

Wehrchemie in Blattkäfern:  
Aufklärung eines neuen Acylierungskomplexes in  
Insekten am Beispiel von *Chrysomela lapponica*

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-Chemikerin Karla Tolzin-Banasch, geb. Tolzin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis Juli 2007 und Juli 2008 bis Juni 2009 am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie Jena, unter der Betreuung von Prof. Dr. Wilhelm Boland angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Beckert, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Boland, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Konrad Dettner, Universität Bayreuth

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.07.2009

***„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.“***

(Charles Darwin)

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Verteidigungsstrategien bei Blattkäfern .....	1
1.2	Evolution der Wehrchemie innerhalb der Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae) .....	4
1.2.1	Ökonomie biochemischer Reaktionen .....	6
1.2.2	Kombinierte Biosynthese in anderen Spezies .....	8
1.3	Der Blattkäfer <i>Chrysomela lapponica</i> .....	8
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>14</b>
3.1	Qualitative Analyse des Wehrsekrets von <i>Chrysomela lapponica</i> Larven .....	14
3.2	Quantifizierung der Sekretinhaltsstoffe mit GC-MS .....	18
3.2.1	Glucose in Sekreten der Chrysomelina Spezies .....	18
3.3	Aufklärung der Biosynthese der Esterproduktion in <i>Chrysomela lapponica</i> .....	23
3.3.1	Sequestrierung von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen .....	23
3.3.2	<i>De novo</i> Produktion von Säuren aus Aminosäuren .....	25
3.3.3	Postulierung der Biosynthesewege für die Produktion von Alkoholen und Säuren aus Phenylalanin, Valin und Isoleucin .....	30
3.3.4	Lokalisierung des Aminosäureabbaus .....	31
3.3.5	Mechanismus der Transacylierungsreaktion .....	33
3.3.6	Untersuchungen zum Ausmaß der <i>de novo</i> Produktion von Säuren und Alkoholen .....	44
3.3.7	Aminosäurezusammensetzung der Wirtspflanzen .....	45
3.3.8	Korrelation Blattalkohole vs. Sekretalkohole .....	48
3.4	Wirkungsweise der Wehrsubstanzen .....	48
3.4.1	Agardiffusionstests .....	50
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>60</b>
5.1	Materialien und Geräte .....	60
5.2	Chemikalien .....	60
5.3	Statistik .....	60



<b>5.4 Käfer und Larven .....</b>	<b>61</b>
<b>5.5 Haltung der Larven .....</b>	<b>61</b>
<b>5.6 Sammlung von Wehrsekret.....</b>	<b>62</b>
<b>5.7 Fütterungsexperimente.....</b>	<b>62</b>
5.7.1 Thioglucoside .....	62
5.7.2 Isotopenmarkierte Aminosäuren.....	63
5.7.3 [ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Benzoessäure .....	64
<b>5.8 Inkubation des Fettkörpergewebes mit <sup>13</sup>C-Phenylalanin.....</b>	<b>64</b>
<b>5.9 Injektionsexperimente .....</b>	<b>65</b>
<b>5.10 Aktivitätstests mit Rohsekret .....</b>	<b>65</b>
5.10.1 Lokalisierung des Aminosäureabbaus.....	65
5.10.2 1-Acylglucosen .....	66
5.10.3 UDP-Glucose .....	67
<b>5.11 Agardiffusionstest .....</b>	<b>67</b>
<b>5.12 Derivatisierungsmethoden.....</b>	<b>68</b>
<b>5.13 Deglycosylierung von glycosidisch gebundenen Blattalkoholen aus den Wirtspflanzen .</b>	<b>69</b>
<b>5.14 Hydrolyse der Wehrsekrete.....</b>	<b>69</b>
<b>5.15 Aminosäureanalytik in Pflanzen.....</b>	<b>70</b>
5.15.1 Freie Aminosäuren.....	70
5.15.2 Gebundene Aminosäuren.....	71
<b>5.16 Synthesen .....</b>	<b>72</b>
5.16.1 Thioglucoside und acylierte Thioglucoside .....	72
5.16.2 1-Acylglucosen und –galactosen .....	102
5.16.3 Sonstige.....	115
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>120</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>131</b>
<b>7.1 Veröffentlichungen .....</b>	<b>131</b>

