiv mit wasserfreiem Aluminiumtrichlorid (20,0 g) und Natriumchlorid (3,0 g) vermischt. Die Mischung





wird für 2 Stunden auf  $\approx 140\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Die erhaltene dunkle und zähflüssige Masse wird dabei ab und zu gerührt. Nach Abkühlen wird der Komplex mit Eiswasser (10 ml) und 6N Salzsäure (30 ml) hydrolysiert und mehrere Stunden bei RT gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,0 g (77 %)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,06 (s, 3H- $\text{CH}_3$ ); 2,63 (m, 2H-C(3)); 3,29 (m, 2H-C(2)); 8,17 (s, 1H-C(5)); 8,34 (s, 1H-C(7)); 10,4 (s, 1H-NH), 13,2 (s br, 1H-COOH)

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 23,9 ( $\text{CH}_3$ ), 26,4 (C-3), 36,0 (C-2), 116,1 (C-6), 126,8 (C-4), 129,0 (C-7a), 138,4 (C-5), 138,9 (C-7), 150,5 (C-3a), 166,6 (COOH), 168,7 (CONH) and 205,8 (C-1)

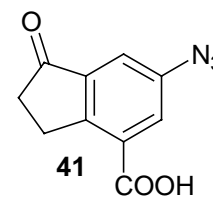
IR (KBr):  $\nu = 3295, 2920, 2595, 1718, 1690, 1653, 1609, 1545, 1479, 1430, 1373, 1305, 1231, 1206, 1141, 897, 714\text{ cm}^{-1}$

MS (70 eV): 233( $M^+$ , 50), 191(100), 163(11), 146(45), 135(10), 106(9), 89(8)

HR-MS:  $m/z$  berech. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ : 233,0688, gemessen: 233,0686.

### 6-Azido-1-oxo-indan-4-carbonsäure

Eine Suspension aus 6-Acetylamino-1-oxo-indan-4-carbonsäure (**51**) (0,90 g, 3,9 mmol) in 6N Salzsäure (5,0 ml) wird 2 Stunden unter Argon refluxiert. Nach dem Entfernen der Salzsäure im Vakuum wird der Rückstand in Fluoroborsäure (3,0 ml, 50%-soln.) suspendiert. Die gekühlte und gut gerührte Mischung wird langsam mit einer Lösung (0,60 ml) von Natriumnitrit in Wasser (0,50 g / ml) versetzt. Der erhaltene Feststoff wird abfiltriert und wieder in Wasser (2,0 ml) gelöst. Zu dieser Lösung tropft man unter Rühren eine Lösung von Natriumazid (0,30 g) in Wasser (0,60 ml). Der erhaltene gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.



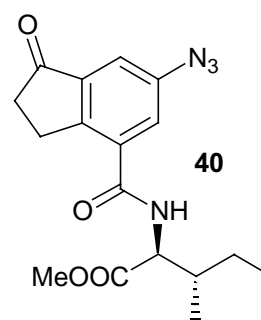
Ausbeute: 0,66 g (78%). Fp.: 175-177  $^\circ\text{C}$  (decomp.)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,47 (t, 2H-C(3)), 3,07 (t, 2H-C(2)), 7,43 (s, 1H-C(5)), 7,73 (s; 1H-C(7))

$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ )	$\delta$ : 27,4 (C-3), 37,0 (C-2), 117,4 (C-6), 127,3 (C-4), 131,2 (C-8), 140,3 (C-5), 140,4 (C-7), 153,4 (C-9), 166,9 (COOH) and 206,0 (C-1)
IR (KBr):	$\nu$ = 3066, 2979, 2935, 2127 ( $\text{N}_3$ ), 1725, 1696, 1609, 1482, 1420, 1311, 1238, 1169 $\text{cm}^{-1}$
MS (70 eV):	217( $M^+$ , 20), 189 (100), 161(22), 133(22), 116(11), 105 (15), 89(28), 63(23)
HR-MS:	$m/z$ berech. für $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ : 217,0487, gemessen: 217,0488.

### 2-[(6-Azido-1-oxo-indan-4-carbonyl)-amino]-3-methylpentansäuremethylester

Zu einer eisgekühlten und gut gerührten Lösung aus 6-Azido-1-oxo-indan-4-carbonsäure (**41**) (0,10 g, 0,4 mmol), L-Isoleucinmethylester Hydrochlorid (0,083 g), 4-Ethylmorpholin (0,053 g) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) (0,115 g) in THF (5,0 ml) gibt man unter Argonatmosphäre langsam *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 0,10 g). Man lässt die Lösung für weitere 20 Stunden bei 0 °C rühren. Der abgeschiedene Harnstoff wird durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der erhaltene dunkle Feststoff wird wieder in Essigsäureethylester gelöst (5,0 ml) und mit 2N Salzsäure (3 x 5,0 ml) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x 5,0 ml) gewaschen. Die organische Schicht wird mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und das Produkt chromatographisch an Silicagel (Essigsäureethylester : Hexan, 1:2, v/v) gereinigt.



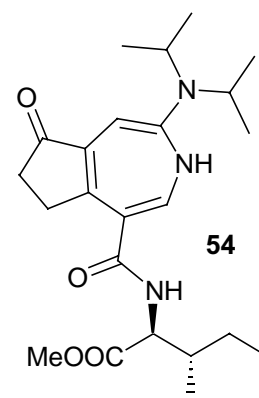
Ausbeute: 0,110 g (82%). Fp.: 112-114 °C

$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ )	$\delta$ : 0,94 (t, $J=7,4$ , 3H-C(5)), 0,98 (d, $J=6,8$ , Me-C(3)), 1,34 (dq, $J=7,4$ and 22,0, H-C(4)), 1,50-1,60 (m, H-C(4)), 1,96-2,03 (m, 1H-C(3)), 2,74 (t, $J=5,7$ , 2H-C(2')), 3,21-3,33 (m, 2H-C(3')), 3,74 (s, MeO-C(1)), 4,47 (t, 1H-C(2)), 7,47 (d, $J_{1,3}=2,1$ , 1H-C(5')), 7,65 (d, $J_{1,3}=2,1$ , 1H-C(7)), 8,86 (d, NH)
---------------------------------	--

$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ )	$\delta$ : 11,0 (C-1), 15,5 (Me-3), 25,1 (C-4), 25,2 (C-3'), 35,9 (C-3), 36,2 (C-2'), 51,7 (MeO-1), 57,1 (C-1), 114,4 (C-6'), 124,4 (C-4'), 134,6 (C-7a'), 138,9 (C-5'), 139,2 (C-7'), 150,5 (C-3a'), 166,1 (CO-4'), 171,9 (C-1) 205,2 (C-1')
IR (KBr):	$\nu$ = 2964, 2932, 2858, 2116 ( $\text{N}_3$ ), 1746, 1728, 1707, 1636, 1523, 1465, 1340, 1311, 1235, 1197 $\text{cm}^{-1}$
MS (70 eV):	344( $M^+$ , 5), 316(35), 285(10), 256(100), 227(10), 200(25), 188(10), 171(30), 143(33), 116(12), 99(11), 89(9), 69(9)
HR-MS:	$m/z$ berech. für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$ : 344,1485, gemessen: 344,1489.

#### 4-Diisopropylamino-6-oxo-3,6,7,8-tetrahydro-cyclopenta[d]azepino-1-yl-L-Isoleucinmethylester

Eine Lösung von **40** (5,88 mg, 17,0  $\mu\text{mol}$ ) in THF (20 ml) wird mit Diisopropylamin (228  $\mu\text{l}$ , 1,63 mmol) versetzt und in einer Quarzcell (d = 1 cm) bei Raumtemperatur mit UV-Licht (6 W DC-Lampe) bei 254 nm bestrahlt. Der Fortschritt der Reaktion wird mittels DC (EE) verfolgt, bis kein Edukt mehr zu sehen ist. Die DC zeigt bei Reaktionsende drei Produkte. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel wird das Hauptprodukt ( $R_f$  = 0,43) durch Chromatographie an Silicagel (EE) gereinigt. Man erhält einen braunen Feststoff.



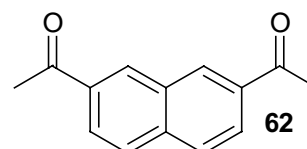
Ausbeute: ca. 3 mg (42%)

$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ )	$\delta$ : 0,95(m, H-( $\text{CH}_3$ )), 0,98 (t, 3H-C(5)), 1,26 (m, H- $\text{CH}_3$ ), 1,23 and 1,51 (m, H-C(4)), 1,97 (m, H-C(3)), 2,70 (t, H-C(7')), 3,27 (t, H-C(8')), 3,77 (s, H- $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4,13 (dq, H-CH), 4,33 (m, H-NH), 4,71 (m, H-C(2)), 6,23 (d, H-NH), 7,11 (d, $J=2,08$ , H-C(5')), 7,28 (d, $J=2,08$ , H-C(2'))
$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ )	$\delta$ : 11,6 ( $\text{CH}_3$ -3), 15,6 (C-5), 25,3 (C-4), 25,5 (C-8'), 36,3 (C-7'), 38,2 (C-3), 52,1 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -1), 57,1 (C-2), 106,3 (C-4'), 110,7 (C-5'), 120,8 (C-2'), 143,2 (C-5a'), 150,4 (C-8a'), 164,7 (CO-1'), 168,6 (C-1'), 172,7 (C-1), 206,0 (C-6')

IR (KBr)	2964, 2917, 2848, 1741, 1676, 1636, 1558, 1487, 1371, 1250, 1205, 1140, 1038 cm <sup>-1</sup>
MS:	417(M <sup>+</sup> , 45), 374(100), 314(5), 273(15), 229(83), 189(13), 162(22), 134(11), 100(5)
HR-MS:	<i>m/z</i> berech. für C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> : 417,2628, gemessen: 417,2622.

### 1-(7-Acetyl-5,6-dihydro-naphthalen-2-yl)-ethanon

Acetylchlorid (19 g) wird langsam zu einer Suspension aus Aluminiumtrichlorid (43 g) in Ethylendichlorid (20 ml) getropft. Zu dieser Mischung tropft man vorsichtig bei r.t. eine Lösung von Tetralin (10 g,



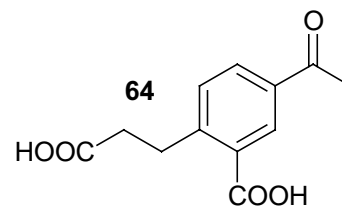
75,6 mmol) in Ethylendichlorid (8 ml). Wenn die heftige Reaktion beendet ist, entfernt man das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum. Der Rückstand wird 2 Stunden auf 100 °C erhitzt. Das Diketon erhält man durch Destillation (190-200° C / 8\*10<sup>-3</sup> bar). Die zunächst sehr zähflüssige Masse wird nach längerem Stehen zu einem hellgelben Feststoff.

(Ausbeute: 5,1 g, 23,8 mmol, 31 %)

<sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> ):	δ = 2,36 (s, 3 H), 2,50 – 2,55 (m, 5 H), 2,80 (t, 2 H), 7,20 (d, 1 H), 7,35 (s, 1 H), 7,74 (s, 1 H), 7,76 (d, 1 H).
<sup>13</sup> C NMR (CDCl <sub>3</sub> ):	δ = 20,5 (CH <sub>3</sub> ), 25,2 (CH <sub>3</sub> ), 26,4 (CH <sub>2</sub> ), 27,5 (CH <sub>2</sub> ), 127,9 (CH <sub>arom</sub> ), 128,1 (CH <sub>arom</sub> ), 129,6 (CH <sub>arom</sub> ), 132,8 (C=C), 135,9 (C <sub>arom</sub> ), 136,0 (C <sub>arom</sub> ), 138,8 (C=C), 142,8 (C <sub>arom</sub> ), 197,1 (COOH), 198,1 (COOH).
IR (KBr):	ν = 3053, 3004, 2954, 2894, 2839, 1682, 1657, 1622, 1592, 1411, 1386, 1354, 1285, 1205, 833
MS (70 eV);	<i>m/z</i> (%): 214 (100) [M <sup>+</sup> ], 199 (80), 171 (82), 156(11), 141 (7), 128 (50).
HR MS [M <sup>+</sup> ]:	berech. 214,0994; gemessen: 214,0990

### 5-Acetyl-2-(2-carboxy-ethyl)-benzoesäure

Man gibt Ethylendichlorid zum 1-(7-Acetyl-5,6-dihydro-naphthalen-2-yl)-ethanon (**62**) (4,5 g, 21 mmol), bis es vollständig gelöst ist. Diese Lösung tropft man zu einer eiskalten wässrigen Kaliumpermanganat-Lösung (9 g in 225 ml) und lässt 3 Stunden rühren. Nach der Zugabe von



4 g Natriumhydroxid wartet man 10 min und filtriert dann den gebildeten Braunstein ab. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure auf pH 2 fällt das Produkt als farbloser Feststoff aus und wird abfiltriert. Umkristallisation aus Wasser ergibt das reine Produkt.

(Ausbeute: 3,1 g, 13,1 mmol, 62 %)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 2,55 (t,  $J$  = 7,7 Hz, 2 H), 2,59 (s, 3 H), 3,21 (t,  $J$  = 7,7 Hz, 2 H), 7,50 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1 H), 8,03 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1 H), 8,33 (s, 1 H), 12,66 (s).

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 26,7 ( $\text{CH}_2$ ), 29,1 ( $\text{CH}_2$ ), 34,9 ( $\text{CH}_3$ ), 129,9 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 130,9 ( $\text{C}_{\text{arom}}\text{-COOH}$ ), 131,2 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 131,3 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 135,0 ( $\text{CH}_{\text{arom}}\text{-COCH}_3$ ), 147,1 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 168,0 (COOH), 173,5 (COOH), 197,0 (C=O).

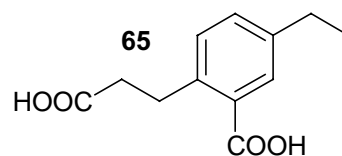
IR (KBr):  $\nu$  = 3079, 3000, 2931, 1717, 1695, 1656, 1603, 1429, 1359, 1289, 1193, 1071, 835, 660  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (70 eV);  $m/z$  (%): 236 (11) [ $\text{M}^+$ ], 221 (56), 218 (82), 203 (21), 190 (97), 175 (100), 147 (21), 91 (34), 77 (33), 65 (17).

HR MS [ $\text{M}^+$ ]: berech. 236,0685; gemessen: 236,0688.

### 2-(2-Carboxy-ethyl)-5-ethyl-benzoesäure

Eine Mischung aus **64** (3 g, 12,7 mmol), Hydrazinhydrat (98 %, 2 ml), fein gepulvertem Kaliumhydroxid (3 g) und Triethylenglycol (75 ml) wurde 2 Stunden refluxiert. Hydrazin und Wasser werden durch Destillation



entfernt, bis die Temperatur der Reaktionsmischung bei 195 °C bleibt. Diese Temperatur wird für weitere 4 Stunden gehalten. Nachdem die Reaktionsmischung

auf r.t. abgekühlt ist, gibt man das gleiche Volumen Wasser zu und säuert mit wenig konzentrierter Salzsäure an. Das Produkt wird mit Diethylether extrahiert. Nach Umkristallisation aus Wasser erhält man das reine Produkt als farblosen Feststoff (Fp 174 °C).

(Ausbeute: 2,5 g, 11,3 mmol, 89 %)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,17 (t, J = 7,6 Hz, 3 H), 2,50 (t, J = 7,8 Hz, 2 H), 2,60 (q, J = 7,6 Hz, 2 H), 3,11 (t, J = 7,8 Hz, 2 H), 7,25 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,31 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,65 (s, 1H), 12,45 (s).

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 15,4 ( $\text{CH}_3$ ), 27,5 ( $\text{CH}_2$ ), 28,8 ( $\text{CH}_2$ ), 35,4 ( $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ), 129,5 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 130,3 ( $\text{C}_{\text{arom-COOH}}$ ), 130,8 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 131,2 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 139,1 ( $\text{CH}_{\text{arom-C}_2\text{H}_5}$ ), 141,7 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 168,8 ( $\text{COOH}$ ), 173,8 ( $\text{COOH}$ ).

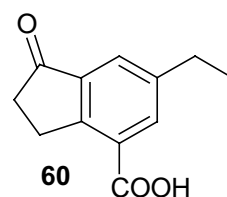
IR (KBr):  $\nu$  = 3031, 2967, 2933, 2638, 1688, 1403, 1305, 1275, 1211, 907, 828  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (70 eV):  $m/z$  (%): 222 (3) [ $\text{M}^+$ ], 204 (29), 176 (100), 159 (16), 148 (9).

HR MS [ $\text{M}^+$ ]: berech. 222,0892; gemessen: 222,0885.

### 6-Ethyl-1-oxo-indan-4-carboxylic acid

2-(2-Carboxy-ethyl)-5-ethyl-benzoessäure (**65**) (1 g, 4,5 mmol) wird intensiv mit wasserfreiem Aluminiumtrichlorid (20,0 g) und Natriumchlorid (3,0 g) vermischt. Diese Mischung wird 2 Stunden auf  $\approx 160$  °C erhitzt. Die erhaltene dunkle und zähflüssige Masse wird dabei gelegentlich gerührt. Nach Abkühlen wird der Komplex mit Eiswasser (10 ml) und 6N Salzsäure (30 ml) hydrolysiert und mehrere Stunden bei r.t. gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert, intensiv mit Wasser gewaschen und getrocknet (Fp 172 °C).



(Ausbeute: 0,66 g, 3,2 mmol, 71 %).

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1,22 (t, 3 H), 2,63 (t, 2 H), 2,73 (q, 2 H), 3,32 (t, 2 H), 7,65 (s, 1 H), 8,05 (s, 1 H), 13,03 (s).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 15,3$  ( $\text{CH}_3$ ),  $26,6$  ( $\text{CH}_2$ ),  $27,4$  ( $\text{CH}_2$ ),  $36,0$  ( $\text{CH}_2\text{-CO}$ ),  $125,8$  ( $\text{C}_{\text{arom}}\text{-COOH}$ ),  $128,8$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ),  $135,8$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ),  $138,2$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}\text{-CO}$ ),  $143,6$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}\text{-C}_2\text{H}_5$ ),  $153,9$  ( $\text{C}_{\text{arom}}\text{-CH}_2$ ),  $166,9$  ( $\text{COOH}$ ),  $205,8$  ( $\text{CO}$ ).

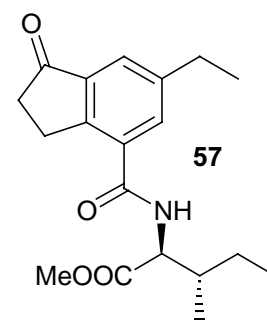
IR (KBr):  $\nu = 2966, 2931, 2871, 2579, 1715, 1675, 1581, 1432, 1303, 1234, 1124, 906, 827 \text{ cm}^{-1}$ .

MS (70 eV):  $m/z$  (%): 204 (100) [ $\text{M}^+$ ], 189 (31), 186 (24), 176 (46), 161 (29), 143 (16), 133 (27), 115 (26), 91 (16), 77 (14).

HR MS [ $\text{M}^+$ ]: berech. 204,0786; gemessen: 204,0787.

### N-(6-Ethyl-1-oxo-indane-4-carbonyl)-L-Isoleucinmethylester

Zu einer eisgekühlten und gut gerührten Lösung aus 6-Ethyl-1-oxo-indan-4-carbonsäure (**60**) (0,4 g, 1,96 mmol), L-Isoleucinmethylester Hydrochlorid (0,407 g), sym-Collidine (4,8 mmol) in trockenem DMF (25,0 ml) gibt man langsam HATU (0,49 g). Man rührt weitere 2 Stunden bei  $0^\circ\text{C}$  und dann 10 Stunden bei r.t. Eine gesättigte Lösung von Natriumhydrogencarbonat (10 ml) wird zugegeben, und man lässt weitere 10 min rühren. Das Produkt wird mit Diethylether extrahiert und der erhaltene Feststoff an Silicagel (Essigsäuremethylester : Hexane, 2:1, v/v) chromatographiert. Durch zusätzliches Umkristallisieren aus Petroleumbenzin mit 3 % Essigsäuremethylester erhält man das Produkt in hellen Kristallen (Fp  $79^\circ\text{C}$ ).



(Aubeute: 0,56 g, 1,69 mmol, 86%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0,92$  (t, 3 H),  $0,94$  (d, 3 H),  $1,21$  (t, 3 H),  $1,47$  (m),  $1,61$  (m),  $1,98$  (m),  $2,69$  (q, 2 H),  $3,30$  (m, 1 H),  $3,73$  (s, 3H),  $4,78$  (dd, 1H),  $6,50$  (d, NH),  $7,20$  (s),  $7,65$  (s).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 11,9$  ( $\text{CH}_3$ ),  $15,6$  ( $\text{CH}_3$ ),  $15,8$  ( $\text{CH}_3$ ),  $25,7$  ( $\text{CH}_2$ ),  $26,1$  ( $\text{CH}_2$ ),  $28,6$  ( $\text{CH}_2$ ),  $36,7$  (CH),  $38,5$  ( $\text{CH}_2$ ),  $52,6$  ( $\text{OCH}_3$ ),  $57,0$  (CH),  $125,6$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ),  $133,1$  ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ),  $133,3$  ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ),  $138,8$  ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ),  $144,6$  ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ),  $151,5$  ( $\text{C}_{\text{arom}}\text{-Et}$ ),  $167,0$  (CONH),  $172,8$  (COOMe),  $206,7$  (CO).

---

IR (KBr):	$\nu = 3335, 3312, 2965, 2923, 2872, 1756, 1738, 1701, 1659, 1585, 1525, 1298, 1196, 1150, 983, 831 \text{ cm}^{-1}$ .
MS (70 eV)	$m/z$ (%): 331 (21) [M <sup>+</sup> ], 299 (2), 272 (15), 243 (3), 203 (16), 187 (100), 186 (52), 159 (13), 131 (5), 115 (8), 91 (8), 71 (7), 57 (11).
HR MS [M <sup>+</sup> ]:	berech. 331,1784; gemessen: 331,1785.
Kristalldaten:	$\text{C}_{19} \text{H}_{25} \text{N O}_4$ , $M_r = 331,40 \text{ g mol}^{-1}$ , farblose Prisme, Größe $0,18 \times 0,12 \times 0,10 \text{ mm}^3$ , monoklin, Raumgruppe $P2_1$ , $a = 8,7528(4)$ , $b = 22,2904(9)$ , $c = 10,0250(3) \text{ \AA}$ , $\beta = 115,620(2)^\circ$ , $V = 1763,6(1) \text{ \AA}^3$ ; $T = -90 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $Z = 4$ , $\rho_{\text{berech.}} = 1,248 \text{ g cm}^{-3}$ ; $\mu (\text{Mo-K}\alpha) = 0,87 \text{ cm}^{-1}$ ; $F(000) = 712$ ; 6577 Reflexe in $h(-11/11)$ , $k(-26/28)$ , $l(-11/11)$ ; gemessen im Winkel $3,77^\circ \leq \Theta \leq 27,50^\circ$ , Vollständigkeit $\Theta_{\text{max}} = 95,7 \%$ ; 6577 symmetrie-unabhängige Reflexe; 5495 Reflexe mit $F_o > 4\sigma(F_o)$ ; 441 Parameter; 1 restraints; $R1_{\text{obs}} = 0,057$ ; $wR^2_{\text{obs}} = 0,102$ ; $R1_{\text{all}} = 0,075$ ; $wR^2_{\text{all}} = 0,108$ ; GOOF = 1,049; Flack-Parameter 0,2(9); largest difference peak and hole: 0,171 / -0,191 e $\text{\AA}^{-3}$ .

Weitere Details der Kristallstrukturuntersuchung sind beim Cambridge Crystallographic Data Centre unter der Nummer CCSD-150134 hinterlegt.<sup>90</sup>



---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Stahl E. *Pflanzen und Schnecken: Eine biologische Studie über Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfrass*. Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaften und Medizin **1888** 12(15).
2. Ehrlich P.R., Raven R.H. *Butterflies and plants: a study in coevolution*. *Evolution* **1964** 18:586-608.
3. Fowden L. *Amino acids. Occurrence, biosynthesis and analogue behavior in plants*. In: Sunderland N., editor. *Perspectives in Experimental Biology*. Volume 2. Oxford: Pergamon Press; **1976**. p 263-272.
4. Bell A.A. *4-Hydroxybenzaldehyde and Vanillin as Toxins Formed in Leaf Wound Sap of Phaseolus lunatus*. *Phytopathology* **1970** 60:161-165.
5. Hoffmann F. *Senföle*. *ChiuZ* **1978** 12:182-188.
6. Müller K.O., Börger H. *Arb. biol. Abt. (Ansl. Reichsanst.)*. Volume 23. Berlin; **1941**. p 189-231.
7. Cruickshank I.A.M., Perrin D.R. *Pathological Function of Phenolic Compounds in Plants*. In: Harborne J.B., editor. *Biochemistry of Phenolic Compounds*. London: Academic Press; **1964**. p 511-544.
8. Grisebach H., Ebel J. *Phytoalexins, Chemical Defense Substances of Higher-Plants*. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **1978** 17(9):635-647.
9. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Pathologists; **2000**. 1367 p.
10. Wamhoff H., Richardt G., Schneider V., Tulke A. *Wein und Gesundheit*. *ChiuZ* **1998** 32(2):87-93.
11. Halitschke R., Kessler A., Kahl J., Lorenz A., Baldwin I.T. *Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **2000** 124(3):408-417.
12. Reichardt P.B., Bryant J.P., Clausen T.P., Wieland G.D. *Defense of Winter-Dormant Alaska Paper Birch against Snowshoe Hares*. *Oecologia* **1984** 65(1):58-69.
13. Dicke M., Sabelis M.W., Takabayashi J., Bruin J., Posthumus M.A. *Plant Strategies of Manipulating Predator-Prey Interactions Through Allelochemicals - Prospects For Application in Pest- Control*. *J. Chem. Ecol.* **1990** 16(11):3091-3118.