<b>7.2</b>	<b>Daten .....</b>	<b>133</b>
<b>7.3</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>134</b>
<b>7.4</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>136</b>
<b>7.5</b>	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>138</b>

# Abkürzungen und Begriffserklärungen

---

Die Klassifizierung der Käfer erfolgt nach folgender Systematik:

Ordnung: Coleoptera (Käfer)

Familie: Chrysomelidae (Blattkäfer)

Unterfamilie: Chrysomelinae

Unterunterfamilie: Chrysomelina

Gattung: *Chrysomela*

Art: *lapponica*

Alle physikalischen Basisgrößen und abgeleitete Größen werden mit den international festgelegten Formelzeichen und den zugehörigen Einheiten des internationalen Systems (SI) abgekürzt.

Ala	Alanin
APCI	Athmospheric Pressure Chemical Ionization
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CoA	Coenzym A
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
F	Freiheitsgrad
FLD	Fluoreszenzdetektor
GC-C-IRMS	Gas-Chromatography-Combustion-Isotope-Ratio-Mass-Spectrometry
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
Ile	Isoleucin
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
p	Signifikanzniveau
Phe	Phenylalanin
RT	Raumtemperatur
SCPL	serincarboxypeptidase-like
ssp.	Subspezies
Val	Valin



# 1 Einleitung

---

## 1.1 Verteidigungsstrategien bei Blattkäfern

Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae) stellen mit etwa 40000 beschriebenen Arten weltweit die zweitgrößte Gruppe innerhalb der Ordnung der Coleoptera (Käfer) dar<sup>[67]</sup>. In Deutschland gibt es ca. 470 Arten. Als Pflanzenfresser schädigen die Blattkäfer oft Nutzpflanzen oder Waldbestände. Der wohl bekannteste Vertreter ist der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*, Chrysomelinae). Bei einem Großteil der Blattkäfer findet der gesamte Lebenszyklus von den Eiern über die Larven bis hin zu den Imagines auf den Blattoberflächen ihrer Wirtspflanzen statt. Deshalb sind alle Entwicklungsstadien dieser Blattkäfer verschiedenen äußeren Einflüssen ausgesetzt, die den Fortbestand bedrohen können. Prädatoren<sup>1</sup>, wie Vögel, Spinnen oder räuberische Ameisen, finden unter den Käfern ein reichhaltiges Nahrungsangebot. Aber die Insekten sind auch mikrobiellen Einflüssen durch Pilze, Bakterien und Hefen ausgesetzt<sup>[23, 43, 49, 50]</sup>. Als Reaktion auf diese ständige Bedrohung hat sich im Laufe der Evolution innerhalb der Käfer eine enorme Vielfalt an Verteidigungsstrategien heraus gebildet. Dazu gehören physische Eigenheiten der Imagines, Larven und Eier, bestimmte Verhaltensweisen sowie auch chemische Verteidigungsstrategien. Zu den körperlichen Charakteristika zählen aposematische Färbungen<sup>2</sup> bei Imagos, Larven und Eiern, Mimikry<sup>3</sup>, die starren Flügelschilde (Elytren) vieler Käfer und die zähe Kutikula der Larven<sup>[3, 13, 14, 27, 59, 60, 66, 82]</sup>. Verhaltensweisen, wie die Gruppenbildung (z.B. Cycloalexie), Abwehrposen, das Hervorwürgen von Darminhalt oder Beißen, tragen zur Verteidigung bei<sup>[65, 68, 133, 134]</sup>. Die chemischen Verteidigungsstrategien der Käfer und Larven sind auffallend vielfältig, was nicht zuletzt daran liegt, dass viele Spezies phytophage<sup>4</sup> Insekten sind. Deshalb ist die Wehrchemie vieler Käfer ähnlich vielfältig wie die chemische Konstitution ihrer Wirtspflanzen und damit eng verknüpft. Ein eindrucksvolles Beispiel der Verknüpfung von physischer und chemischer Abwehr zeigen die Fäkalschilde bestimmter Blattkäferlarven

---

<sup>1</sup> Prädatoren: Fraßfeinde

<sup>2</sup> Aposematische Färbung: Warntracht









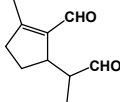
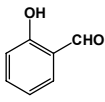



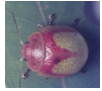





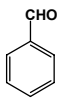
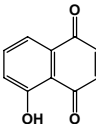
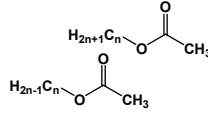
<sup>3</sup> Mimikry: Tarnung durch Nachahmung, z.B. der Umweltfärbung oder Struktur

<sup>4</sup> Phytophagie: sich von Pflanzen ernährend

(Criocerinae, Hispinae, Cassidinae)<sup>[3, 24, 31, 99]</sup>. Dieses „Schutzschild“ schützt die Larven nicht nur physikalisch, sondern sie enthalten u.a. auch Pheophorbide als Abbauprodukte des Chlorophylls zur chemischen Abwehr von Ameisen<sup>[137]</sup>.

Innerhalb der Blattkäferlarven zeigt sich eine extrem große Bandbreite an Wehrsubstanzen. So finden sich Iridoide<sup>1</sup> (*Chrysomelina*, *Phyllodectina*), Aldehyde (Salicylaldehyd) (*Chrysomelina*), Naphthochinone (Juglon) (*Chrysomelina*), Ester (Phenylethylester, Alkyl- oder Alkenylacetate) (*Chrysomelina*), Säuren (Ölsäure) (*Chrysomelina*), HCN und Benzaldehyd (*Chrysomelina*, *Paropsina*)<sup>[5, 11, 63, 106, 108, 111]</sup> (Tab.: 1-1).

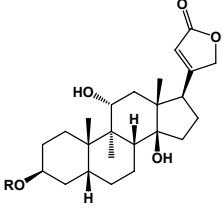
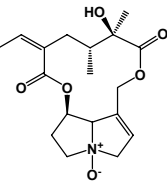
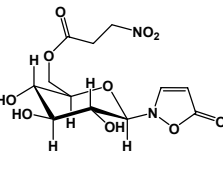
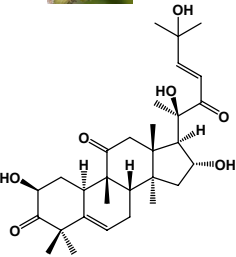
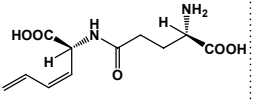
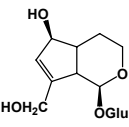
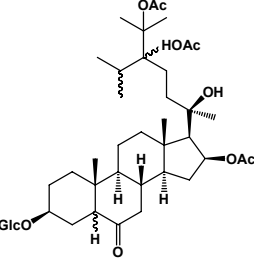
**Tabelle 1-1: Übersicht über Wehrsubstanzenklassen innerhalb der Blattkäferlarven**<sup>[11, 100-102, 104, 106, 111]</sup> (Fotos: [www.insects.jp](http://www.insects.jp), [www.koleopterologie.de](http://www.koleopterologie.de), [www.padil.gov.au](http://www.padil.gov.au) (08.05.2009)).