14. De Moraes C.M., Mescher M.C. *Interactions in entomology: Plant-parasitoid interaction in tritrophic systems*. J. Entomol. Sci. **1999** 34(1):31-39.
15. Pare P.W., Alborn H.T., Tumlinson J.H. *Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1998** 95(23):13971-13975.
16. Vick B.A., Zimmerman D.C. *Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant-Species*. Plant Physiol. **1984** 75(2):458-461.
17. Weiler E.W., Albrecht T., Groth B., Xia Z.Q., Luxem M., Liss H., Andert L., Spengler P. *Evidence For the Involvement of Jasmonates and Their Octadecanoid Precursors in the Tendril Coiling Response of Bryonia-Dioica*. Phytochemistry **1993** 32(3):591-600.
18. Beale M.H., Ward J.L. *Jasmonates: key players in the plant defence*. Nat. Prod. Rep. **1998** 15(6):533-548.
19. Creelman R.A., Mullet J.E. *Biosynthesis and action of jasmonates in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. **1997** 48:355-381.
20. Wasternack C., Miersch O., Kramell R., Hause B., Ward J., Beale M., Boland W., Parthier B., Feussner I. *Jasmonic Acid - Biosynthesis, Signal Transduction, Gene Expression*. Fett-Lipid **1998** 100(4-5):139-146.
21. Ecker J.R. *The Ethylene Signal-Transduction Pathway in Plants*. Science **1995** 268(5211):667-675.
22. Heldt H.-W. *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl.; **1996**.
23. Lewis N.G., Yamamoto E. *Lignin - Occurrence, Biogenesis and Biodegradation*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. **1990** 41:455-496.
24. Smith J.A., Hammerschmidt R., Fulbright D.W. *Rapid Induction of Systemic Resistance in Cucumber By Pseudomonas-Syringae-Pv-Syringae*. Physiol. Mol. Plant Pathol. **1991** 38(3):223-235.
25. Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. *Elicitor-Induced and Wound-Induced Oxidative Cross-Linking of a Proline-Rich Plant-Cell Wall Protein - a Novel, Rapid Defense Response*. Cell **1992** 70(1):21-30.
26. Lamb C., Dixon R.A. *The oxidative burst in plant disease resistance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. **1997** 48:251-275.
27. Durner J., Shah J., Klessig D.F. *Salicylic acid and disease resistance in plants*. Trends Plant Sci. **1997** 2(7):266-274.

- 
28. Dunleavy J. *Bacterial, fungal, and viral diseases affecting soybean leaves*. Wyllie T., Scott D., editors. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press; **1988**.
  29. Fahy P., Lloyd A. *Pseudomonads: The fluorescent pseudomonads*. Fahy P., Presley G., editors. Sidney: Academic Press; **1983**.
  30. Bender C.L., Liyanage H., Palmer D., Ullrich M., Young S., Mitchell R. *Characterization of the genes controlling the biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid*. *Gene* **1993** 133(1):31-38.
  31. Mitchell R.E. *Coronatine Production By Some Phytopathogenic Pseudomonads*. *Physiological Plant Pathology* **1982** 20(1):83-89.
  32. Wiebe W.L., Campbell R.N. *Characterization of Pseudomonas syringae pv. maculicola and comparison with Pseudomonas syringae tomato*. *Plant Dis.* **1993** 77(4):414-419.
  33. Bender C.L. *Chlorosis-inducing phytotoxins produced by Pseudomonas syringae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1999** 105(1):1-12.
  34. Kenyon J., Turner J.G. *Physiological Changes in Nicotiana-Tabacum Leaves During Development of Chlorosis Caused By Coronatine*. *Physiological & Molecular Plant Pathology* **1990** 37(6):463-478.
  35. Sakai R., Nishiyama K., Ichihara A., Shiraiishi K., Sakamura S. *Studies on the mechanism of physiological activity of coronatine: Effect of coronatine on cell wall extensibility and expansion of potato tuber tissue*. **1979** 45:645-653.
  36. Sakai R. *Comparison of physiological activities between coronatine and indole-3-acetic acid to some plant tissues*. **1980** 46:499-503.
  37. Mino Y., Matsushita Y., Sakai R. *Effect of Coronatine On Stomatal Opening in Leaves of Broadbean and Italian Ryegrass*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **1987** 53(1):53-55.
  38. Ferguson I.B., Mitchell R.E. *Stimulation of Ethylene Production in Bean Phaseolus-Vulgaris Cultivar Seminole Leaf Discs By the Pseudomonad Phytotoxin Coronatine*. *Plant Physiol.* **1985** 77(4):969-973.
  39. Kenyon J.S., Turner J.G. *The Stimulation of Ethylene Synthesis in Nicotiana-Tabacum Leaves By the Phytotoxin Coronatine*. *Plant Physiol.* **1992** 100(1):219-224.
  40. Palmer D.A., Bender C.L. *Ultrastructure of Tomato Leaf Tissue Treated With the Pseudomonad Phytotoxin Coronatine and Comparison With Methyl Jasmonate*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1995** 8(5):683-692.

41. Koda Y., Takahashi K., Kikuta Y., Greulich F., Toshima H., Ichihara A. *Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid*. *Phytochemistry* **1996** 41(1):93-96.
42. Budde I.P., Ullrich M.S. *Interactions of Pseudomonas syringae pv. glycinea with host and nonhost plants in relation to temperature and phytotoxin synthesis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2000** 13(9):951-961.
43. Boland W., Hopke J., Donath J., Nuske J., Bublitz F. *Jasmonic Acid and Coronatin Induce Odor Production in Plants*. *Angewandte Chemie International Ed in English* **1995** 34(15):1600-1602.
44. Ichihara A., Toshima H. *Coronatine: Chemistry and Biological Activities*. In: Cutler H., Cutler S., editors. *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Washington D.C.: CRC Press; **1999**. p 93-105.
45. Weiler E.W., Kutchan T.M., Gorba T., Brodschelm W., Niesel U., Bublitz F. *The Pseudomonas Phytotoxin Coronatine Mimics Octadecanoid Signaling Molecules of Higher-Plants*. *FEBS Lett.* **1994** 345(1):9-13.
46. Dittrich H., Kutchan T.M., Zenk M.H. *The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in Petroselinum crispum cell cultures*. *FEBS Lett.* **1992** 309:33-36.
47. Weiler E.W. *Octadecanoid-mediated signal transduction in higher plants*. *Naturwissenschaften* **1997** 84(8):340-349.
48. Zhang Z.P., Krumm T., Baldwin I.T. *Structural requirements of jasmonates and mimics for nicotine induction in Nicotiana glauca*. *J. Chem. Ecol.* **1997** 23(12):2777-2789.
49. Tamogami S., Kodama O. *Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (Oryza sativa L.) in the same manner as jasmonic acid*. *Phytochemistry* **2000** 54(7):689-694.
50. Bodnaryk R., Yoshihara T. *Structure-activity relationships of cyclopentane analogs of jasmonic acid for induced responses of canola seedlings, Brassica napus L.* *J. Chem. Ecol.* **1995** 21(11):1735-1743.
51. Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K. *Wounding and chemicals induce expression of the Arabidopsis thaliana gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway*. *FEBS Lett.* **1998** 437(3):281-286.

- 
52. Feys B.J.F., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G. *Arabidopsis Mutants Selected For Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male-Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen*. *Plant Cell* **1994** 6(5):751-759.
  53. Takahito Y., Hara Y.; Mitsui Petrochem ind Ltd., assignee. *Production of taxane type diterpene*. Japan patent 08205882 A. **1996**.
  54. Krumm T., Bandemer K., Boland W. *Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: Evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway*. *FEBS Lett.* **1995** 377(3):523-529.
  55. Krumm T., Boland W. *Leucine and Isoleucine Conjugates of 1-Oxo-2,3-dihydroindene-4-carboxylic Acid: Mimics of Jasmonate Type Signals and the Phytotoxin Coronatine*. *Molecules* **1996** (1):23-26.
  56. Koch T., Krumm T., Jung V., Engelberth J., Boland W. *Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway*. *Plant Physiol.* **1999** 121(1):153-162.
  57. Boland W., Engelberth J., Piel J., Jung V., Jux A., Koch T., Krumm T., Schüler G. *Induced biosynthesis of terpenoid insect semiochemicals in plants*. *Chemicke Listy* **1999** 93(Suppl S):1-69.
  58. Engelberth J., Koch T., Kühnemann F., Boland W. *Channel-forming peptaibols are potent elicitors of plant secondary metabolism and tendril coiling*. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000** 39(10):1860.
  59. Singh A., Thornton E.R., Westheimer F.H. *Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin*. *J. Biol. Chem.* **1962** 237:3006-3008.
  60. Haider G., von Schrader T., Fuesslein M., Blechert S., Kutchan T. *Structure-Activity Relationships of Synthetic Analogs of Jasmonic Acid and Coronatine on Induction of Benzo[c]phenanthridine Alkaloid Accumulation in *Eschscholzia californica* Cell Cultures*. *Biological Chemistry* **2000** 381(8):741-748.
  61. Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.Q., Zenk M.H. *The Octadecanoic Pathway - Signal Molecules For the Regulation of Secondary Pathways*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995** 92(10):4099-4105.

62. Tamogami S., Rakwal R., Kodama O. *Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (Oryza sativa L.)*. FEBS Lett. **1997** 401(2-3):239-242.
63. Krumm T. *Aminosäurekonjugate in pflanzlichen Signalschiene: Synthese und biologische Aktivität* [Dissertation]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; **1998**. 258 p.
64. Fleming S.A. *Chemical Reagents in Photoaffinity-Labeling*. Tetrahedron **1995** 51(46):12479-12520.
65. Kotzyba-Hibert F., Kapfer I., Goeldner M. *Recent Trends in Photoaffinity-Labeling*. Angew. Chem.-Int. Edit. Engl. **1995** 34(12):1296-1312.
66. Dorman G., Prestwich G.D. *Using photolabile ligands in drug discovery and development*. Trends Biotechnol. **2000** 18(2):64-77.
67. Li Y.Z., Kirby J.P., George M.W., Poliakoff M., Schuster G.B. *1,2-Didehydroazepines From the Photolysis of Substituted Aryl Azides - Analysis of Their Chemical and Physical-Properties By Time-Resolved Spectroscopic Methods*. J. Am. Chem. Soc. **1988** 110(24):8092-8098.
68. Smith R.A.G., Knowles J.R. *Preparation and Photolysis of 3-Aryl-3h-Diazirines*. J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2 **1975** (7):686-694.
69. Li P., Xu J.C. *HOBt and HOAt-derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis*. Tetrahedron Lett. **2000** 41(5):721-724.
70. Page G., Tarbell D.  *$\beta$ -(o-Carboxyphenyl)propionic acid*. Organic Synthesis **1954** 34:8-13.
71. Aono T., Araki Y., Imanishi M., Noguchi S. *1-Indancarboxylic Acids 2. Synthesis of 4-Aroyl-1-Indan- Carboxylic Acid and 6-Aroyl-1-Indan-Carboxylic Acid As Potential Anti-Inflammatory Agents*. Chem. Pharm. Bull. **1978** 26(4):1153-1161.
72. Andrews E., Harvey W. *Some compounds derived from o-2-Carboxyethylbenzoic Acid*. J. Chem. Soc. **1961**:4688-4689.
73. Blechert S., Bockelmann C., Füsslein M., Von Schrader T., Stelmach B., Niesel U., Weiler E.W. *Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendrill-coiling response of Bryonia dioica Jacq.* Planta **1999** 207(3):470-479.
74. Hause B., Demus U., Teichmann C., Parthier B., Wasternack C. *Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley*. Plant Cell Physiol. **1996** 37(5):641-649.

- 
75. Andresen I., Becker W., Schlüter K., Burges J., Parthier B., Apel K. *The Identification of Leaf Thionin as One of the Main Jasmonate-Induced Proteins of Barley (Hordeum-Vulgare)*. Plant Mol.Biol. **1992** 19(2):193-204.
76. Kramell R., Miersch O., Hause B., Ortel B., Parthier B., Wasternack C. *Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate- responsive gene expression in barley (Hordeum vulgare L.) leaves*. FEBS Lett. **1997** 414(2):197-202.
77. Mitchell R.E., Ford K.L. *Chlorosis-inducing products from Pseudomonas syringae pathovars: New N-coronafacoyl compounds*. Phytochemistry **1998** 49(6):1579-1583.
78. Greulich F., Yoshihara T., Ichihara A. *Coronatine, a bacterial phytotoxin, acts as a stereospecific analog of jasmonate type signals in tomato cells and potato tissues*. J. Plant Physiol. **1995** 147(3-4):359-366.
79. Jung M.E., Hudspeth J.P. *Total Synthesis of (+/-)-Coronafacic Acid - Use of Anionic Oxy- Cope Rearrangements On Aromatic Substrates in Synthesis*. J. Am. Chem. Soc. **1980** 102(7):2463-2464.
80. Ichihara A., Kimura R., Moriyasu K., Sakamura S. *Synthesis of (+/-)-Coronafacic Acid*. Tetrahedron Lett. **1977** (49):4331-4334.
81. Liu H.J., Llinasbrunet M. *Total Synthesis of D,L-Coronafacic Acid By an Intermolecular Diels-Alder Approach*. Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim. **1984** 62(9):1747-1750.
82. Ichihara A., Kimura R., Yamada S., Sakamura S. *Synthesis of (+/-)-Coronafacic Acid - Efficient Intramolecular Diels-Alder Reaction of Latent Diene-Dienophile Functionality Via Thermal-Reaction*. J. Am. Chem. Soc. **1980** 102(20):6353-6355.
83. Sono M., Hashimoto A., Nakashima K., Tori M. *Total synthesis of coronafacic acid through 6-endo-trig mode intramolecular cyclization of an enone-aldehyde to a hydrindanone using samarium(II) iodide*. Tetrahedron Lett. **2000** 41(26):5115-5118.
84. Nara S., Toshima H., Ichihara A. *Asymmetric total syntheses of (+)-coronafacic acid and (+)-coronatine, phytotoxins isolated from Pseudomonas syringae pathovars*. Tetrahedron **1997** 53(28):9509-9524.
85. Yates P., Bhamare N.K., Granger T., Macas T.S. *Tandem Wessely Oxidation and Intramolecular Diels-Alder Reactions .4. the Synthesis of (+/-)-Coronafacic Acid*. Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim. **1993** 71(7):995-1001.
86. Ohira S. *Total Synthesis of Racemic and Optically-Active Coronafacic Acids*. Bull. Chem. Soc. Jpn. **1984** 57(7):1902-1907.
87. Baddeley G., Wrench E., Williamson R. *Reaction of Indane and Tetralin with Excess of Acetylating Agent*. J. Chem. Soc. **1953**:2110-2115.

88. Huang-Minlon. *Reduction of Steroid Ketones and other Carbonyl Compounds by Modifies Wolff-Kishner Method*. J. Am. Chem. Soc. **1949** 71:3301-3303.
89. Speicher A., Klaus T., Eicher T. *O-(1-benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) and O-(7-aza-1-benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) - Two modern peptide coupling reagents*. J. Prakt. Chem.-Chem. Ztg. **1998** 340(6):581-583.
90. Schüler G., Görls H., Boland W. *6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine*. Eu. J. Org. Chem. **2001**:in press.
91. Gundlach H., Müller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H. *Jasmonic Acid Is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant- Cell Cultures*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1992** 89(6):2389-2393.
92. Blechert S., Bockelmann C., Brummer O., Füsslein M., Gundlach H., Haider G., Holder S., Kutchan T.M., Weiler E.W., Zenk M.H. *Structural Separation of Biological Activities of Jasmonates and Related Compounds*. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1 **1997** (23):3549-3559.
93. Engelberth J., Koch T., Schüler G., Bachmann N., Rechtenbach J., Boland W. *Ion Channel-Forming Alamethicin Is a Potent Elicitor of Volatile Biosynthesis and Tendril Coiling. Cross Talk between Jasmonate and Salicylate Signaling in Lima Bean*. Plant Physiol. **2001** 125:369-377.
94. Piel J., Boland W. *Highly Efficient and Versatile Synthesis of Isotopically Labelled 1-Deoxy-D-Xylulose*. Tetrahedron Lett. **1997** 38(36):6387-6390.
95. Penacortes H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W., Willmitzer L. *Aspirin Prevents Wound-Induced Gene-Expression in Tomato Leaves by Blocking Jasmonic Acid Biosynthesis*. Planta **1993** 191(1):123-128.
96. Laudert D., Weiler E.W. *Allene oxide synthase: a major control point in Arabidopsis thaliana octadecanoid signalling*. Plant J. **1998** 15(5):675-684.
97. Doares S.H., Narvaezvasquez J., Conconi A., Ryan C.A. *Salicylic-Acid Inhibits Synthesis of Proteinase-Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid*. Plant Physiol. **1995** 108(4):1741-1746.
98. Boland W., Hopke J., Miksch M., Piel J. *Induction of plant volatiles by herbivores and jasmonates*. Biological Chemistry Hoppe Seyler **1995** 376(SPEC. SUPPL).
99. Kar M., Feierabend J. *Changes in the Activities of Enzymes Involved in Amino-Acid-Metabolism During the Senescence of Detached Wheat Leaves*. Physiol. Plant. **1984** 62(1):39-44.



100. Lynch D.V., Sridhara S., Thompson J.E. *Lipoxygenase-Generated Hydroperoxides Account for the Nonphysiological Features of Ethylene Formation from 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid by Microsomal-Membranes of Carnations*. *Planta* **1985** 164(1):121-125.
101. Thomson J.E. *The molecular basis for membrane deterioration during senescence*. In: Nooden L.D., Leopold A.C., editors. *Senescence and Ageing in Plants*. New York: Academic Press; **1988**. p 51-83.
102. Pauls K.P., Thompson J.E. *Evidence for the Accumulation of Peroxidized Lipids in Membranes of Senescing Cotyledons*. *Plant Physiol.* **1984** 75(4):1152-1157.
103. Bhattacharjee S. *Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in Amaranthus as affected by lead and cadmium*. *Biol. Plant.* **1998** 40(1):131-135.
104. Somashekaraiah B.V., Padmaja K., Prasad A.R.K. *Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (Phaseolus-Vulgaris) - Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation*. *Physiol. Plant.* **1992** 85(1):85-89.
105. Mishra A., Choudhuri M.A. *Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice*. *Biol. Plant.* **1999** 42(3):409-415.
106. Mukherjee P.S., Karnes H.T. *Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: A review*. *Biomed. Chromatogr.* **1996** 10(5):193-204.
107. Ichinose N., Abe S., Akishige Y., Yoshimura H., Adachi K. *Fluorescence High-Performance Liquid-Chromatography of Arachidonic, Eicosapentaenoic and Some Other Higher Fatty-Acids in Ovary of Several Fishes*. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* **1987** 329(1):47-49.
108. Pan L., Adams M., Pawliszyn J. *Determination of Fatty-Acids Using Solid-Phase Microextraction*. *Anal. Chem.* **1995** 67(23):4396-4403.
109. Cosio E.G., Frey T., Ebel J. *Identification of a High-Affinity Binding-Protein For a Hepta- Beta-Glucoside Phytoalexin Elicitor in Soybean*. *European Journal of Biochemistry* **1992** 204(3):1115-1123.
110. Mithöfer A., Daxberger A., Fromhold-Treu D., Ebel J. *Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean*. *Phytochemistry* **1997** 45(6):1101-1107.

111. Kitagawa I., Chen W.Z., Hori K., Kobayashi M., Ren J.L. *Chemical studies of Chinese licorice-roots. II. Five new flavonoid constituents from the roots of Glycyrrhiza aspera Pall. collected in Xinjiang.* Chem. Pharm. Bull. **1998** 46(10):1511-1517.
112. Gajewski J.J., Peterson K.B., Kagel J.R., Huang Y.C.J. *Transition-State Structure Variation in the Diels-Alder Reaction From Secondary Deuterium Kinetic Isotope Effects - the Reaction of Nearly Symmetrical Dienes and Dienophiles Is Nearly Synchronous.* J. Am. Chem. Soc. **1989** 111(25):9078-9081.
113. Palmer D.A., Bender C.L. *Effects of Environmental and Nutritional Factors On Production of the Polyketide Phytotoxin Coronatine By Pseudomonas-Syringae Pp Glycinea.* Appl. Environ. Microbiol. **1993** 59(5):1619-1626.
114. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.* J. Lab. Clin. Med. **1954** 44:301-307.
115. Mitchell R.E. *A Naturally-Occurring Structural Analog of the Phytotoxin Coronatine.* Phytochemistry **1984** 23(4):791-793.
116. Donath J., Boland W. *Biosynthesis of Acyclic Homoterpenes - Enzyme Selectivity and Absolute Configuration of the Nerolidol Precursor.* Phytochemistry **1995** 39(4):785-790.

# 7 Anhang

## 7.1 Abkürzungen

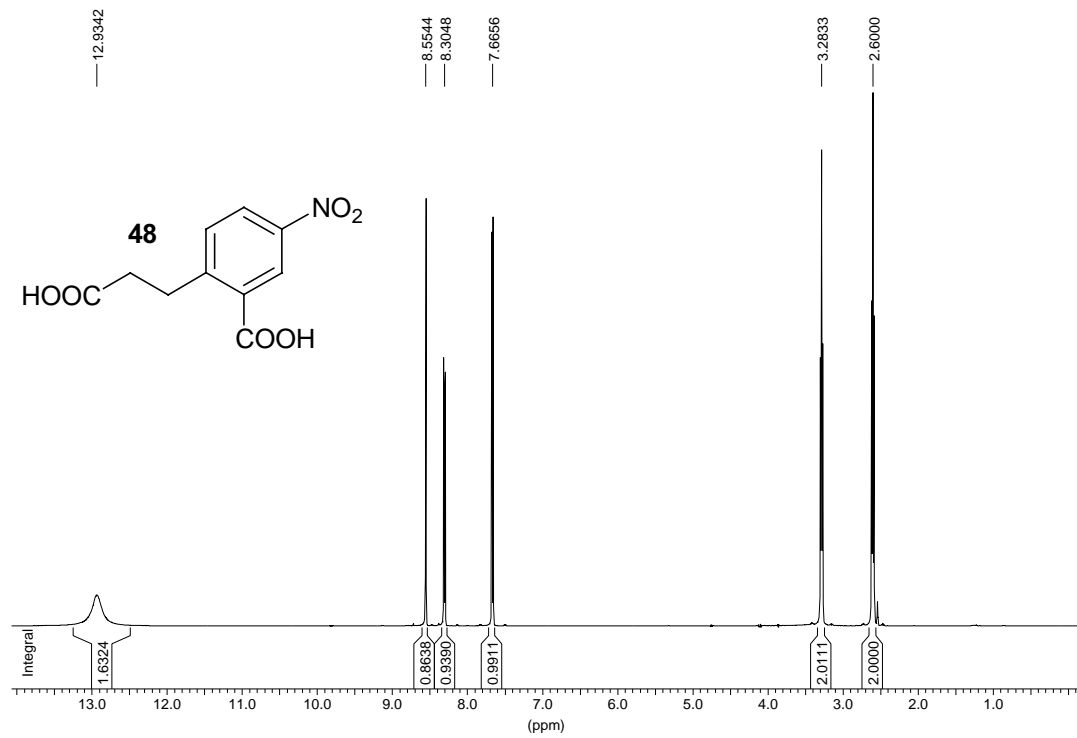
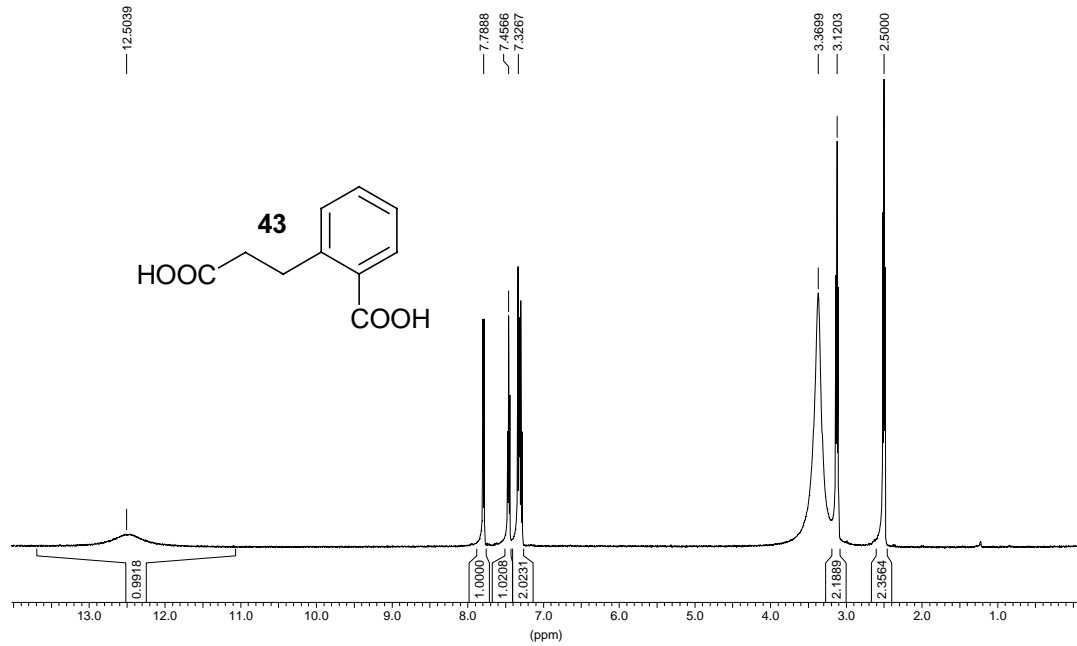
$\mu\text{M}$	micromolar (Mikromol pro Liter)	Lsg.	Lösung
		MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
ABA	Abscisinsäure		
Abb.	Abbildung	MeJA	Jasmonsäuremethylester
Ac	Acetyl	MeSA	Salicylsäuremethylester
AcCl	Acetylchlorid	min	Minuten
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin)	mM	millimolar (Millimol pro Liter)
Az	Azido-	MS	Massenspektroskopie
CFA	Coronafacinsäure	nm	Nanometer
CMA	Coronamsäure	nM	nanomolar (Nanomol pro Liter)
COR	Coronatin		
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	NMR	Kernresonanzspektroskopie
DMSO	Dimethylsulfoxid	NMR	magnetische Kernresonanz
EE	Ethylacetat		
Et	Ethyl	OPDA	12-Oxophytodiensäure
Fp.	Schmelzpunkt	PE	Petroleumbenzin (40/60)
GC	Gaschromatographie		
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer	PIN	Proteinaseinhibitor
		PR	pathogenesis-related
h	Stunde(n)	pv.	Pathovar
HR	hypersensitive Reaktion	RNA	Ribonucleinsäure
<i>i. vac.</i>	im Vakuum	RP	<i>reversed phase</i>
Ile	Isoleucin	RT	Raumtemperatur
IleMe	Isoleucinmethylester	SA	Salicylsäure
Ind	Indanoyl-	SAR	systemisch erworbene Resistenz
JA	Jasmonsäure		
LOX	Lipoxygenase	SIM	<i>single ion mode</i>

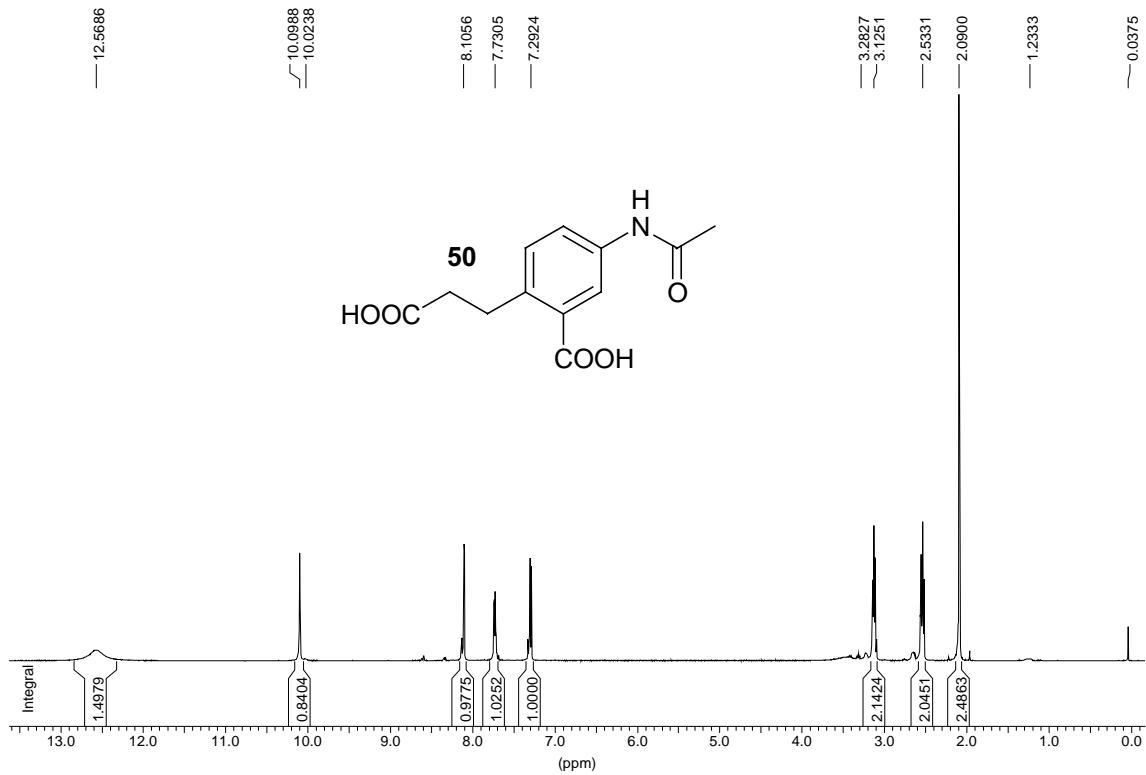
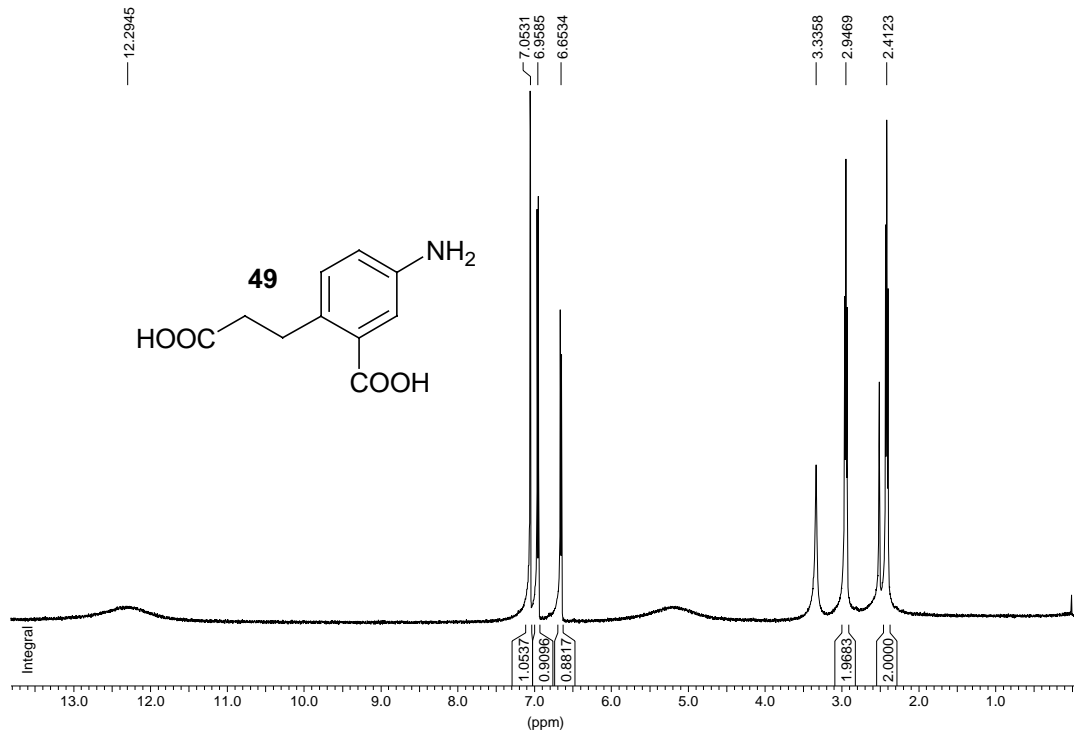
---

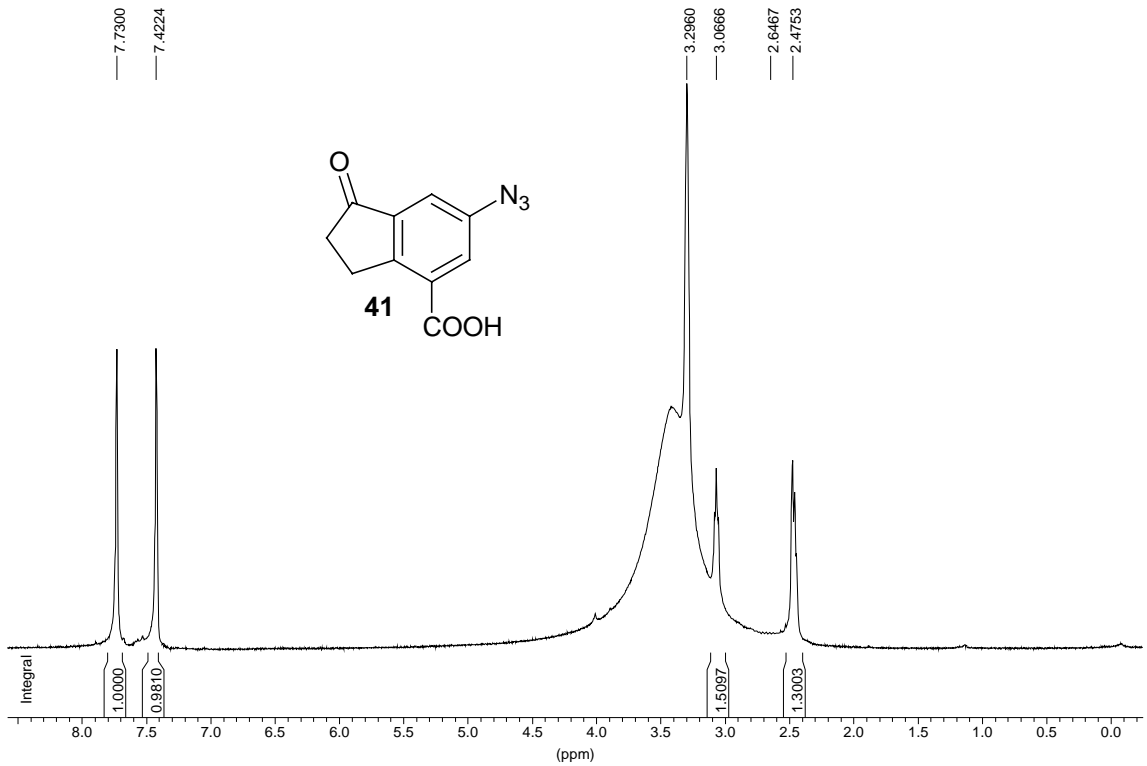
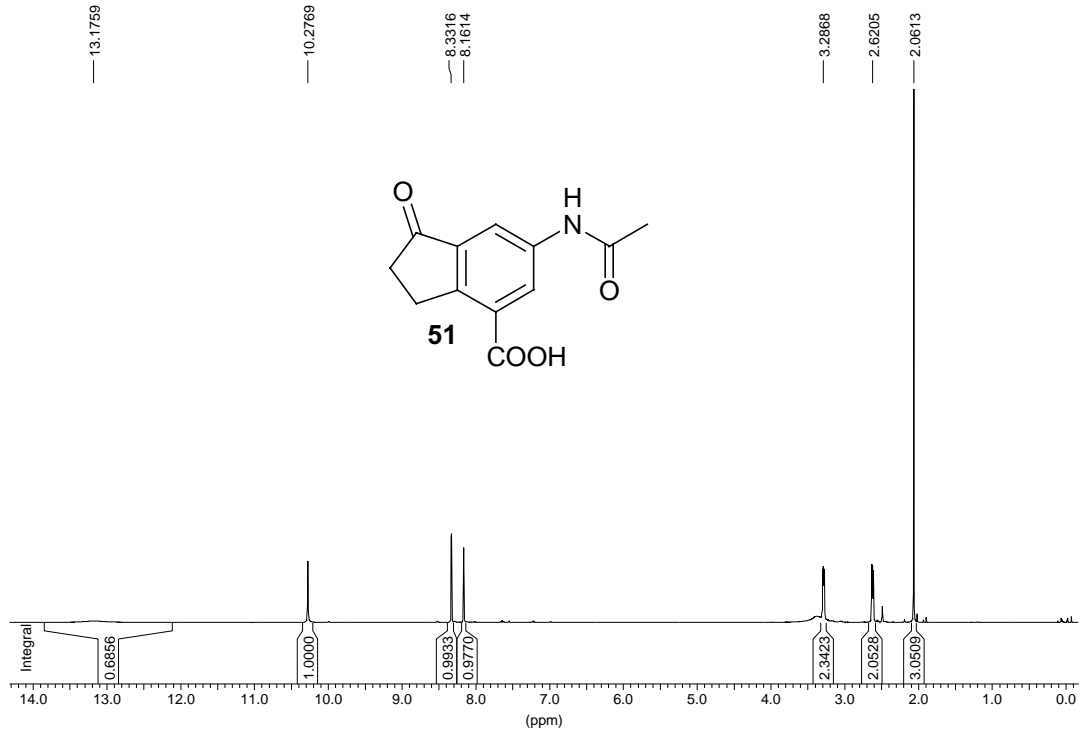
THF	Tetrahydrofuran	ToF	<i>time of flight</i>
tRNA	Transfer-RNA		
WT	Wildtyp	d	Dublett
JIP	<i>jasmonate induced protein</i>	m	Multipllett
IAA	Auxin (Indol-3'-essig- säure)	s t	Singulett Tripllett

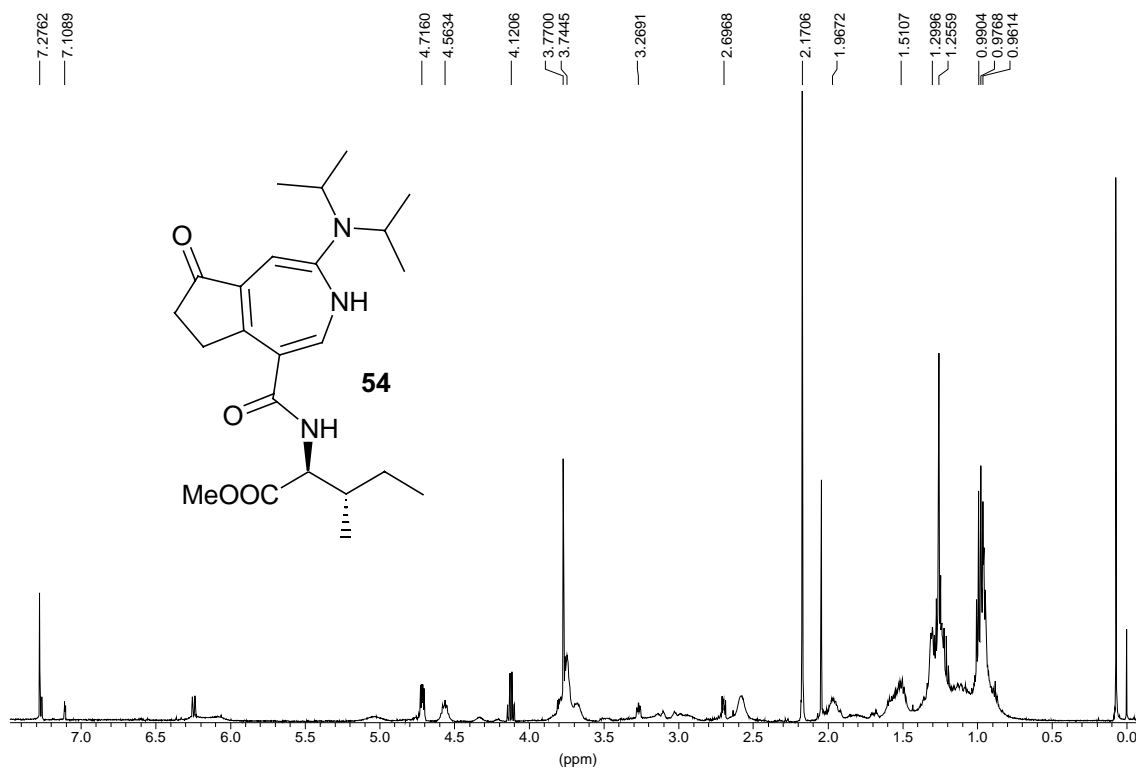
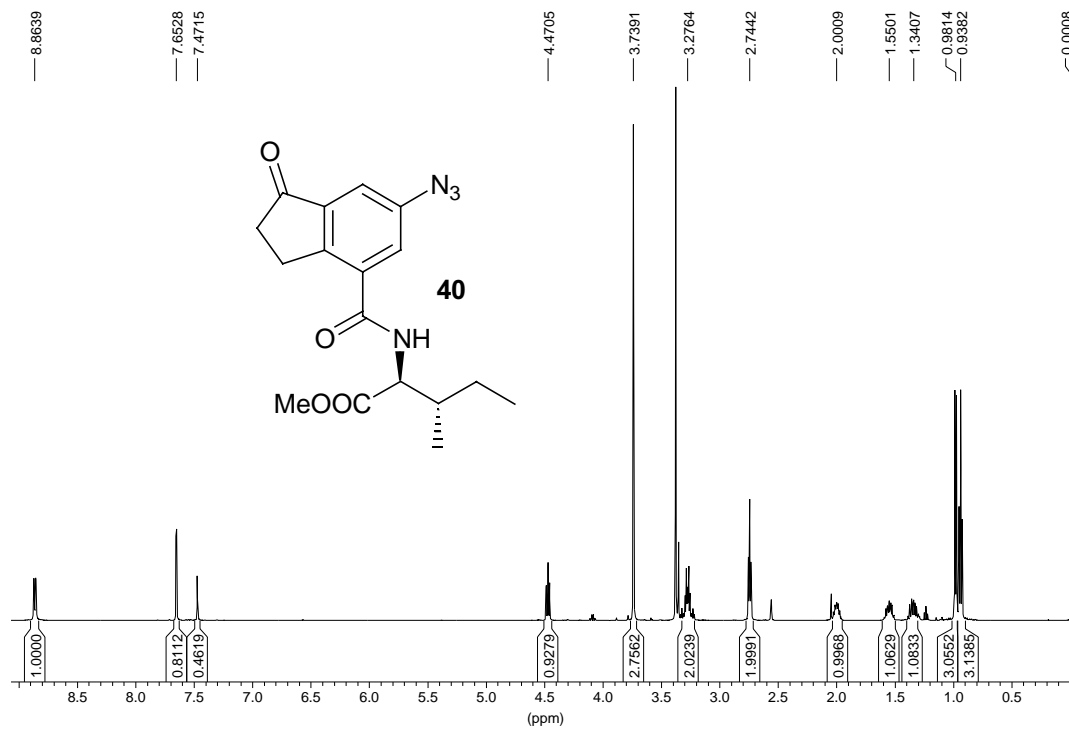
## 7.2 Spektren

### 7.2.1 $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

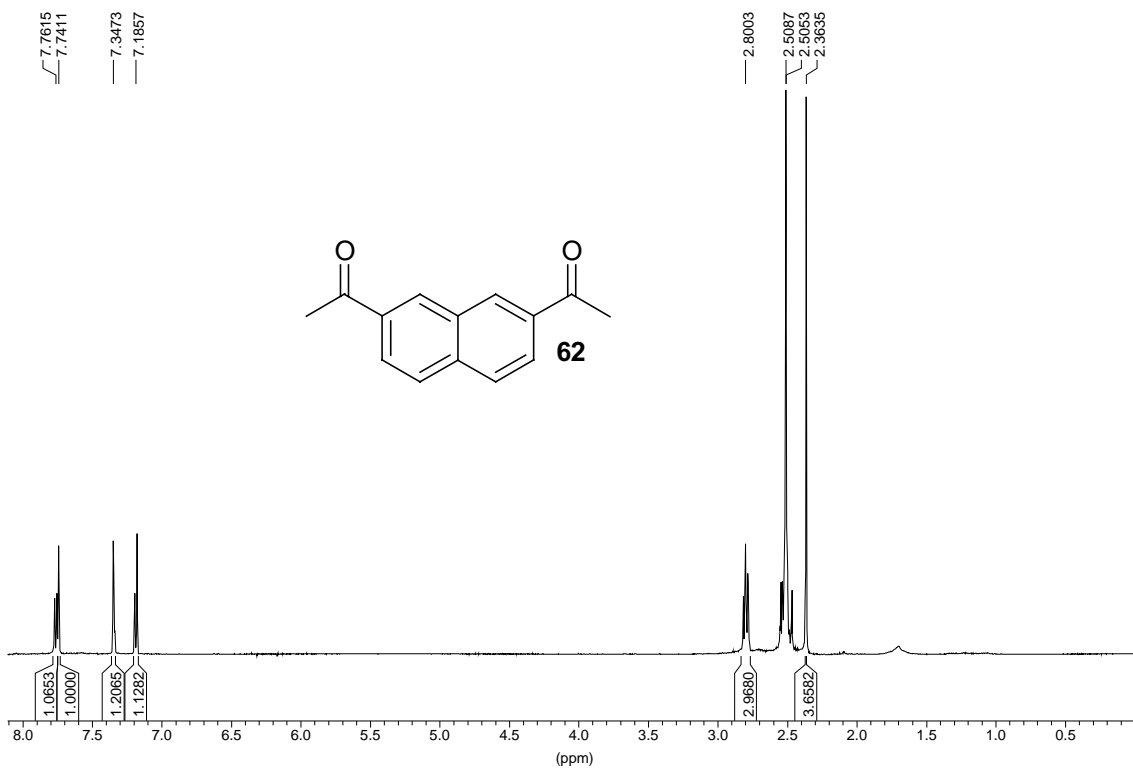
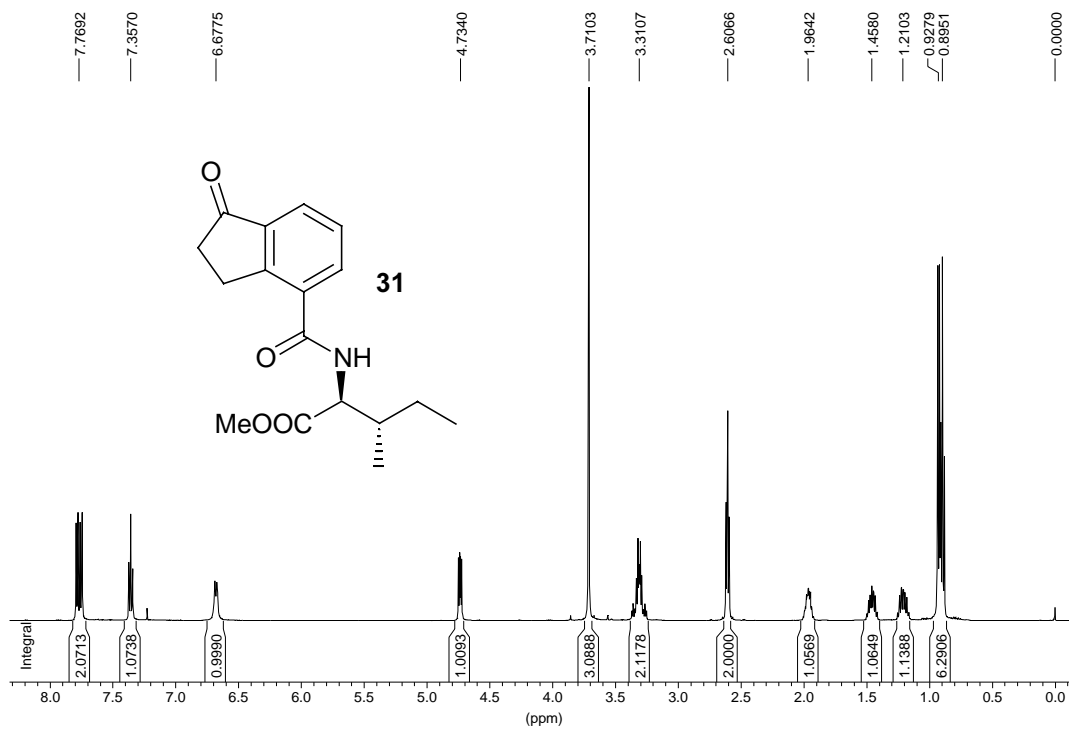


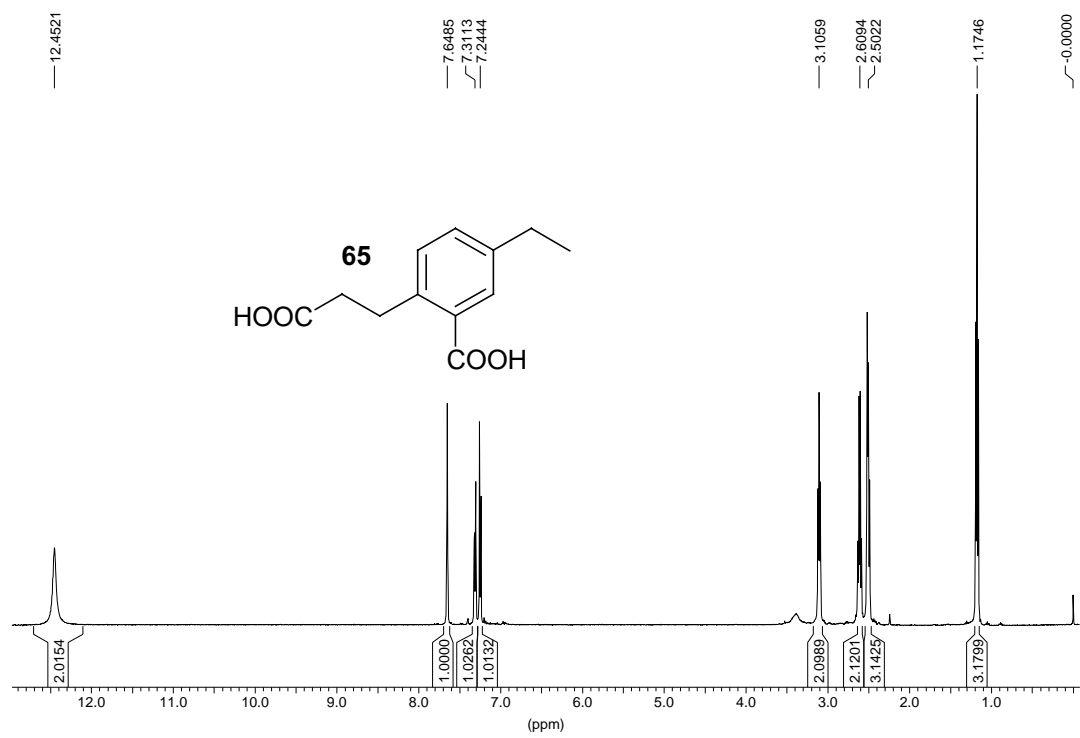
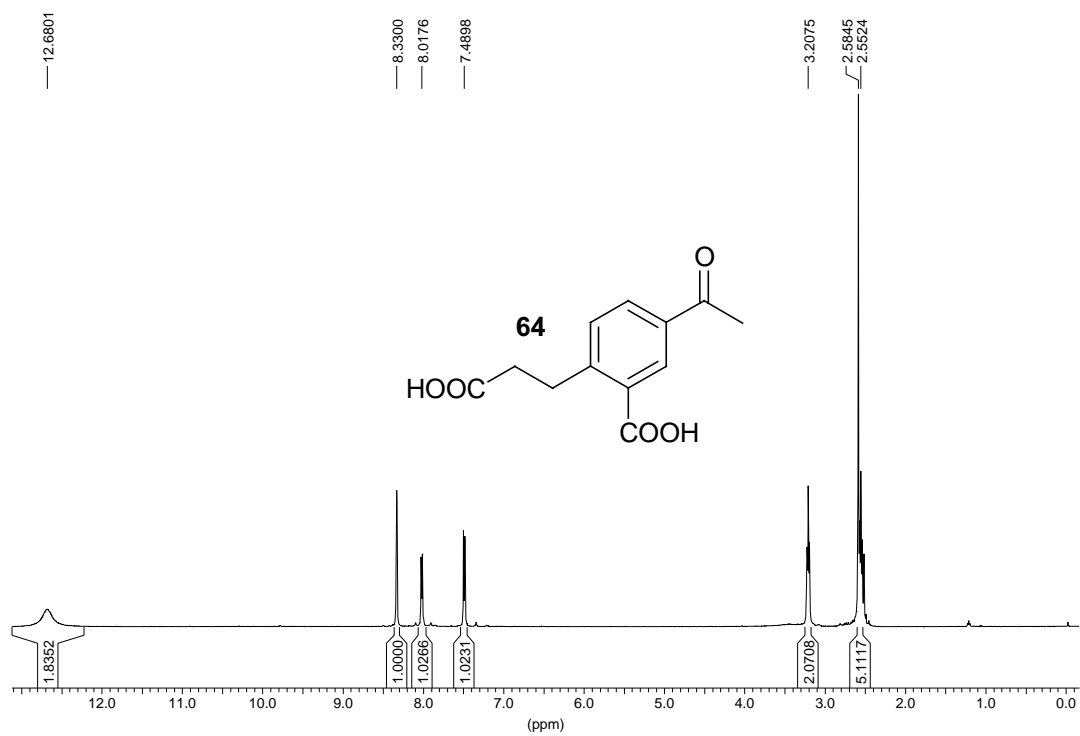