Spezies	<i>Linnaeidae aenea</i>	<i>Chrysomela populi</i>	<i>Chrysomela lapponica</i>	<i>Gastrophysa cyanea</i>
Larve	 	 	 	 
Wehrsubstanz				Ölsäure
Substanzklasse	Iridoide	Aldehyde	Ester	Säuren
Spezies	<i>Chrysomela 20-punctata</i>	<i>Paropsis atomaria</i>	<i>Gastrolina depressa</i>	<i>Gastrophysa atrocyanea</i>
Larve	 	 	 	 
Wehrsubstanz		HCN		
Substanzklasse	Aldehyde	HCN	Juglone	Alkyl- und Alkenylacetate

<sup>1</sup> Iridoide: Methylcyclopentanoide Monoterpen

Doch auch die Käfer verteidigen sich mit chemischen Substanzen. Diese sind strukturell häufig anders als die der Larven. Es finden sich hier 3-Nitropropionate des  $\Delta^3$ -Isoxazolin-5-onglucosids<sup>[77, 110]</sup> (Chrysomelinae), Pyrrolizidinalkaloide<sup>[109]</sup> (Chrysomelinae), Cardenolide<sup>1</sup> (Chrysomelinae), Anthrachinone und Cucurbitacine<sup>2</sup> (Galerucinae)<sup>[90, 110]</sup>, Iridoidglycoside (Alticinae) und Aminosäurederivate, wie das  $\gamma$ -Glutamyl-dipeptid (Chrysomelinae)<sup>[5]</sup> (Tab.: 1-2).

**Tabelle 1-2: Übersicht über Wehrsubstanzenklassen innerhalb der Blattkäfer** <sup>[37, 110, 144]</sup> (Fotos: [www.insects.jp](http://www.insects.jp), [www.koleopterologie.de](http://www.koleopterologie.de), [www.padil.gov.au](http://www.padil.gov.au) (08.05.2009)).

Spezies	<i>Oreina gloriosa</i>	<i>Oreina speciosissima</i>	<i>Chrysomela lapponica</i>	<i>Diabrotica balteata</i>
Wehrsubstanz				
Substanzklasse	Cardenolide	Pyrrolizidin-N-oxide	3-Nitropropionate des $\Delta^3$ -Isoxazolin-5-onglucosids	Cucurbitacine
Spezies	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Longitarsus melanocephalus</i>	<i>Chrysolina brunsvicensis</i>	
Wehrsubstanz				
Substanzklasse	Aminosäurederivate	Iridoidglycoside	Polyoxygenierte Steroidglycoside	

<sup>1</sup> Cardenolide: C-23-Steroide mit CH<sub>3</sub>-Gruppen an C-10 und C-13, sowie ungesättigtem  $\gamma$ -Lacton an C-17

<sup>2</sup> Cucurbitacine: tetracyclische Triterpene mit dem Grundgerüst des Gonans

Die Eier, die oftmals leuchtend gefärbt sind, werden im Blattwerk abgelegt. Damit sind sie ebenfalls stark durch Prädatoren gefährdet. Studien an *Plagioderma versicolora* zeigten, dass die Eier nur eine Überlebensrate von 25% aufweisen und dass Gelege bis zu 50% zerstört werden können. Für diese Schäden werden Zugvögel, Wanzenlarven, räuberische Käfer und Larven, Schwebfliegenlarven, Ei-Parasiten oder Kannibalismus verantwortlich gemacht. Dadurch ist ein großer Selektionsdruck vorhanden, dem die Larven mit chemischer Verteidigung begegnen<sup>[104, 113]</sup>. Die Käfer sequestrieren<sup>1</sup> ihre Wehrsubstanzen in die Eier, so dass sich die Wehrchemie der Adulten und der Eier sehr ähnelt. Auch hier finden sich Cardenolide (Chrysolina)<sup>[26, 55, 103]</sup>, Isoxazolinoglucooside (Chrysomelina, Phyllodectina)<sup>[104]</sup>, Salicin (die meisten *Chrysomela* Spezies)<sup>[107, 112]</sup>, Cucurbitacine (Galerucinae)<sup>[37, 54]</sup>, Anthrachinone (Galerucinae)<sup>[54, 56, 57]</sup> oder Ölsäure (*Gastrophysa cyanea*, Chrysomelinae)<sup>[63, 104]</sup>.

## 1.2 Evolution der Wehrchemie innerhalb der Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae)

Innerhalb der Chrysomelina-Larven (z.B. *Chrysomela lapponica*<sup>2</sup>) ist eine spezielle, besonders eindrucksvolle Art der chemischen Verteidigung zu beobachten (Abb.: 1-1, 1-4).

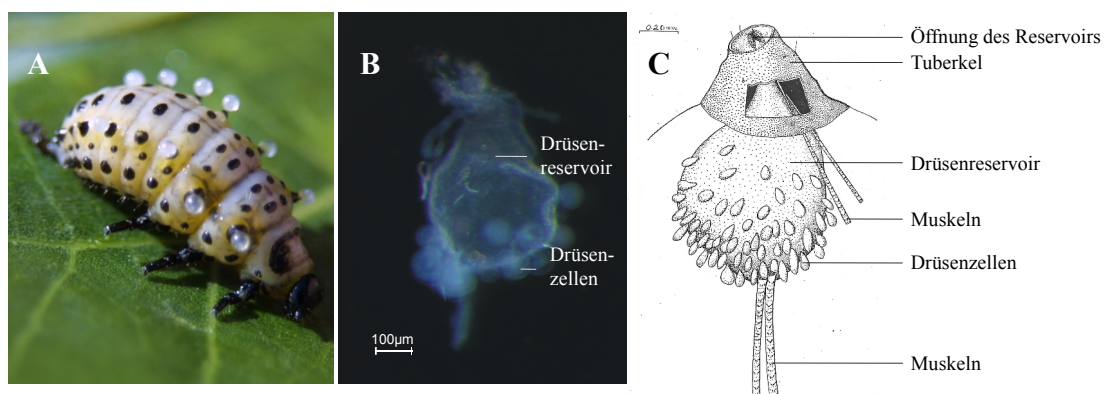


Abbildung 1-1: (A) Foto einer *Chrysomela populi* Larve mit ausgestülpten Reservoiren (©Antje Burse), (B) Bild eines Drüsenreservoirs mit Drüsenzellen von *C. lapponica* (©Roy Kirsch) und (C) Detailzeichnung einer Drüse von *Chrysomela tremula*, modifiziert nach Hinton<sup>[59]</sup>.

<sup>1</sup> Sequestrierung: Aufnahme und Speicherung pflanzenbürtiger Stoffe

<sup>2</sup> auch *Melasoma lapponica*



Sie besitzen neun paarige Drüsen auf ihrem Meso- und Metathorax, sowie auf den ersten sieben Abdominalsegmenten. Das Drüsensystem besteht aus dem Drüsenreservoir, welches mit sekretorischen Drüsenzellen verbunden ist. Im Falle eines Angriffs durch Predatoren stülpen sie durch Erhöhung des Hämolympfdrucks oder Muskeleinsatz ihre Drüsenreservoirs aus und präsentieren kleine Tropfen ihres Wehrsekrets. Das Wehrsekret kann wieder eingezogen werden<sup>[40, 62]</sup> und bis zum nächsten Angriff im Reservoir gespeichert werden.

Innerhalb der Chrysomelina haben sich im Laufe der Evolution drei verschiedene Biosynthesewege heraus gebildet:

- A** Die *de novo* Synthese iridoider Monoterpene über den Acetat-Mevalonatweg<sup>[36, 87, 135]</sup>
- B** Die Sequestrierung von Glucosiden<sup>[111, 112]</sup>
- C** Die Kombination aus Sequestrierung und Veresterung glucosidisch gebundener Blattalkohole mit *de novo* produzierten Säuren<sup>[14, 58, 121]</sup>

Wie die phylogenetische Analyse in Abbildung 1-2 zeigt, ist das Auftreten der verschiedenen Biosynthesewege eng mit dem Vorkommen an bestimmten Wirtspflanzen verbunden<sup>[132]</sup>. Die basale Gruppe der Iridoidproduzenten (rot) ist nicht auf den Eintrag von Vorläufersubstanzen zum Aufrechterhalten der Wehrchemie angewiesen. Das erleichterte den Wirtspflanzenwechsel und führte zu einer Vielfalt an Wirtspflanzen, wie der Stammbaum in Abbildung 1-2b sie repräsentiert.