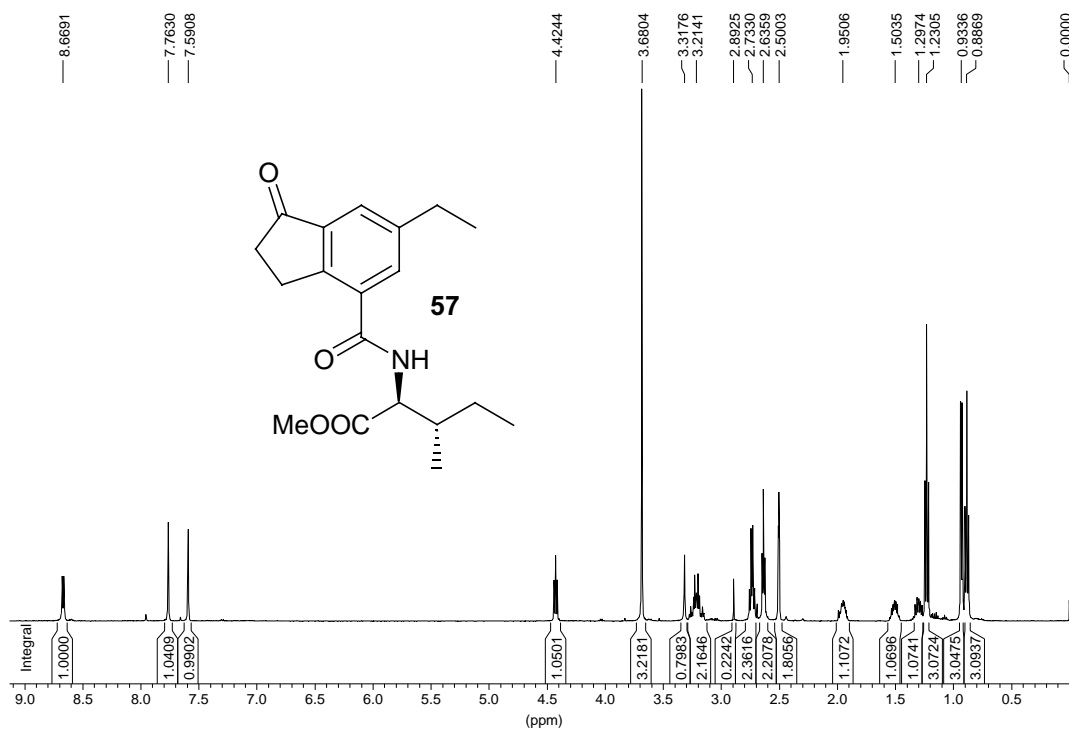
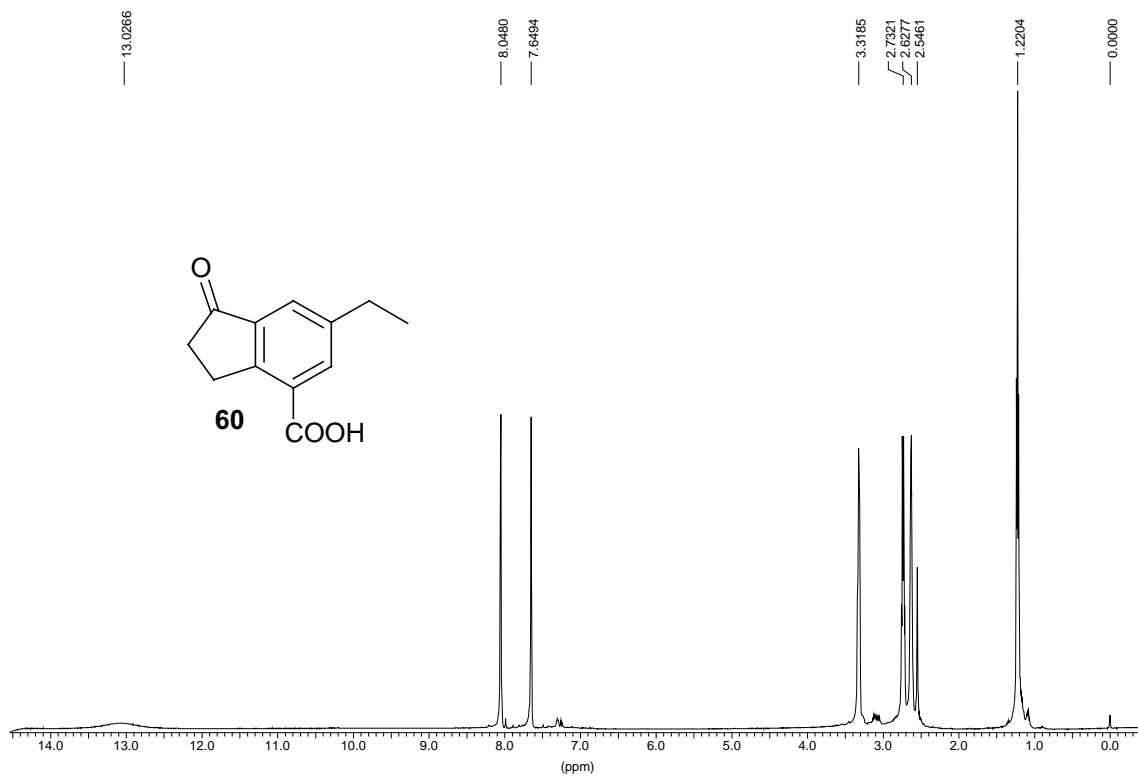


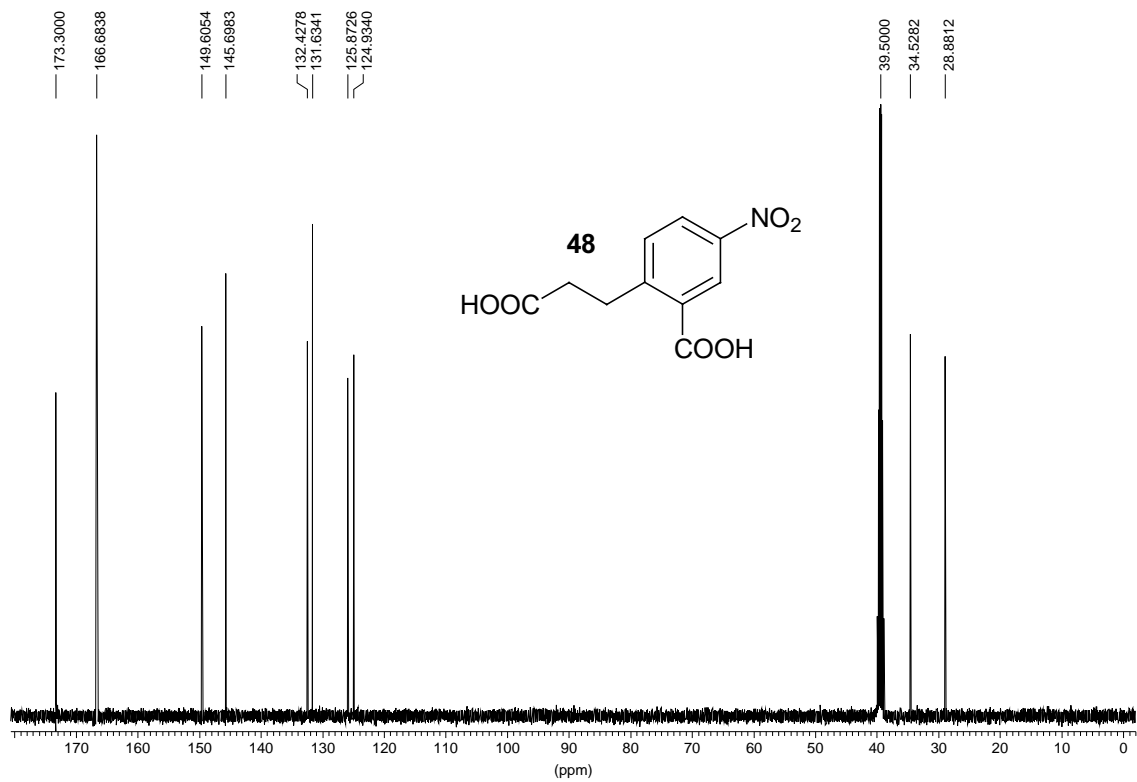
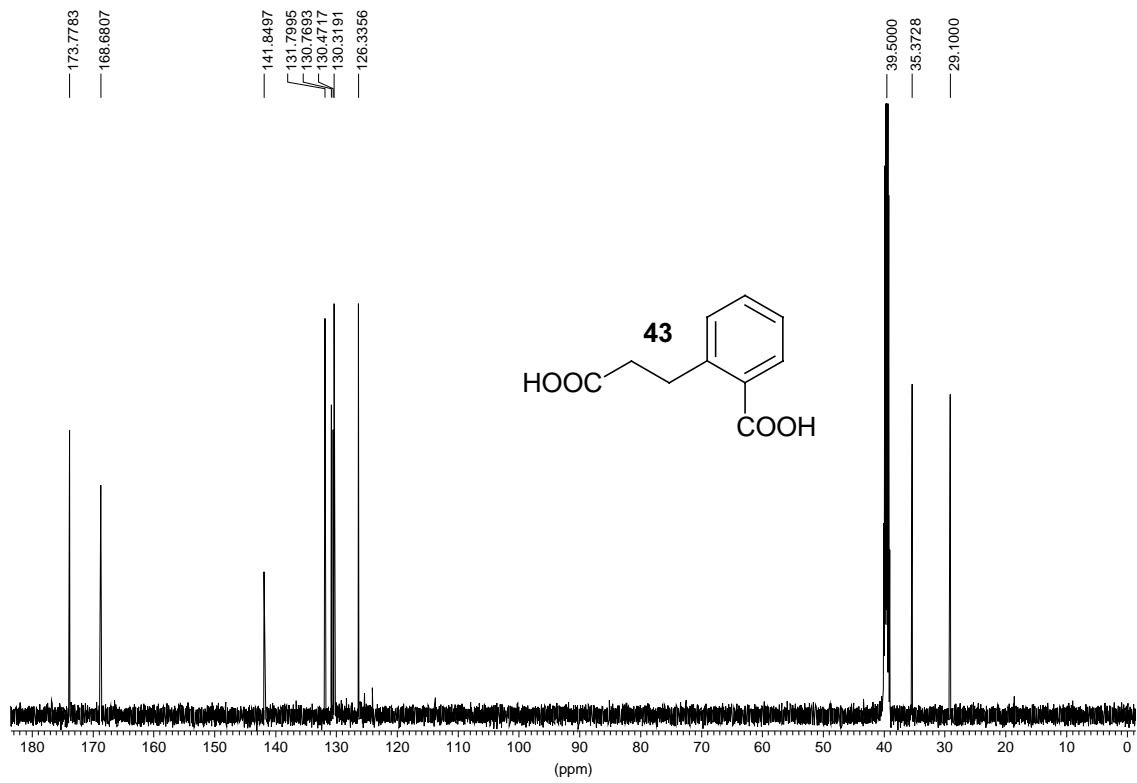


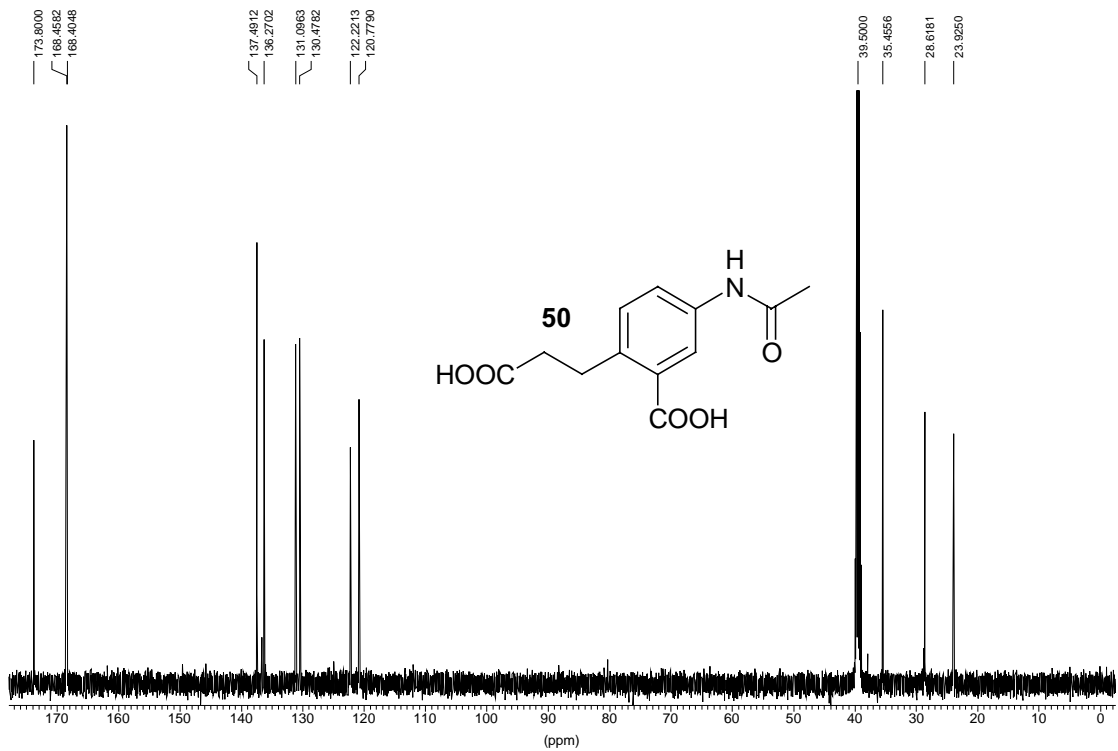
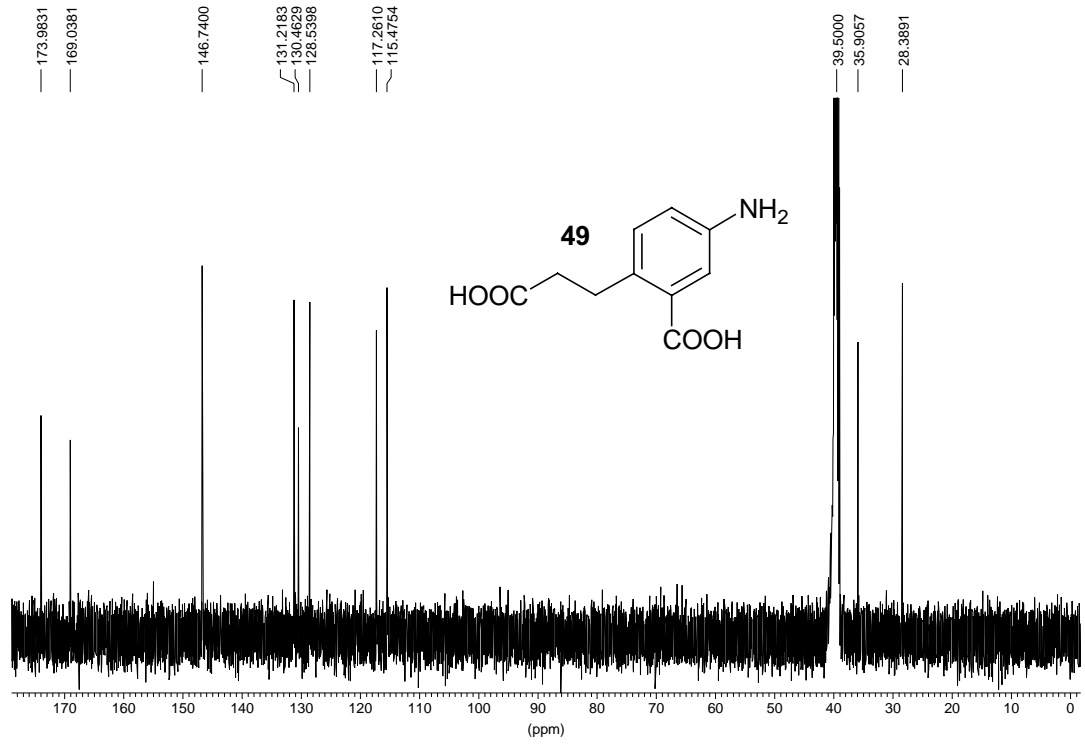


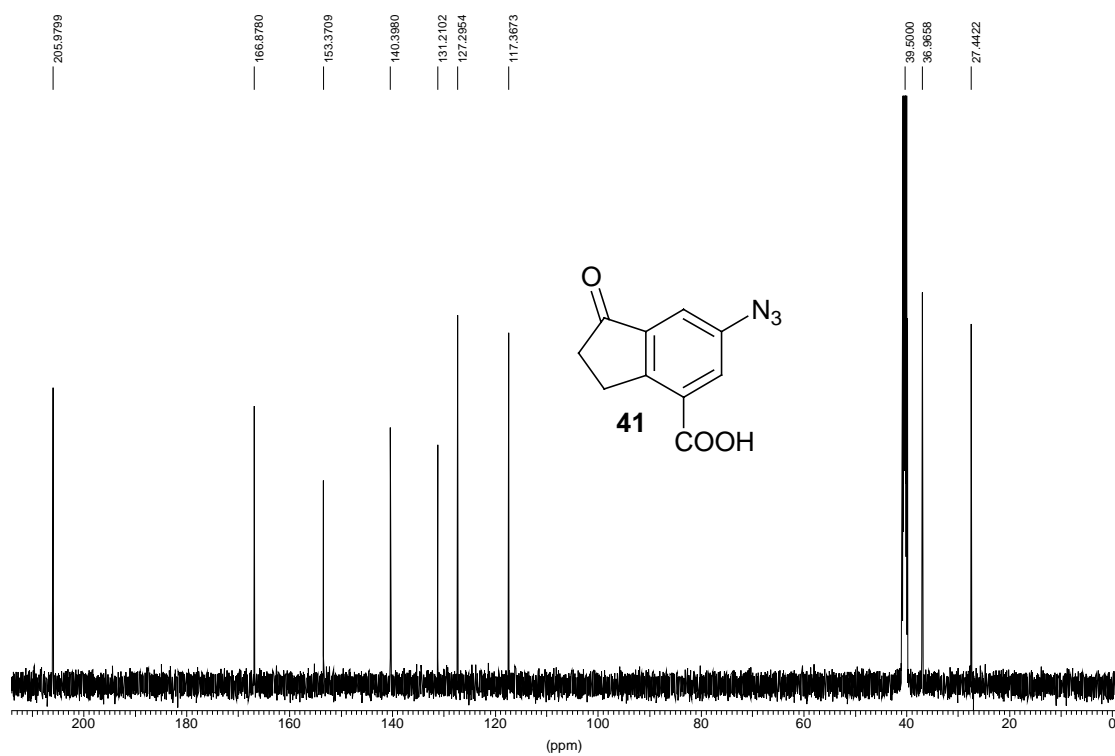
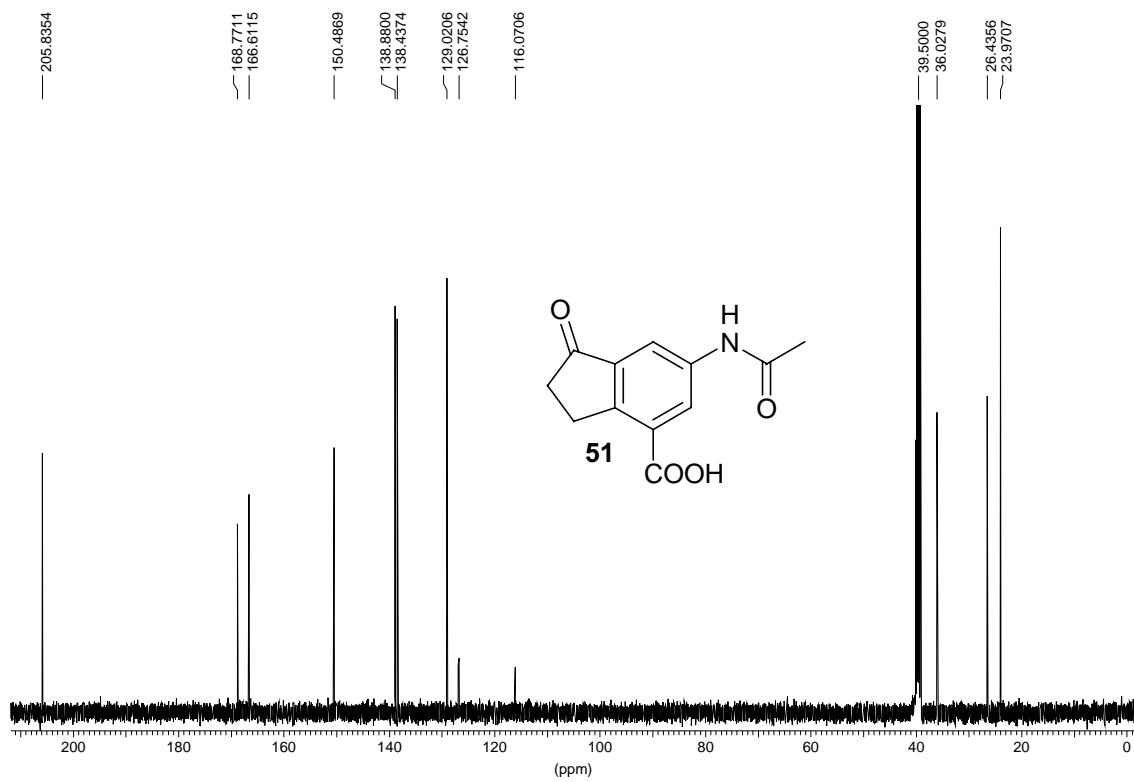


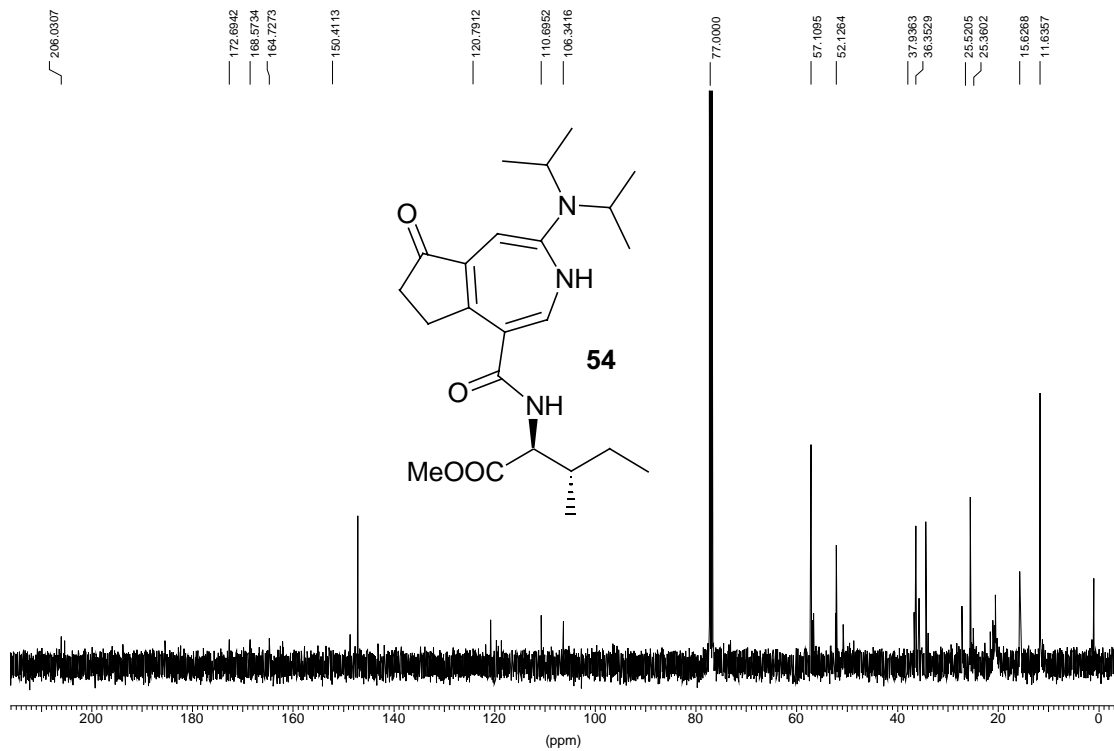
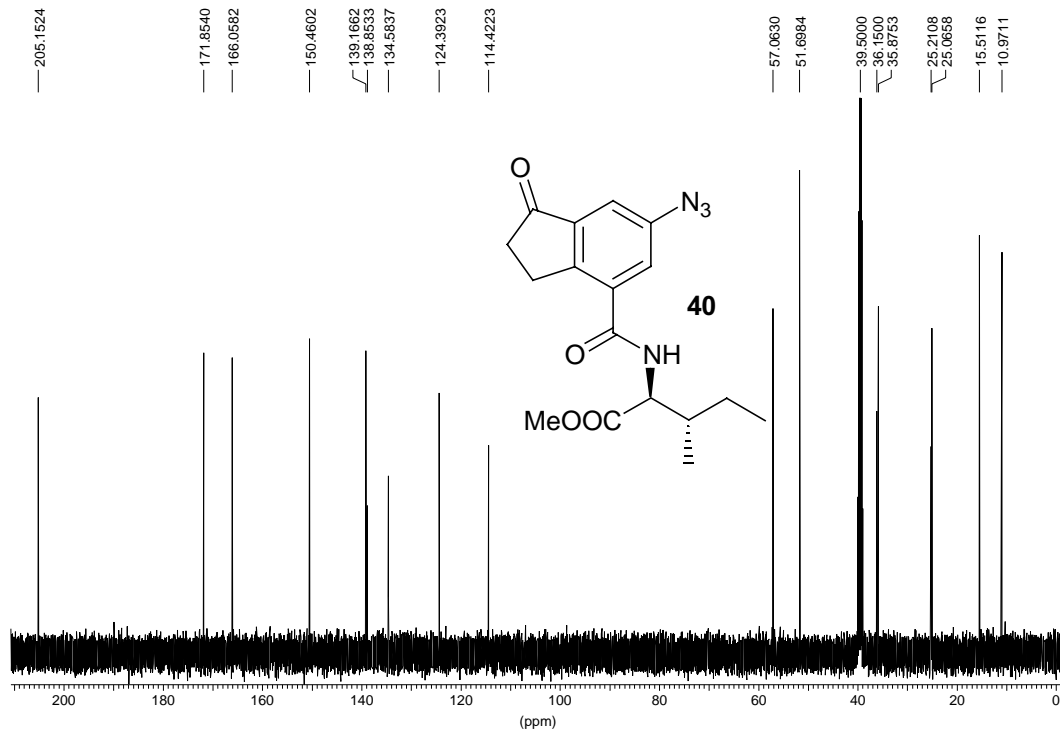


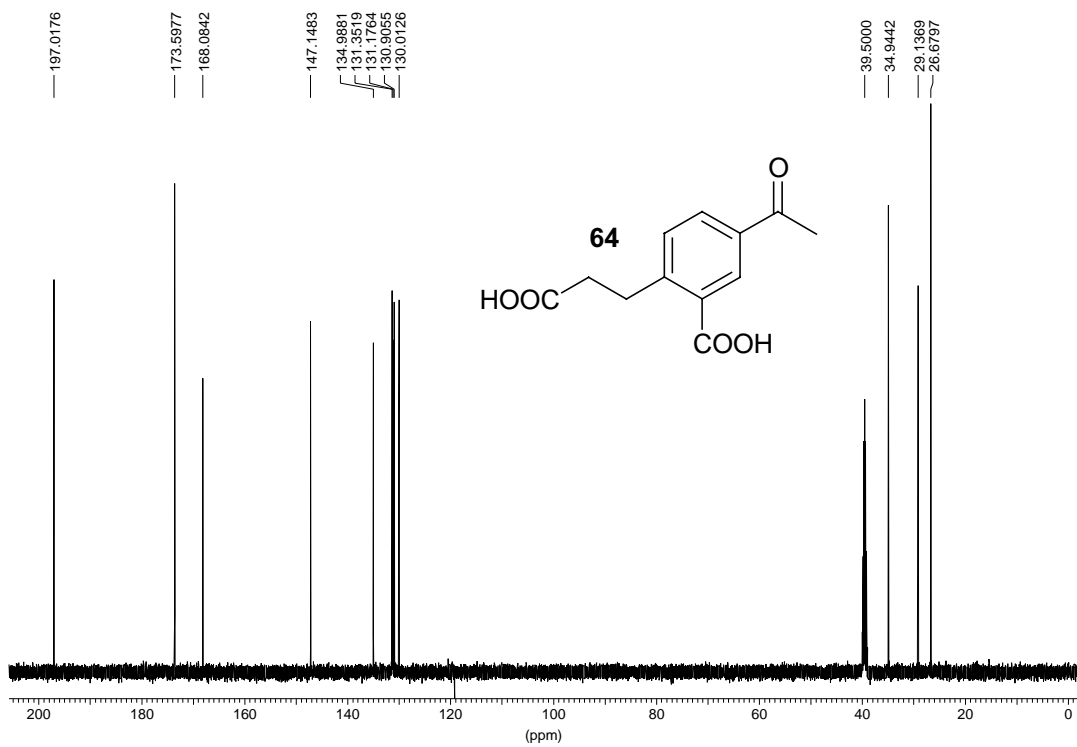
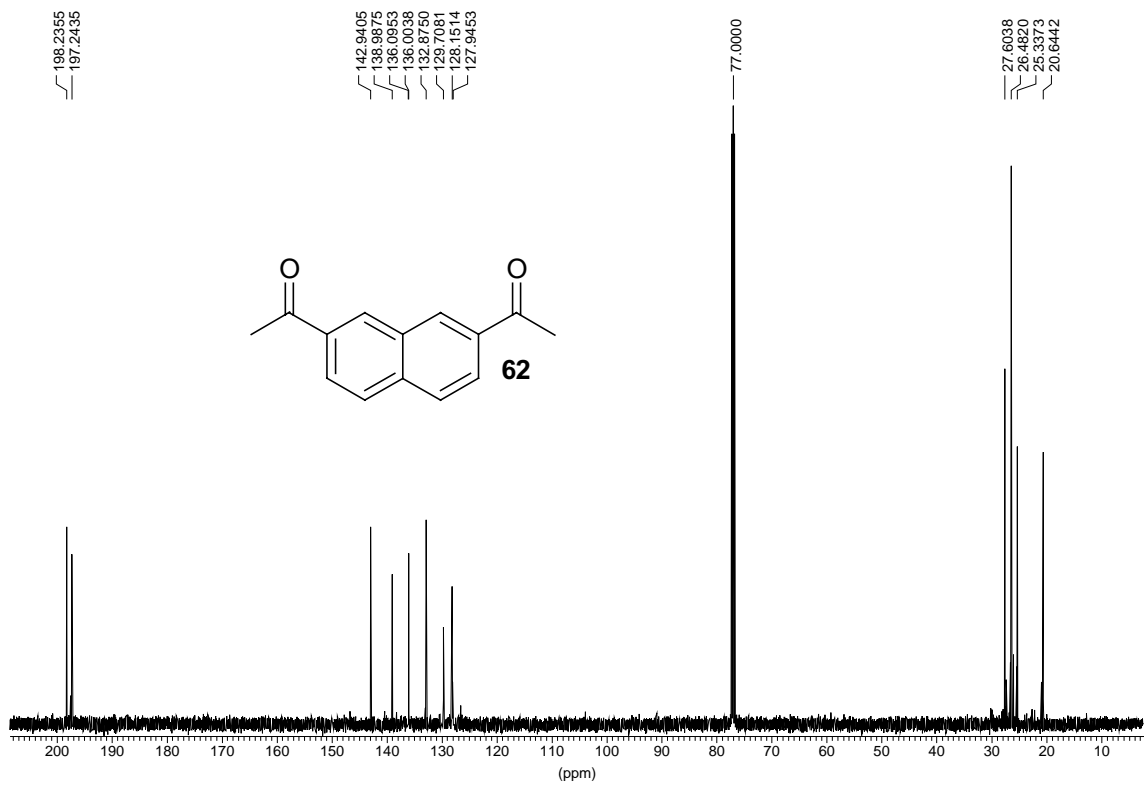


7.2.2  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

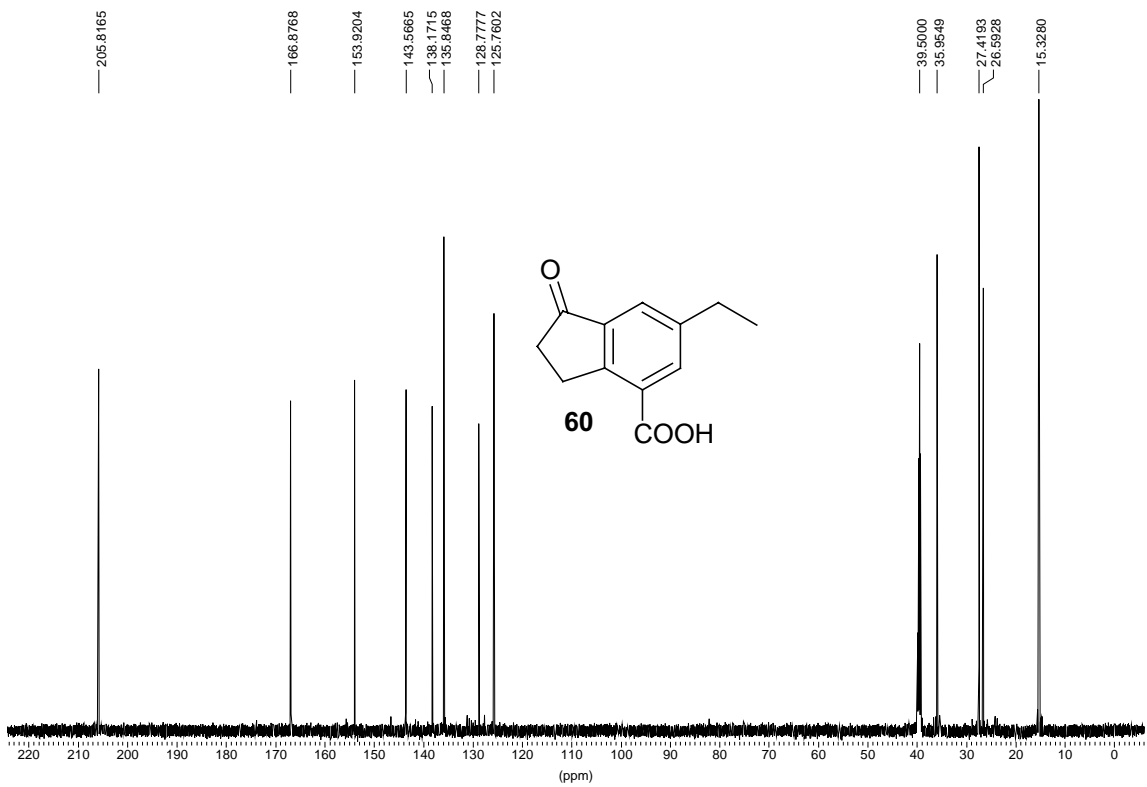
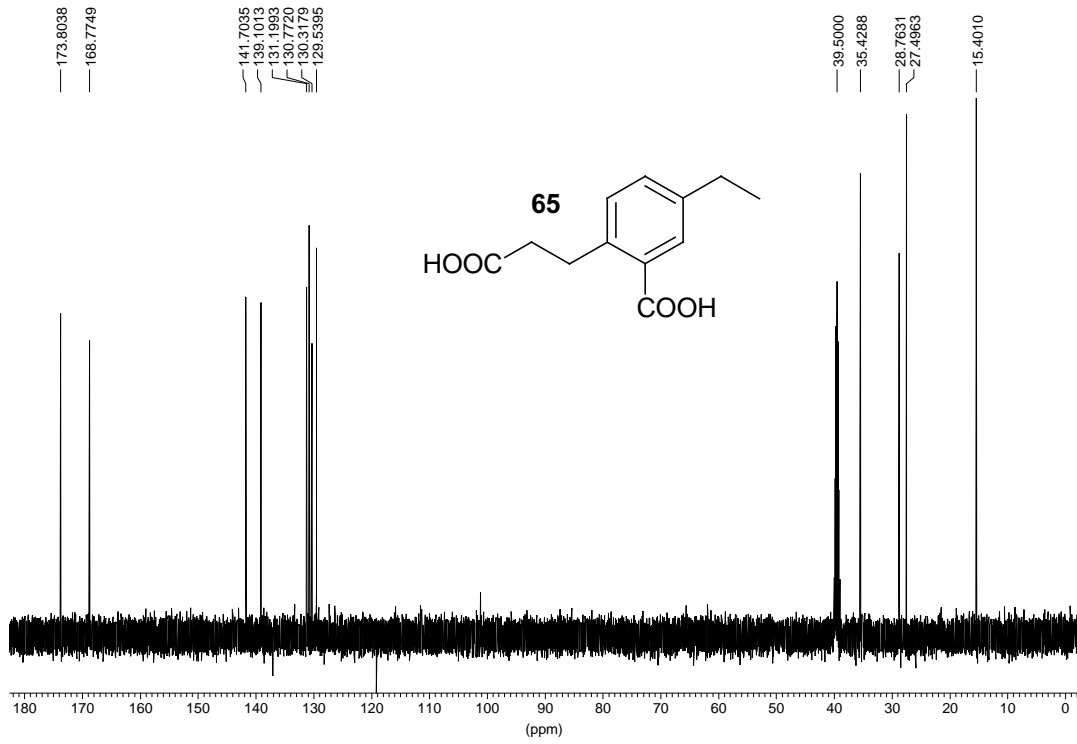


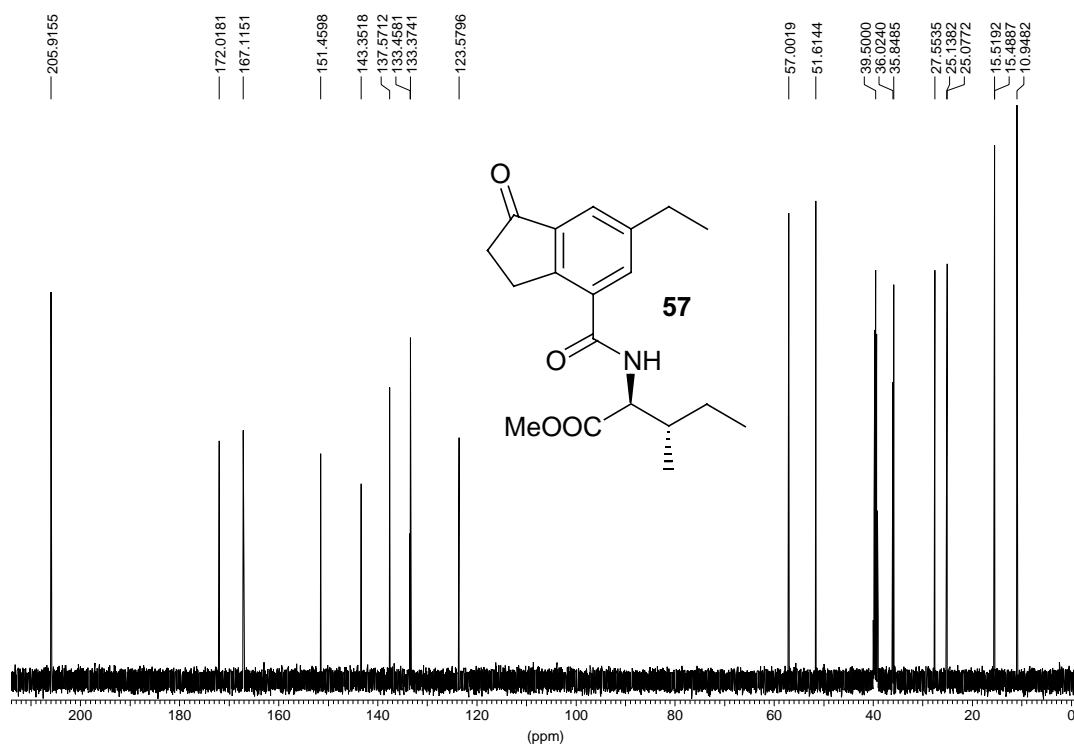




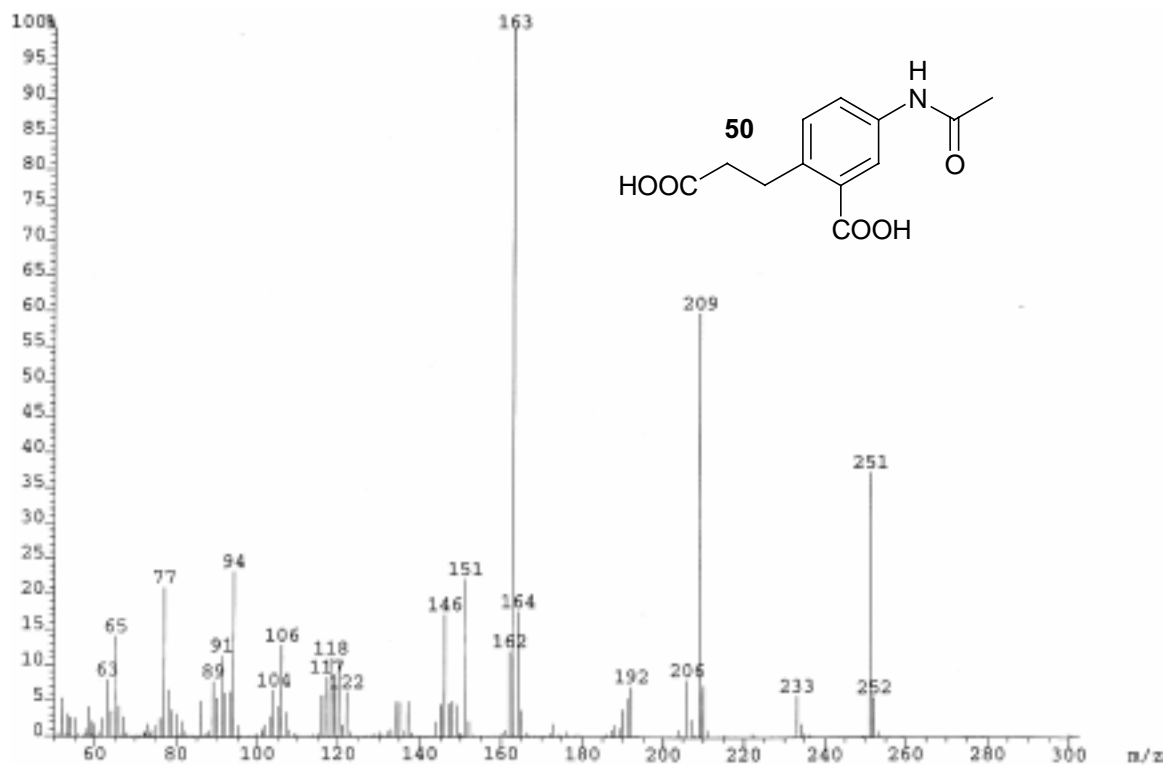
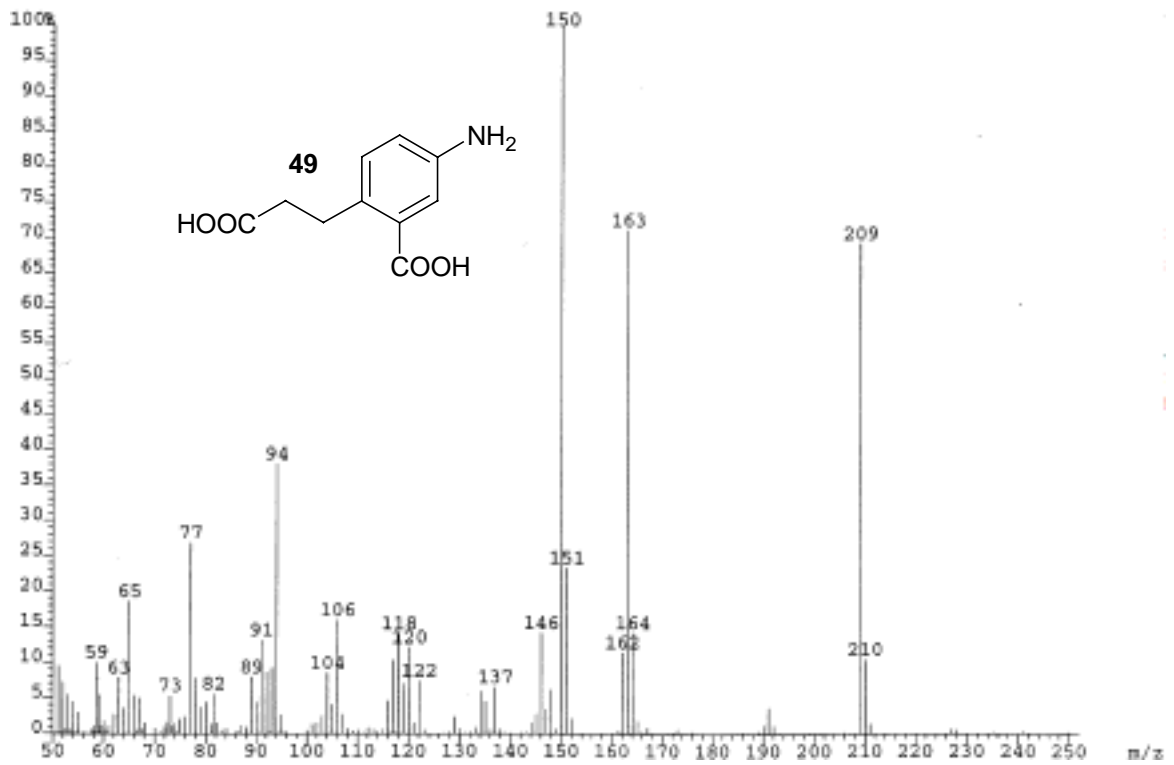


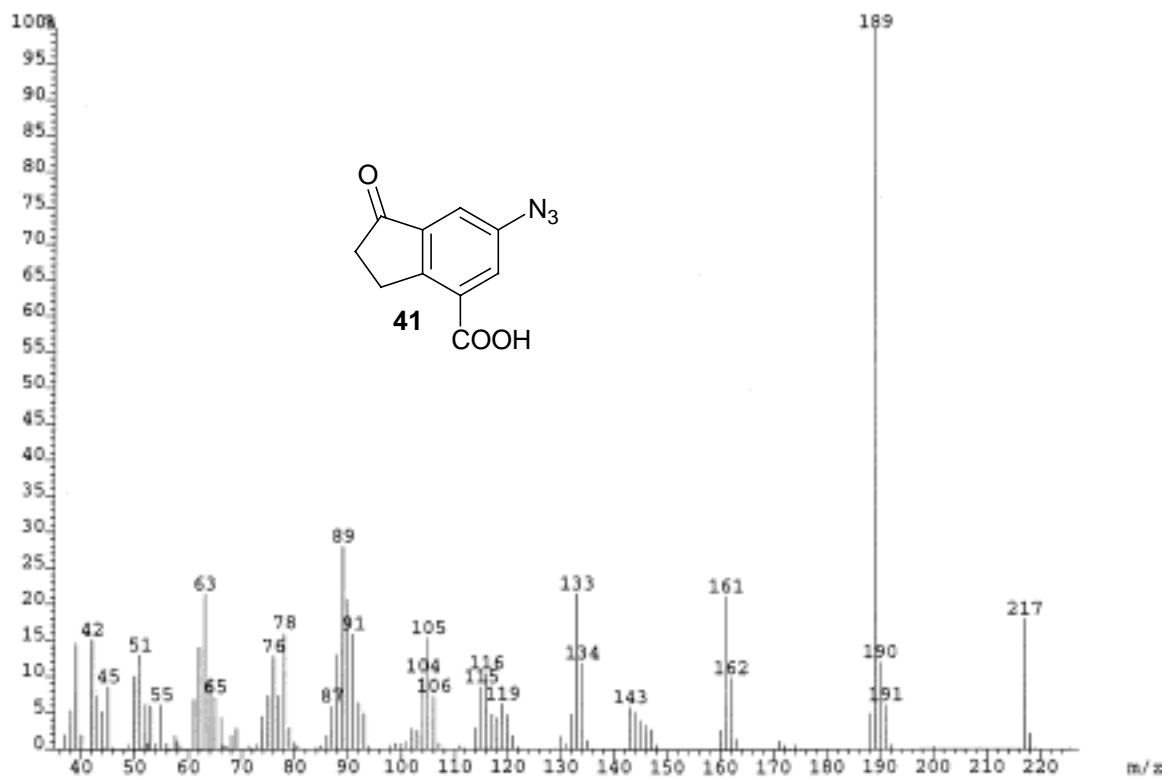
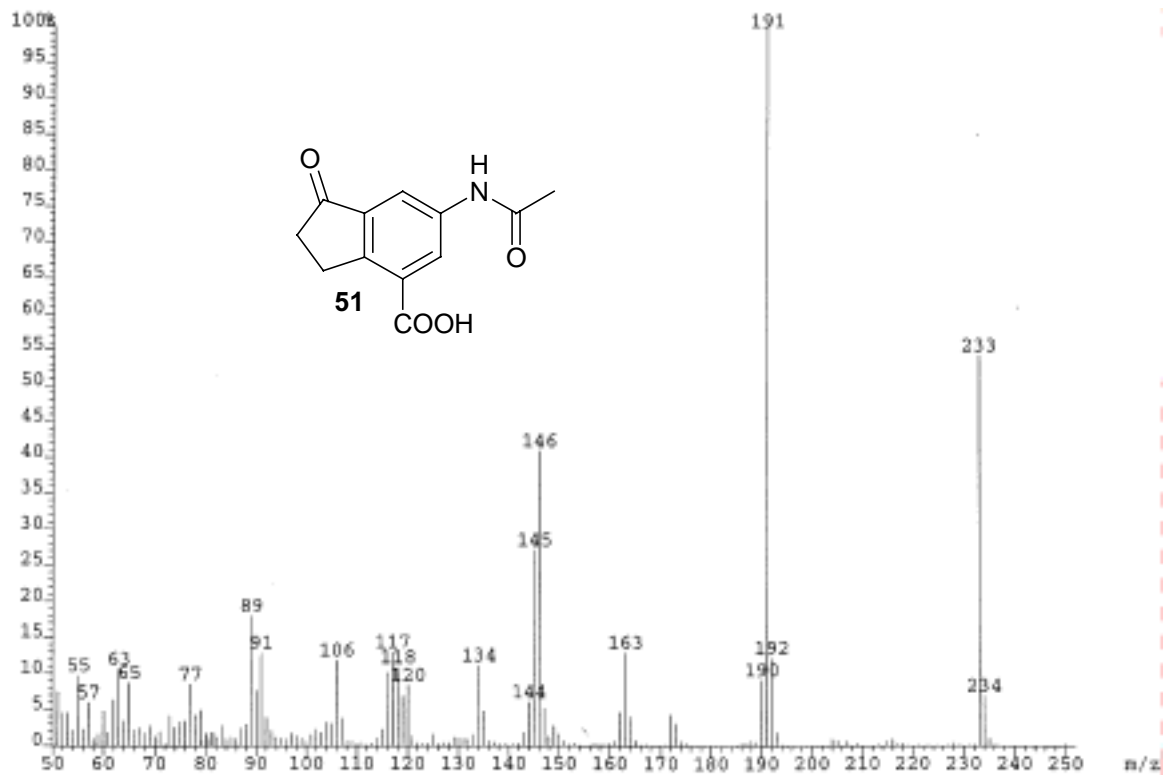