Die Sequestrierer (grün) benötigen zur Produktion ihrer Wehrsubstanz Salicylaldehyd den pflanzlichen Präkursor Salicin. Dieses kommt vorrangig in Weidengewächsen (*Salix* ssp.) vor. Aus diesem Grund zeigt sich hier die Spezialisierung auf nur eine Wirtspflanze, der Familie der Salicaceae. Die höher entwickelte Interrupta-Gruppe (blau), die nach der Spezies *Chrysomela interrupta* benannt wurde, zeigt das Vorkommen an zwei verschiedenen Wirtspflanzen, nämlich an Salicaceae und Betulaceae. Einige Spezies der Interrupta-Gruppe verteidigen sich mit dem von Salicin abgeleiteten Salicylaldehyd. Allerdings zeigte Zvereva<sup>[147]</sup>, dass Salicylaldehyd nicht nur abwehrend, sondern auch anziehend auf bestimmte Parasitoide, wie die Fliege *Megaselia opacicornis* wirkt. Durch den hohen prädativen Druck

wechselten einige Spezies auf Betulaceae, die kein oder wenig Salicin enthalten. Die Fähigkeit zur kombinierten Biosynthese erleichterte dabei den Wirtspflanzenwechsel, da durch die Esterproduktion die chemische Verteidigung aufrechterhalten werden kann.