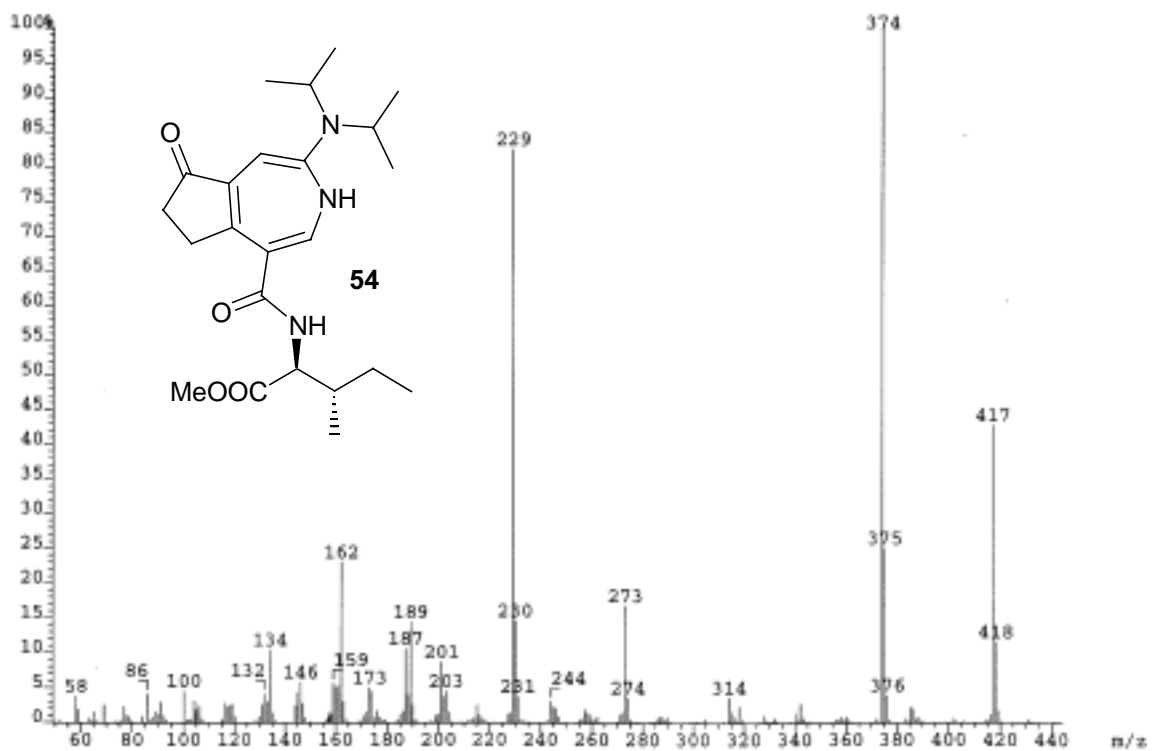
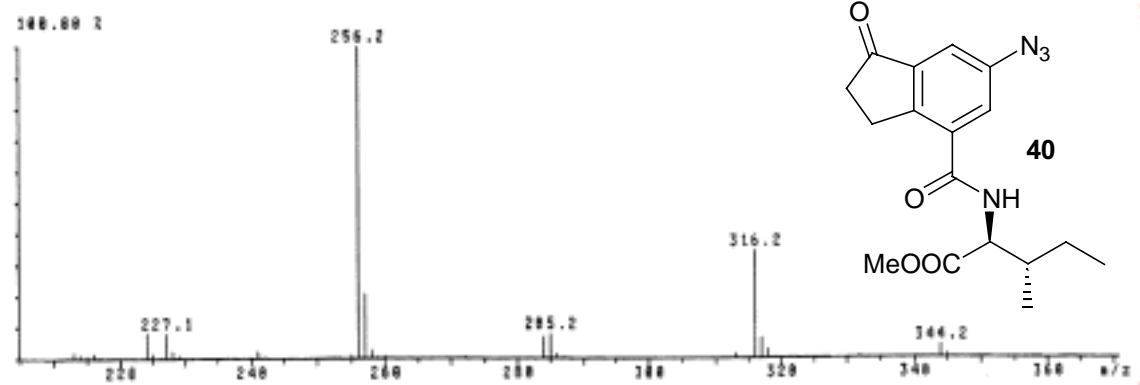
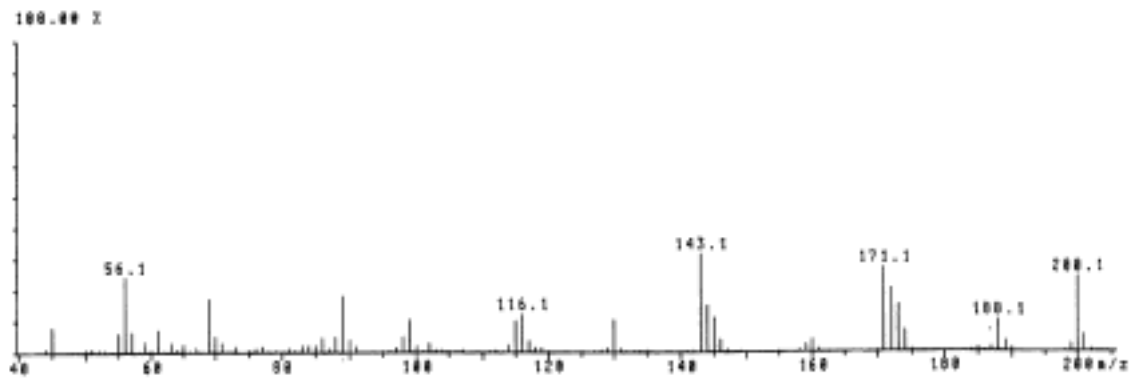


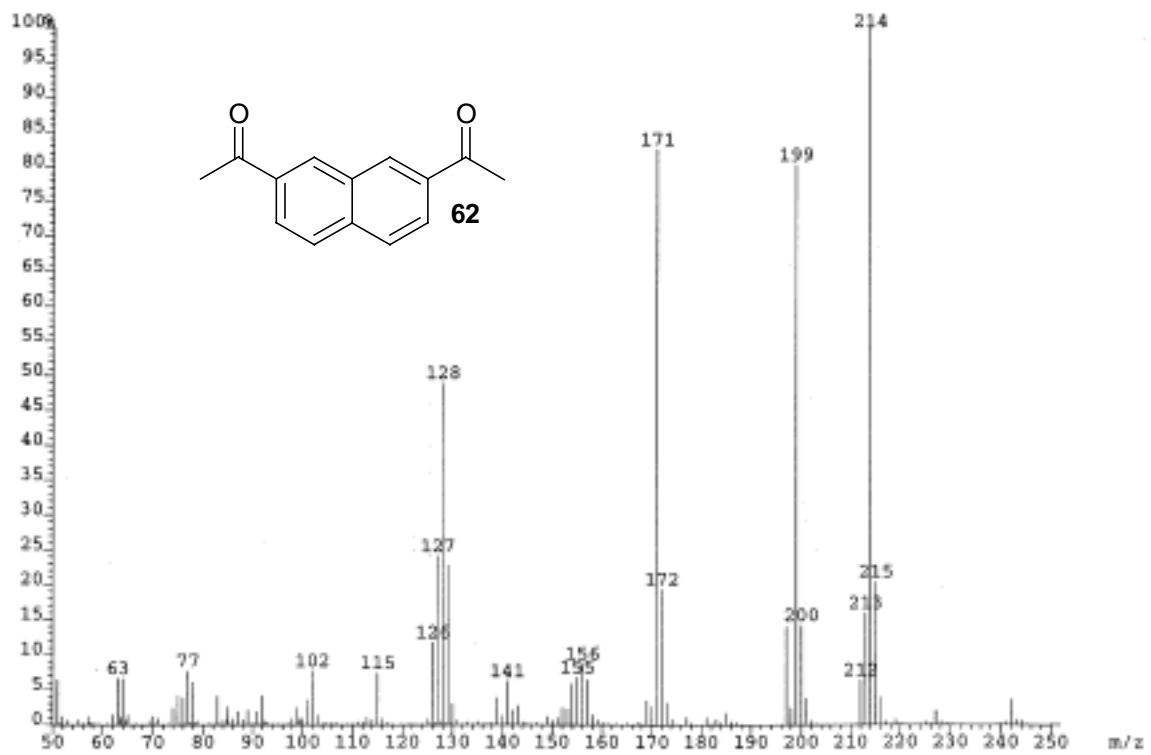
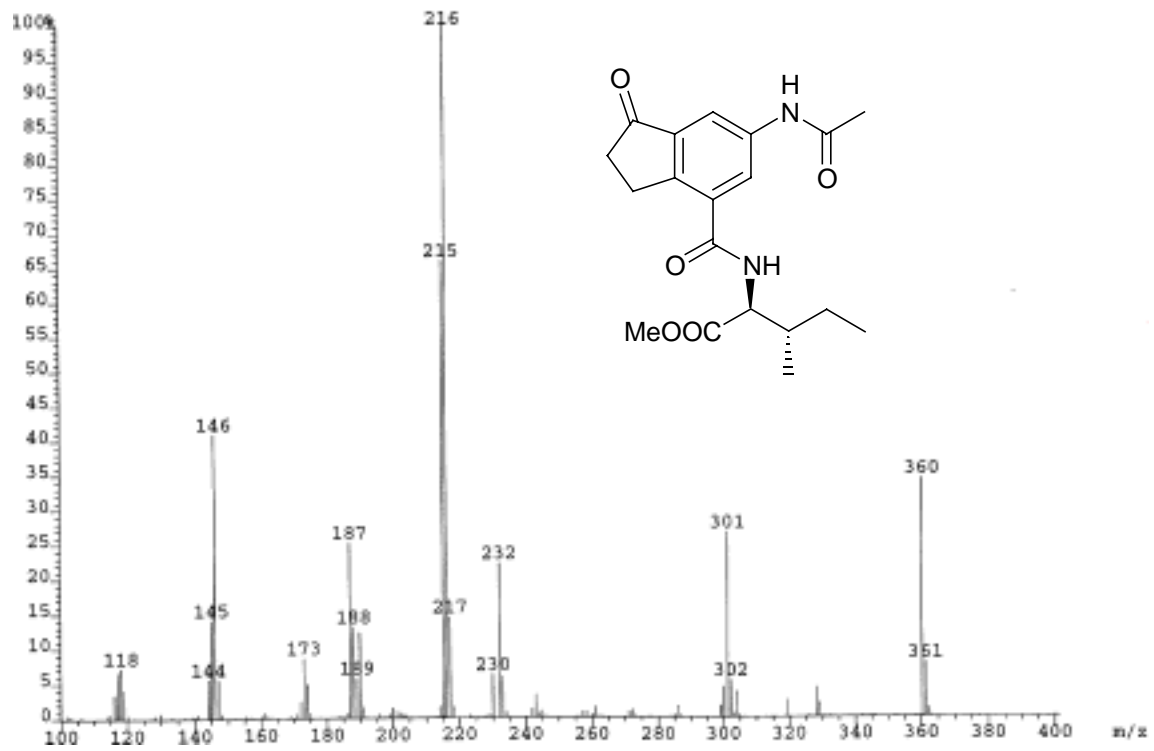


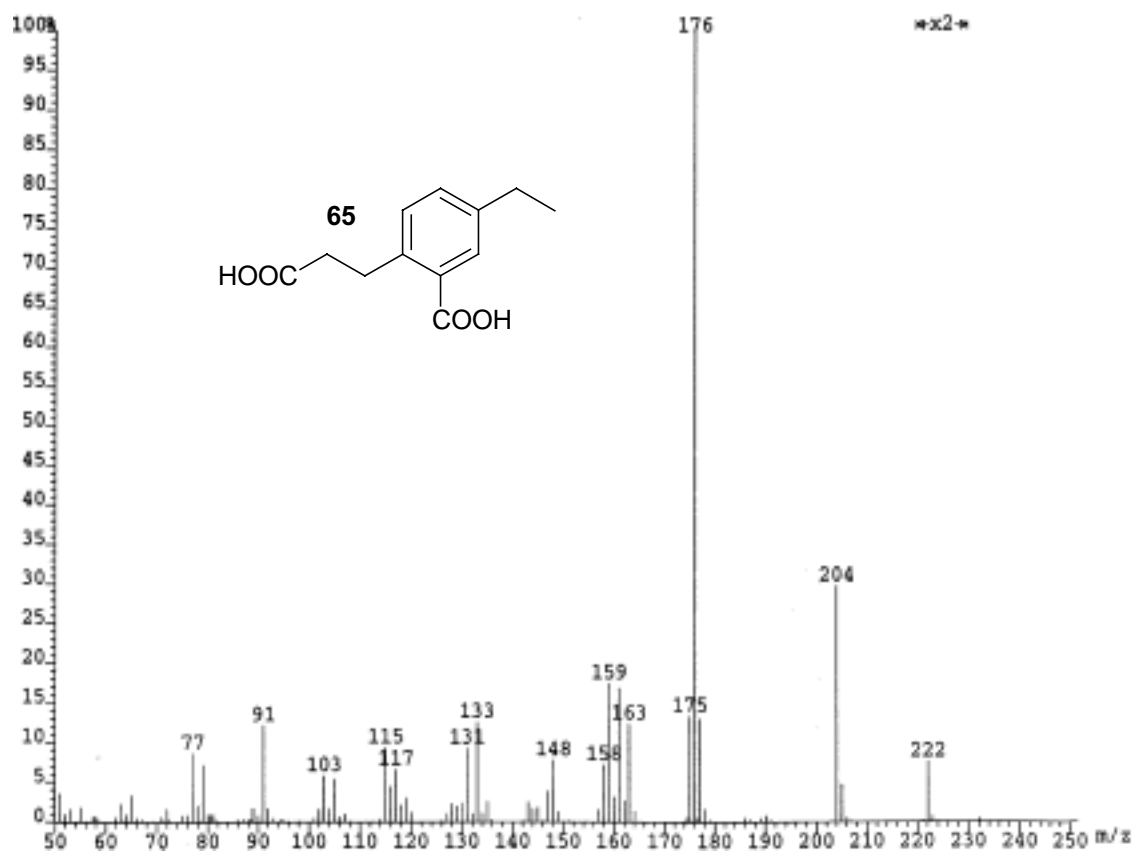
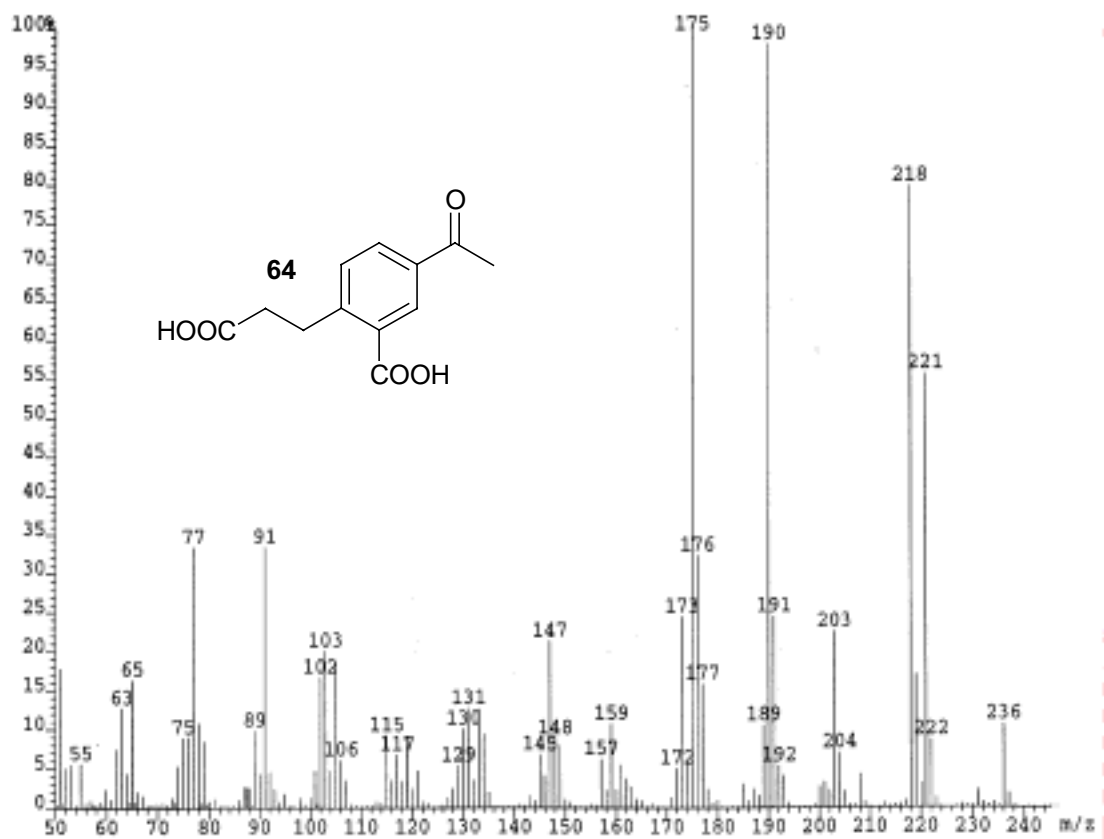
## 7.2.3 Massenspektren

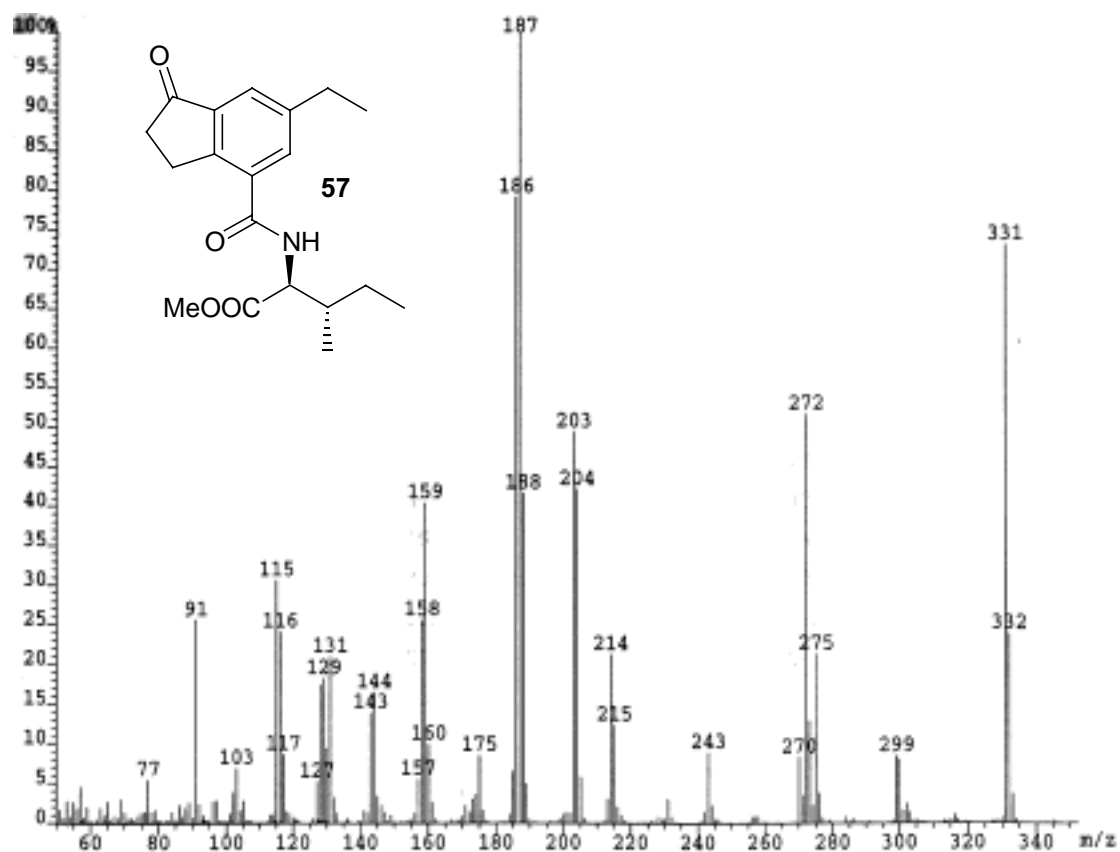
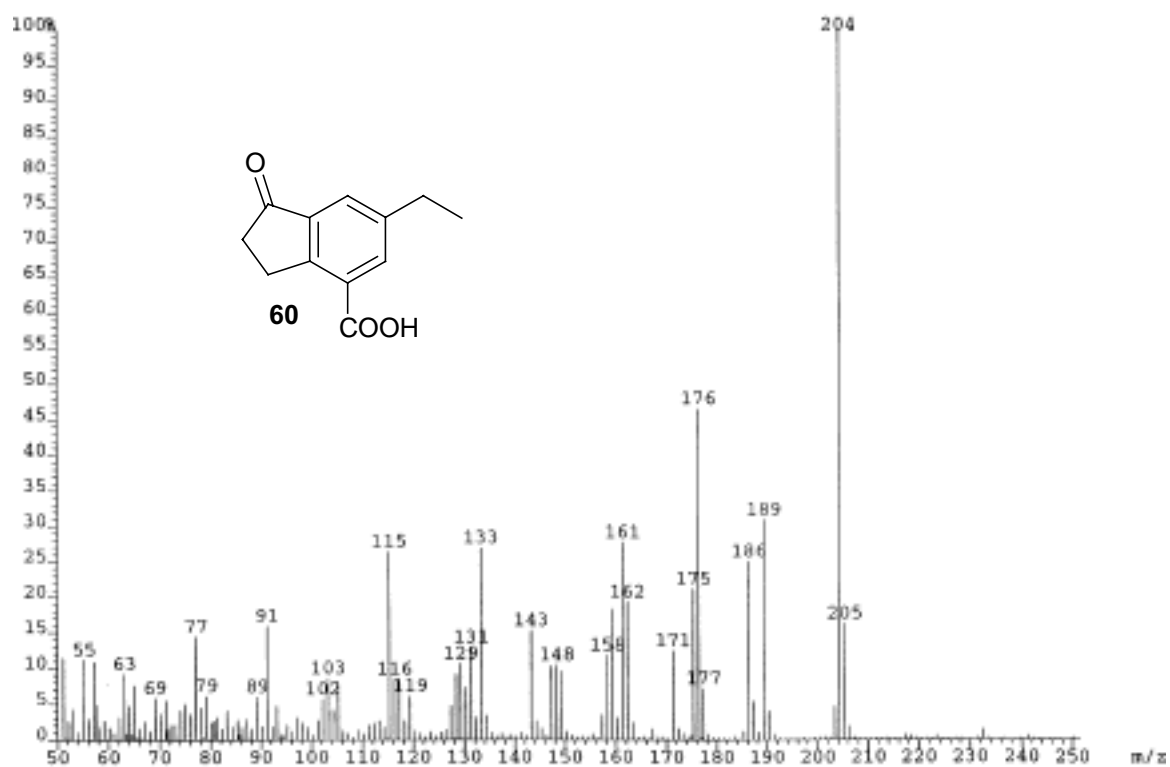






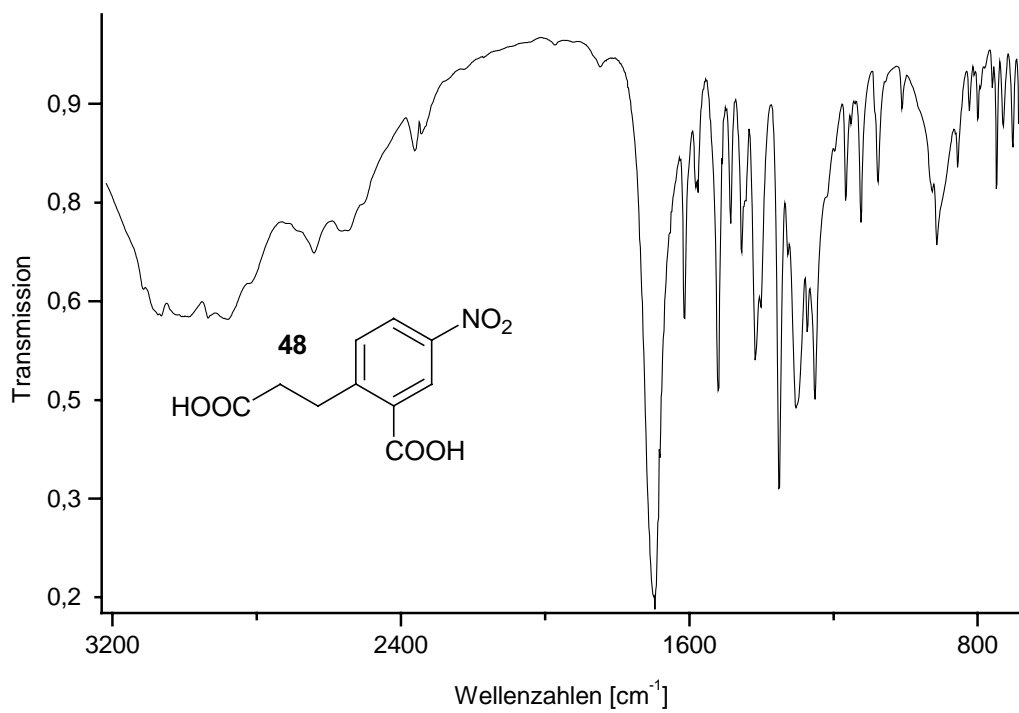
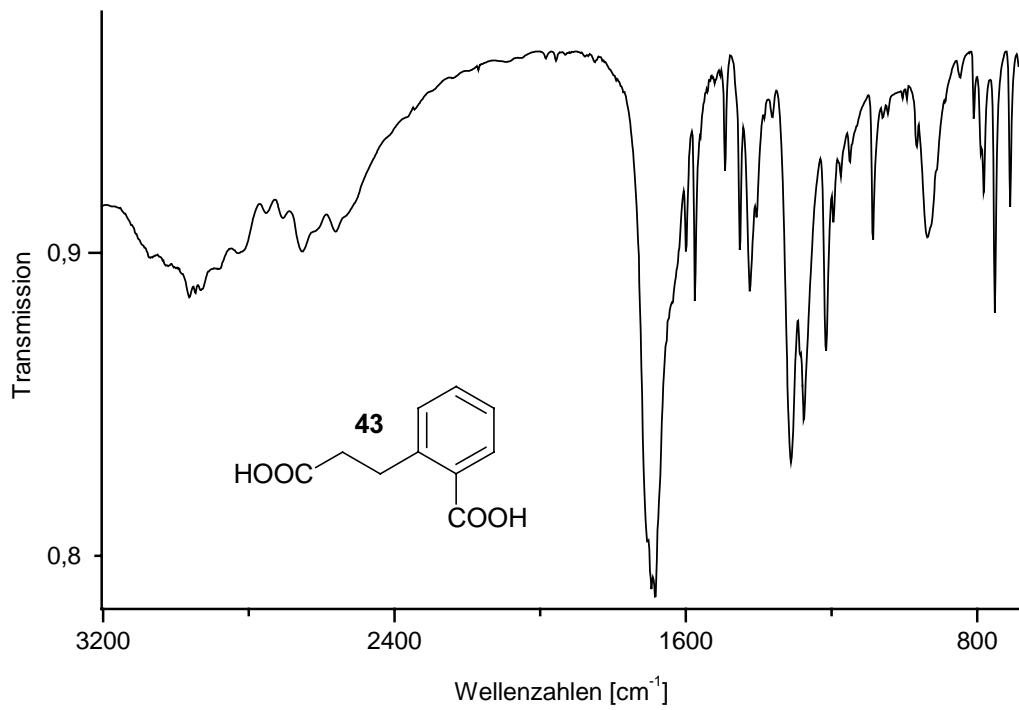


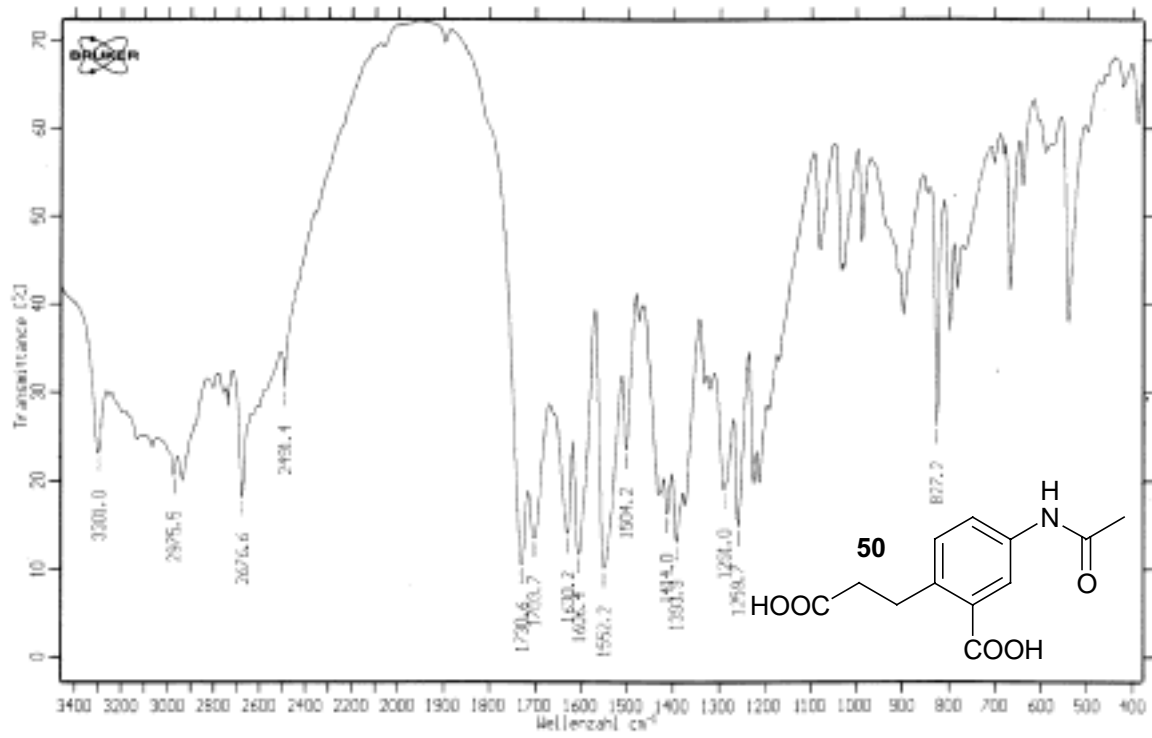
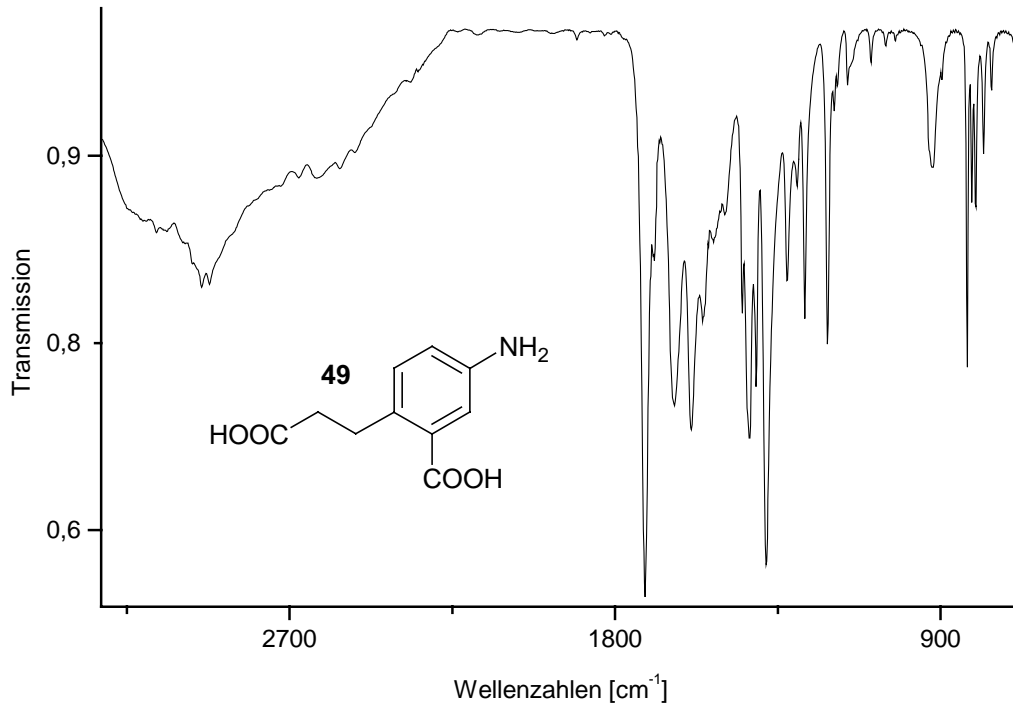


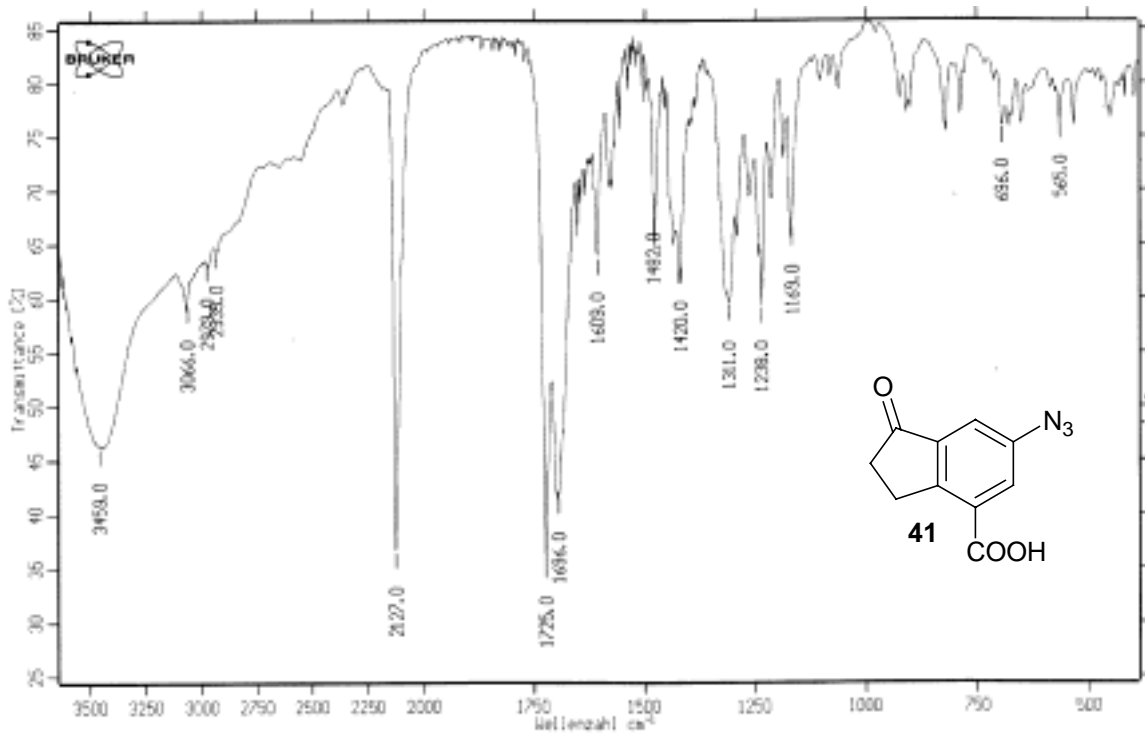
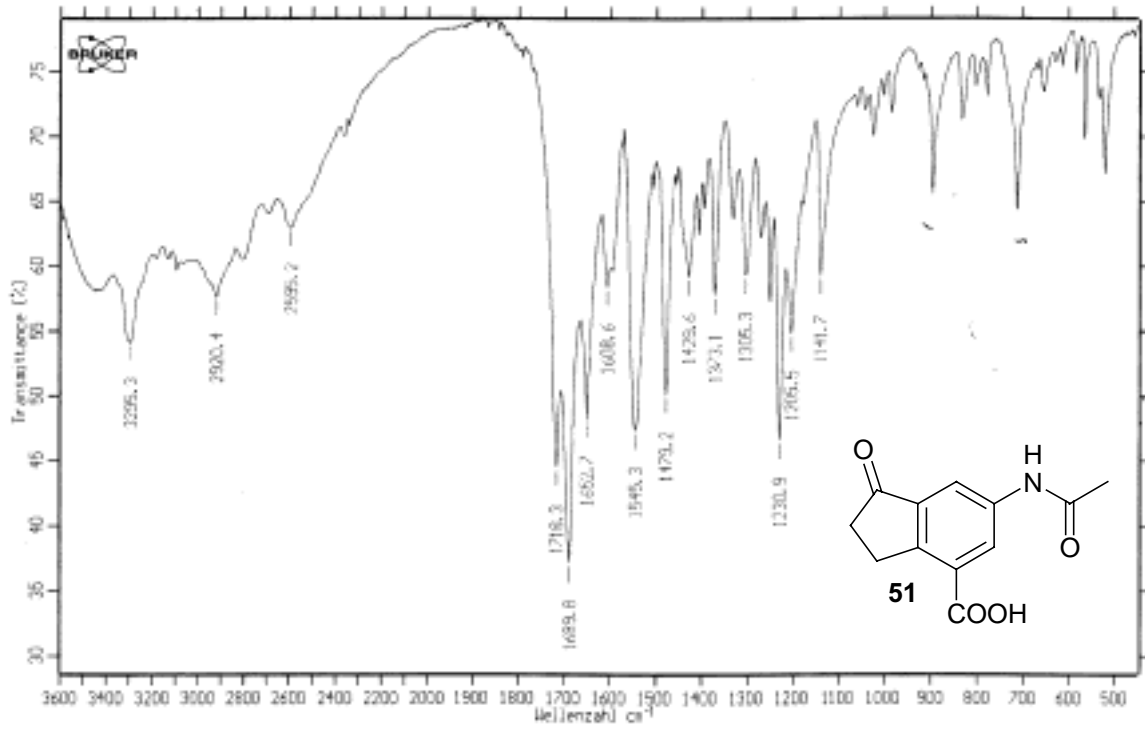


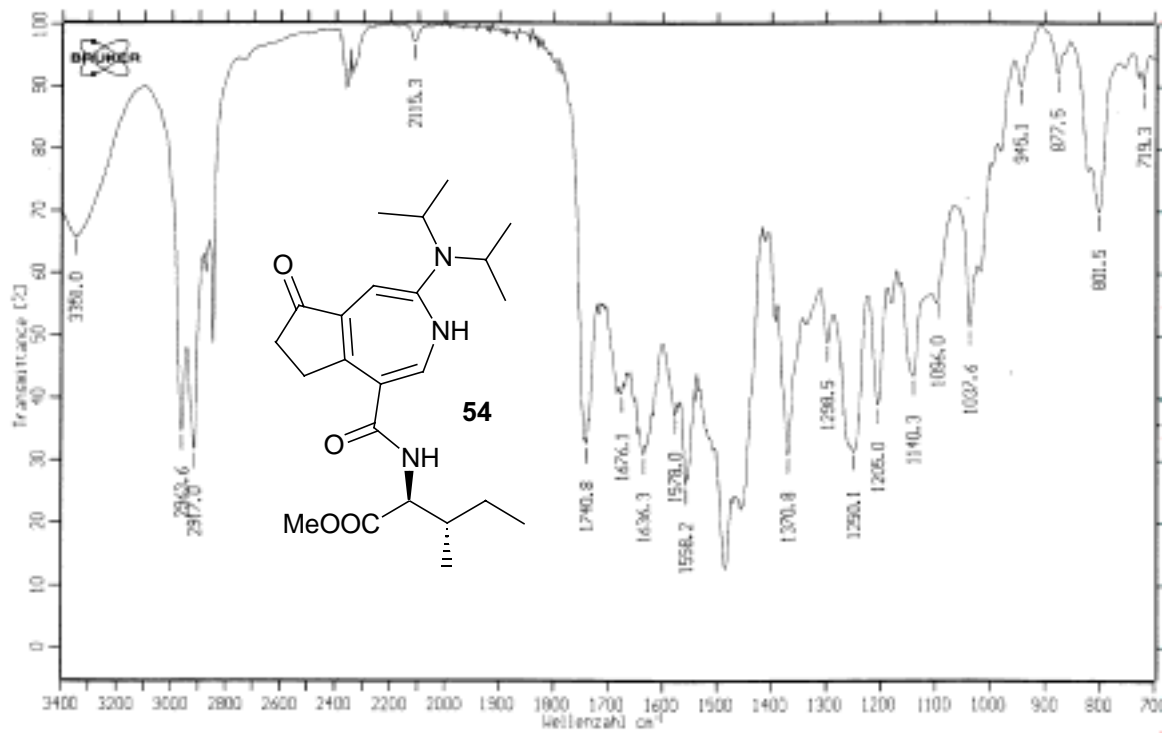
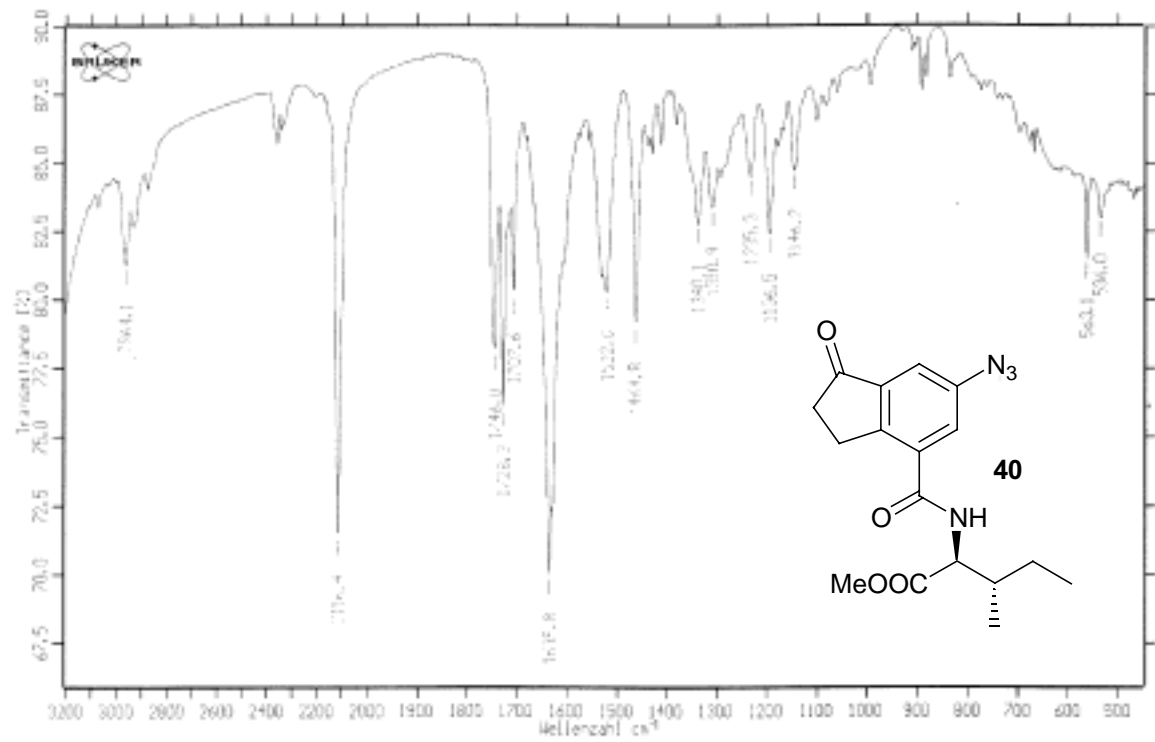


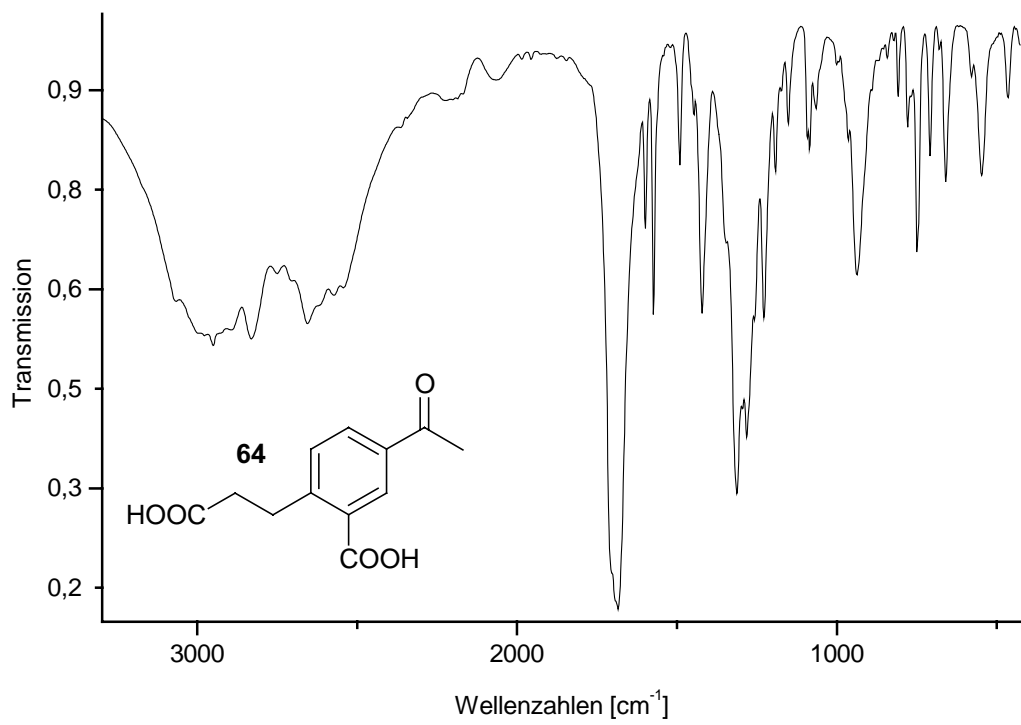
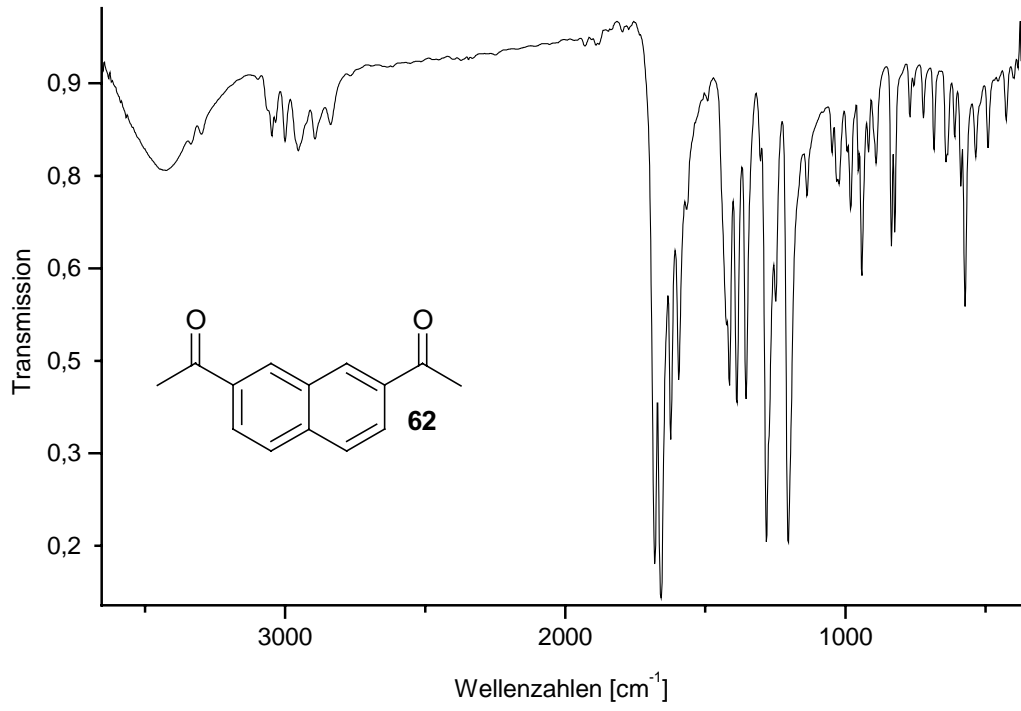
## 7.2.4 Infrarotspektren

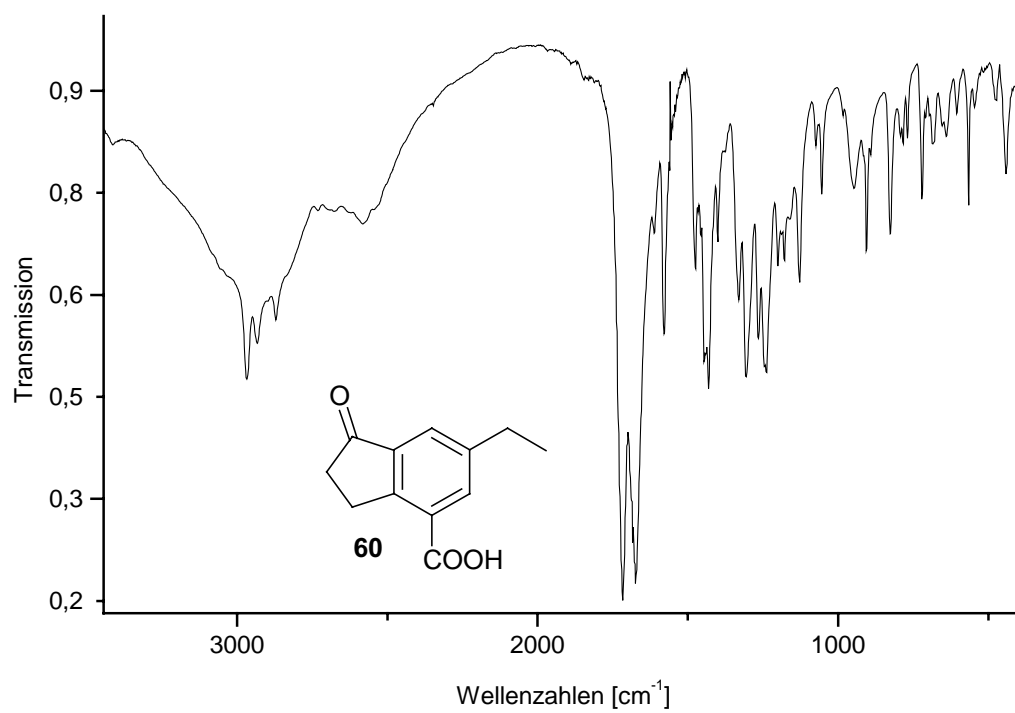
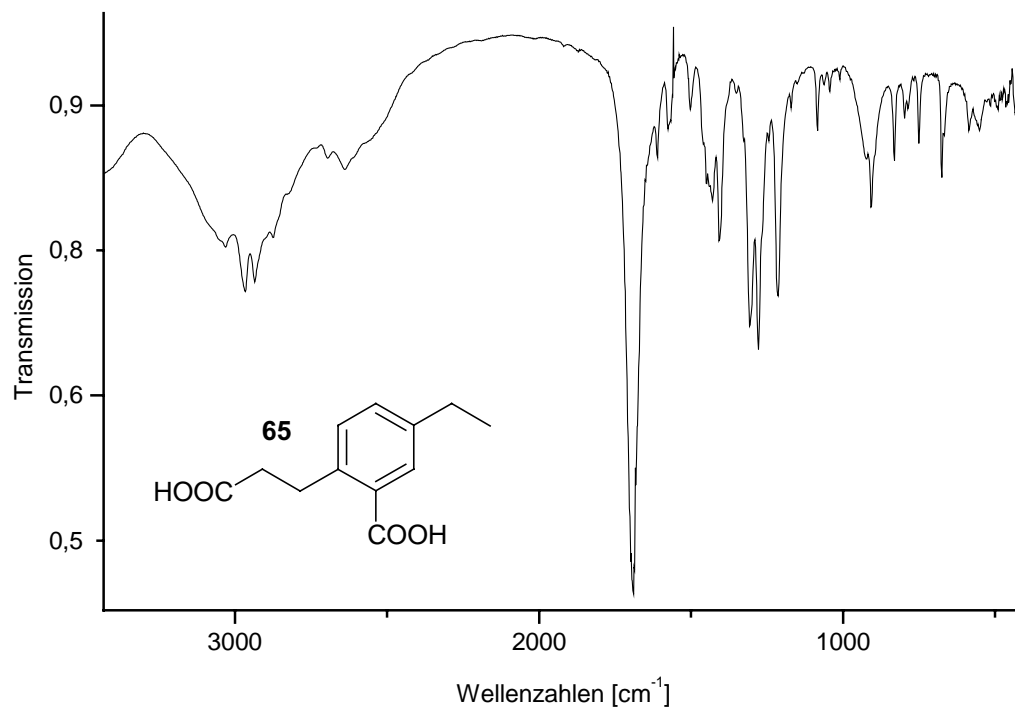


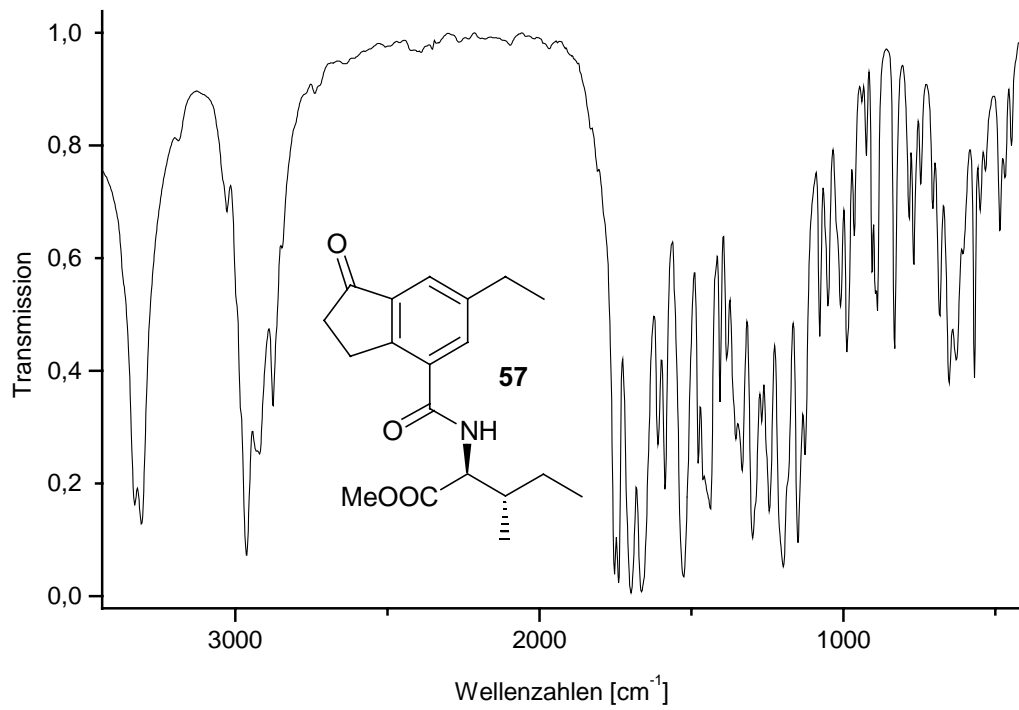




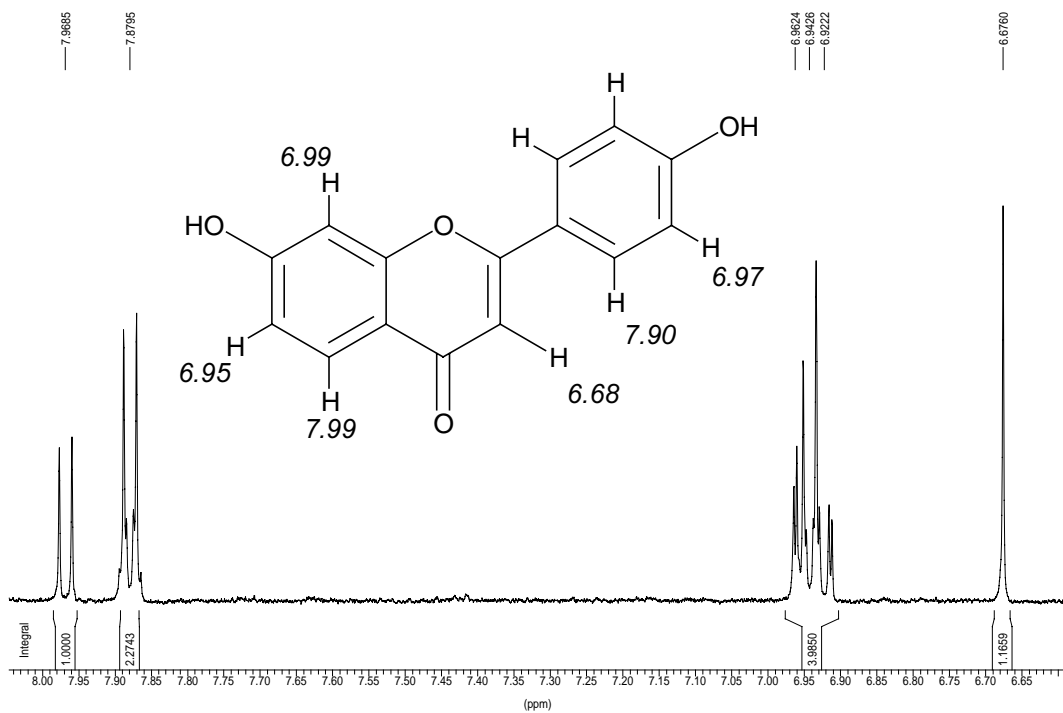


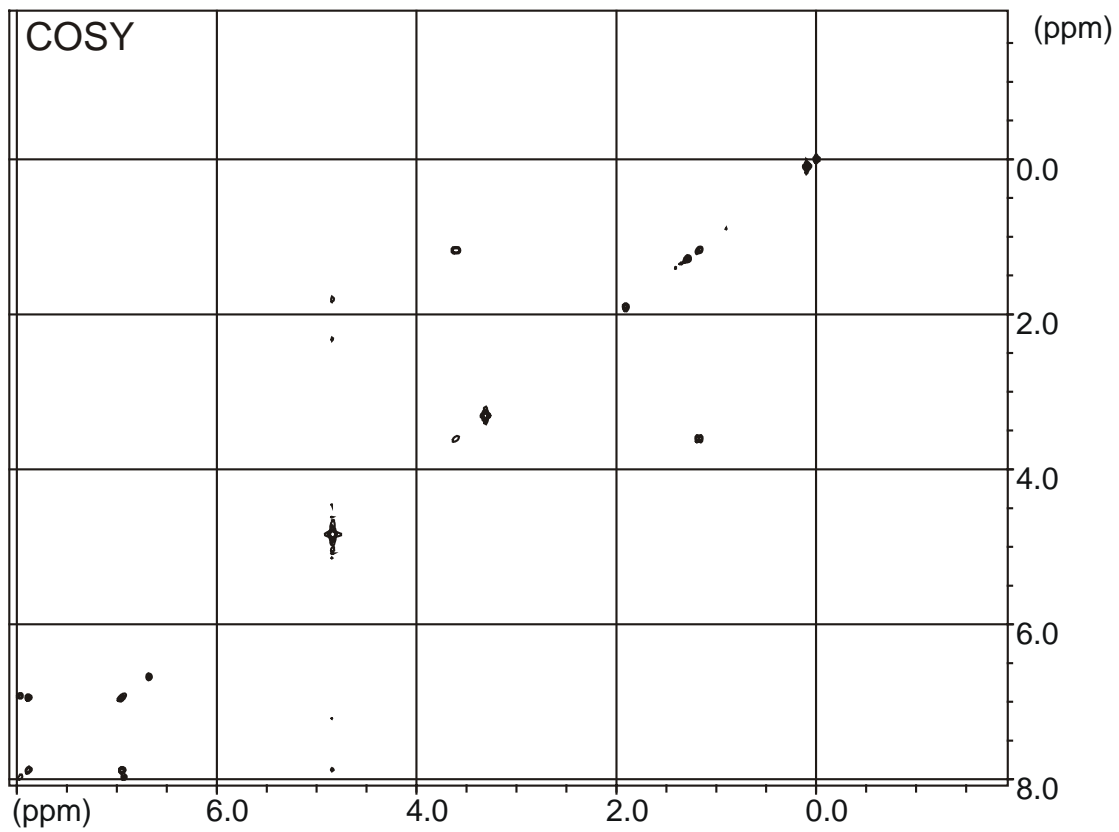
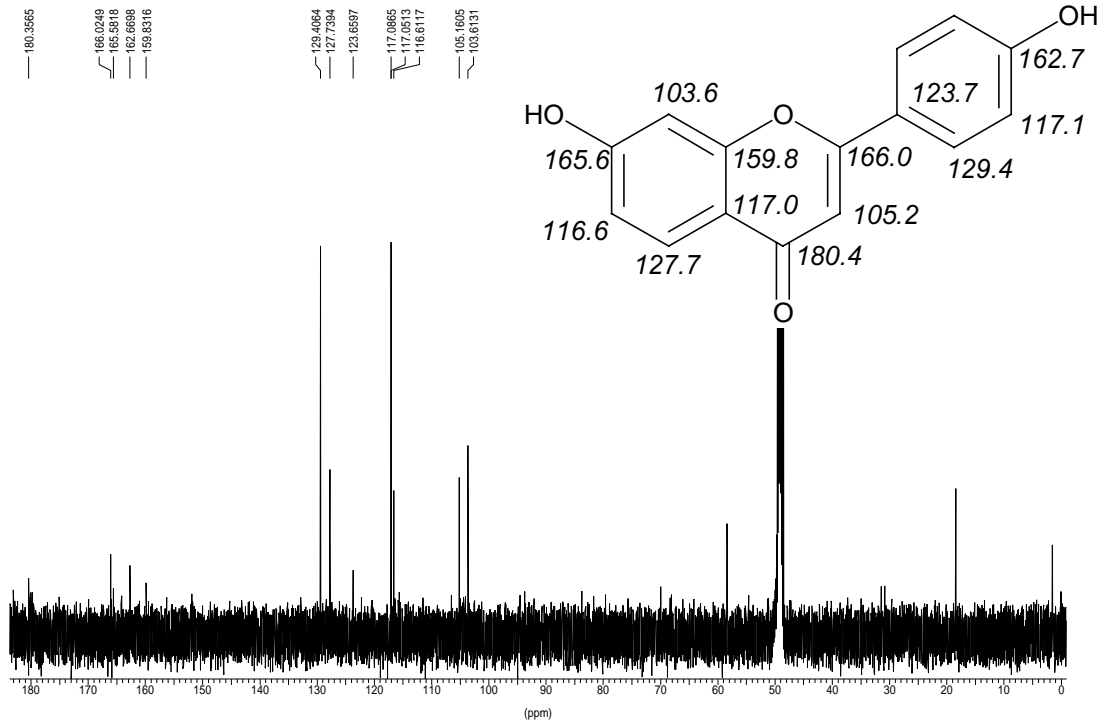




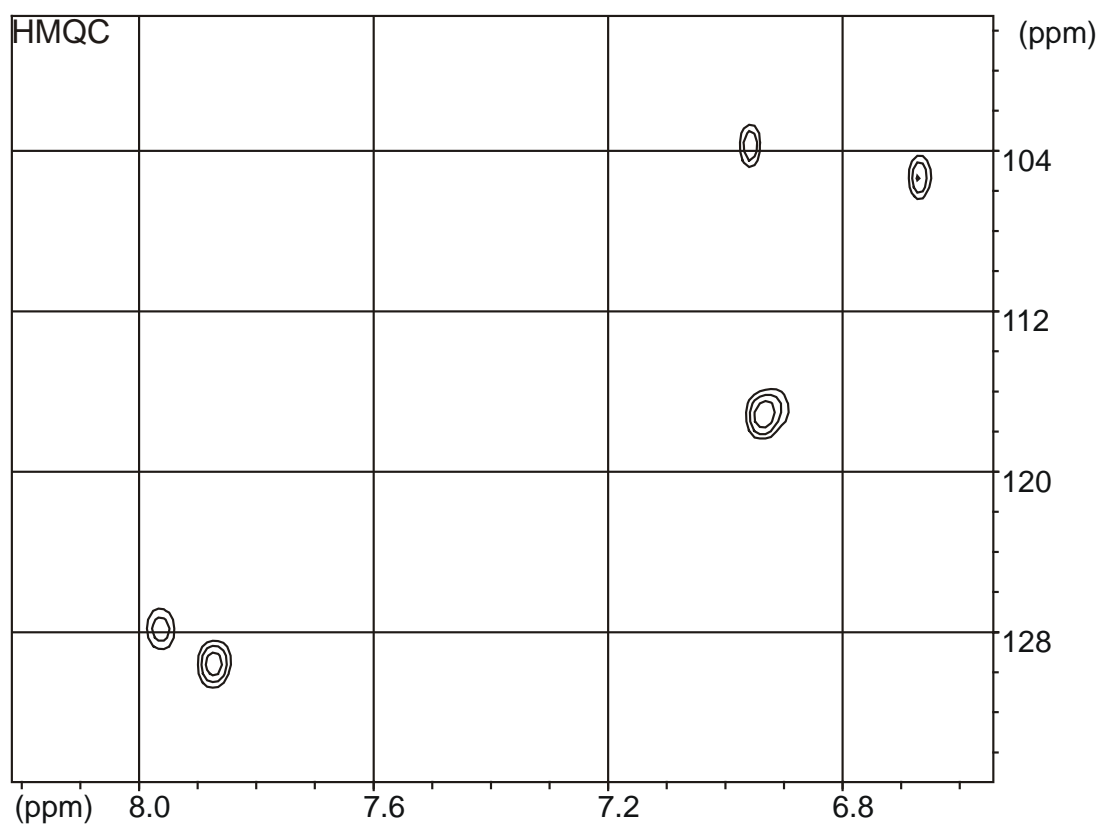
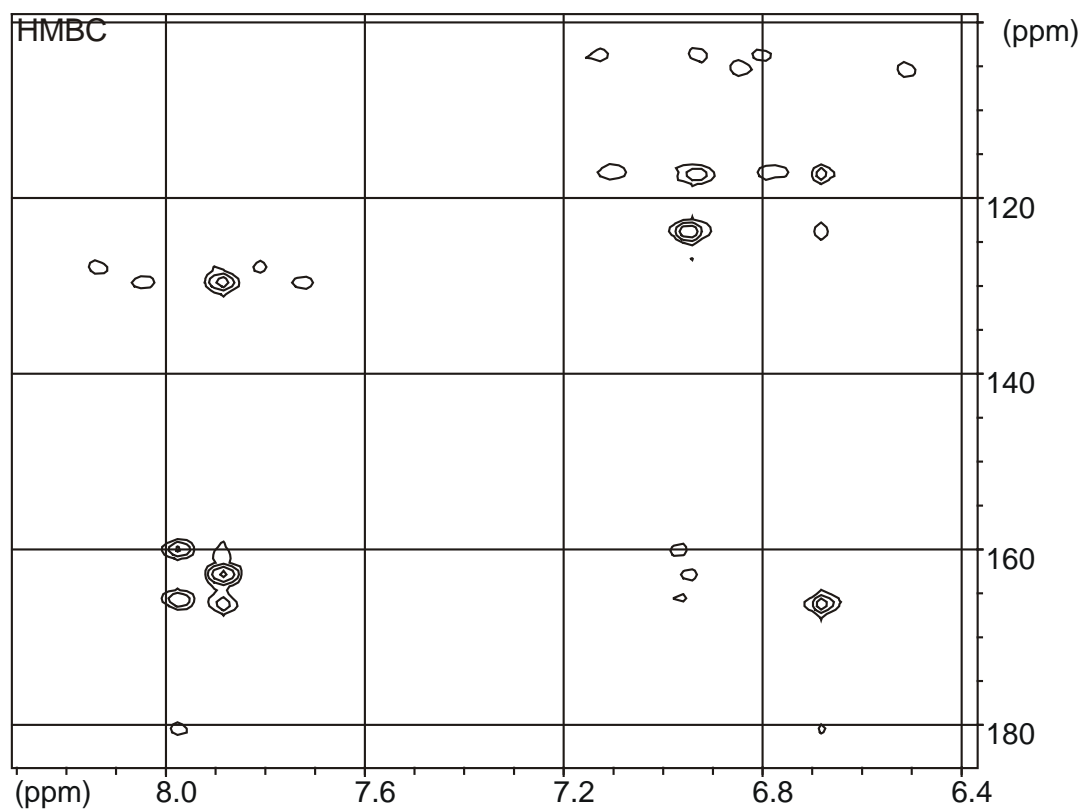


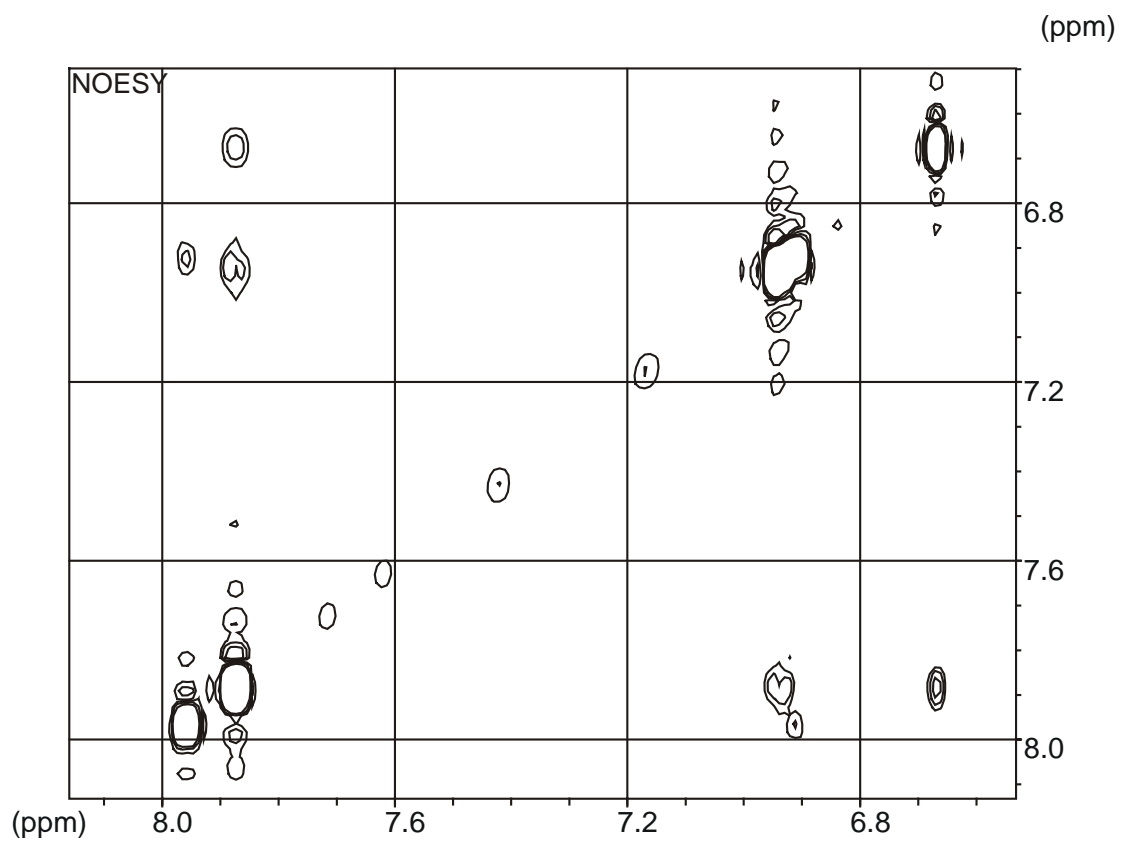
## 7.2.5 Spektren des 7,4'-Dihydroxyflavons











## 7.3 Danksagung

Ich danke

- Prof. Boland für die besonders interessante Themenstellung, seine wissenschaftlichen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft, die ganz ausgezeichnete Betreuung und den großen Freiraum bei der Bearbeitung meines Themas.
- Prof. Anders für die Betreuung meiner Arbeit für die Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Jana Rechtenback, Anja Biedermann und Angelika Berg für die fachmännische Pflege meiner Pflanzen und Zellkulturen, für die vielen Strippings und Messungen.
- Renate Ellinger und Dr. Schneider für die NMR-Messungen und die Hilfe bei der Interpretation der schwierigen Fälle.
- Janine Rattke und Dr. Neil Oldham für die zahlreichen Massenspektren, die im Laufe der drei Jahre angefallen sind.
- Dr. Helmar Görls von der FSU Jena für die Messung der Kristallstrukturen und die gute Zusammenarbeit.
- meinen Kooperationspartnern für das Testen meiner Elicitoren an ihren Systemen und für die hilfreiche Diskussion der Ergebnisse: Prof. Jürgen Ebel und Dr. Axel Mithöfer (LMU München), Dr. Klaus Wasternack, Dr. Bettina Hause, Prof. Kutchan und Dr. Robert Kramell (IPB Halle), Prof. Ian Baldwin und Jonathan Gonzales (MPICE Jena), Prof. Marcel Dicke (Wageningen, NL)
- Dr. Matthias Ullrich (MPI Marburg) für die Bereitstellung von CFA, Coronatin und verschiedenen *Pseudomonas syringae*-Mutanten.
- Dr. Frank Kühnemann (IAP der Universität Bonn) für die Möglichkeit, mich an der Entwicklung der Photoakustikspektroskopie für Isopren zu beteiligen.
- Thomas Koch für die Bestimmung der endogenen Salicylatlevel.
- meinen Mitarbeitern und Kollegen aus dem Arbeitskreis für drei anregende und lehrreiche Jahre: Stefan Bartram, Christoph Beckmann, Angelika Berg, Anja Biedermann, Jürgen Engelberth, Birte Feld, Oliver Fietz, Christian Hertweck,

Michal Hoskovec, Andrew Jarvis, Verena Jung, Andreas Jux, Thomas Koch, Michael Kuhn, Ryan Lauchli, Andrea Lehr, Neil Oldham, Jörn Piel, Georg Pohnert, Janine Rattke, Jana Rechtenbach, Ottmar Schaaf, Dieter Spiteller, Christoph Steinbeck, Alés Svatos, Sabine Thiessen, Elke Trummer, Han Yonquan und Grit Winnefeld.

Mein besonderer Dank gilt

- Verena, Georg und meiner Mutter für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit.
- meinen Mitbewohnern Olli und Birte dafür, dass sie jeden Tag dafür gesorgt haben, dass ich pünktlich im Institut war und für vieles andere.

## 7.4 Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen:

- Schüler G., Wasternack C., Boland W. *Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling*. *Tetrahedron* **1999** 55(13):3897-3904.
- Boland W., Engelberth J., Piel J., Jung V., Jux A., Koch T., Krumm T., Schüler G. *Induced biosynthesis of terpenoid insect semiochemicals in plants*. *Chemicke Listy* **1999** 93(Suppl S):1-69.
- Dahnke H., Kahl J., Schüler G., Boland W., Urban W., Kühnemann F. *On-line monitoring of biogenic isoprene emissions using photoacoustic spectroscopy*. *Applied Physics B Lasers & Optics* **2000** 70(2):275-280.
- Engelberth J., Koch T., Schüler G., Bachmann N., Rechtenbach J., Boland W. *Ion Channel-Forming Alamethicin Is a Potent Elicitor of Volatile Biosynthesis and Tendril Coiling. Cross Talk between Jasmonate and Salicylate Signaling in Lima Bean*. *Plant Physiol.* **2001** 125:369-377.
- Schüler G., Görls H., Boland W. *6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine*. *Eu. J. Org. Chem.* **2001**:in Druck.

### Vorträge:

- Konferenz der DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettforschung), *Synthese von 6-Azido-1-oxo-4-oyl-Isoleucin*, Göttingen, May **1999**
- Kurt Mothes Workshop of Secondary Plant Metabolism, *Coronatin Mimics as Elicitors of Plant Defense*, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, September **2000**
- Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen, *Coronatin-Analoga als Pflanzenduft-Elicitoren*, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena, November **2000**

## Poster:

- Attack & Defense in Plant Disease, *Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling*, John Innes Center, Norwich, GB, Juli **1999**
- IUPAC Konferenz und 27. GDCh Vollversammlung, *Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling*, Berlin, August **1999**
- Conference of the International Society for Chemical Ecology, *Synthesis of 6-azido-1-oxo-indan-4-oyl isoleucine; a photoaffinity approach to plant signaling*, Pocos de Caldas, Brasilien, August **2000**

## 7.5 Lebenslauf

Name:	Göde Schüler
Geburtsdatum:	27.09.1971
Geburtsort:	Bochum
1978-1982	KGS Niederkasseler Straße, GGS Lörick, beide in Düsseldorf
1982-1991	Comenius Gymnasium, Düsseldorf-Oberkassel, Abitur Juni 1991
1991-1997	Chemiestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
März-Dezember 1997	Diplomarbeit am Kekulé-Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Boland
16. Januar 1998	Diplom-Chemiker
seit Januar 1998	Doktorand am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena unter der Leitung von Prof. Boland
1992-1997	Nacht- und Wochenenddienst im klinischen Labor des St. Johannes Hospitals, Bonn
seit 2000	Webmaster im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

Jena, den 12. Februar 2001