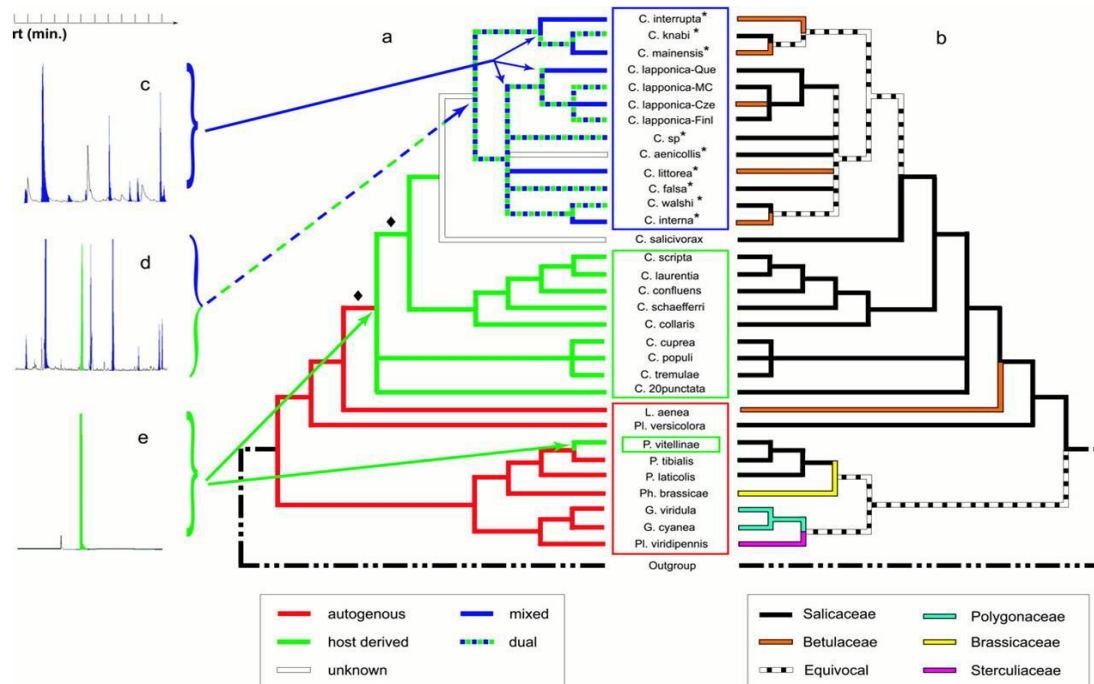


Abbildung 1-2: (a) Maximum parsimony- (MP) Rekonstruktion<sup>1</sup> der Strategien chemischer Verteidigung; rot, *de novo* Synthese iridoide Monoterpene; grün, Sequestrierung aromatischer Glucoside; blau, Sequestrierung und Veresterung glucosidisch gebundener Blattalkohole mit *de novo* produzierten Säuren. (b) MP-Rekonstruktion der Wirtspflanzenassoziation. (c-e) Typische Gaschromatogramme: (c) Esterproduktion (blau) im gemischten Metabolismus, (d) dualer Einsatz von gemischter Biosynthese (blau) und Salicylaldehydproduktion (grün), (e) Salicylaldehydproduktion (grün) nach Sequestrierung von Salicin. Nach Termonia *et al.*<sup>[132]</sup>.

### 1.2.1 Ökonomie biochemischer Reaktionen

Eng verknüpft mit der „Wahl“ des Biosyntheseweges ist die Ökonomie, d.h. das Aufwand-Leistungs-Verhältnis der chemischen Verteidigung. Die chemische Verteidigung wird häufig mit ihren energetischen Kosten in Verbindung gebracht. Im Allgemeinen wird angenommen, dass jeder Verlust der Fitness, der durch die Kosten der chemischen Verteidigung aufgebracht werden muss, durch den Gewinn an effektiver Verteidigung kompensiert werden muss<sup>[11]</sup>. Als Kosten werden dabei alle

<sup>1</sup> minimaler Austausch an Nucleotiden (bzw. an Aminosäuren), um von der ursprünglichen Sequenz an der Basis des Baumes zu den heutigen Sequenzen zu gelangen

Quellen, wie z.B. Aminosäuren, Glucose oder ATP, bezeichnet, die zur Synthese oder Speicherung von Wehrsubstanzen dienen. So müssen Edukte für die *de novo* Synthese produziert werden, Enzyme werden zur Katalyse von biochemischen Reaktionen benötigt und sequestrierte Substanzen müssen aus dem Darm heraus transportiert, gespeichert und gegebenenfalls detoxifiziert werden<sup>[19]</sup>.

Der Wechsel von der aufwändigen *de novo* Synthese von Iridoiden zur kostengünstigen Sequestrierung von Salicin resultiert in einer zusätzlichen Aufnahme des Nährstoffes Glucose in den Organismus. Die Menge an sequestrierter Glucose kann dabei bis zu einem Drittel des täglichen Kalorienbedarfs der Larven decken. Das wirkt sich positiv auf den larvalen Energiehaushalt aus und korreliert mit einer gesteigerten relativen Wachstumsrate der Larven. Sequestrierende Spezies (z.B. *Chrysomela populi*, *Phratora vitellinae*) produzieren ein drei- bis vierfach größeres Volumen an Wehrsekret als die *de novo* Produzenten<sup>[117]</sup>. Sie sind zudem in der Lage, durch das große externe Angebot an Salicin in den Salicaceae diese Substanz in die Eier zu sequestrieren. Zusätzlich werden Isoxazolinogluco-side und deren 3-Nitropropionate in die Eier sequestriert. Diese Substanzen haben sich als höchst abwehrend und giftig gegen die Ameisenspezies *Myrmica rubra* erwiesen. Dadurch sind die Eier ebenfalls vor Predatoren geschützt<sup>[104, 117, 140]</sup>. Ein Nachteil der Sequestrierung wird deutlich, wenn die Spezies aufgrund von hohem prädativen Druck oder einer Verkleinerung des Nahrungsangebots durch Kompetitoren zu einem Wirtspflanzenwechsel gezwungen werden. In diesem Fall verlieren die Spezies bei fehlenden Präkursoren möglicherweise vollständig ihre chemische Verteidigung. Die Möglichkeit zur kombinierten Biosynthese eröffnet so die Möglichkeit, in diesem Fall auf die *de novo* Synthese von Wehrsubstanzen zurückzugreifen. Dadurch bleibt die chemische Verteidigung erhalten. Die Rückkehr zur Sequestrierung ist dann abhängig von der physiologischen Ausstattung des Insekts mit geeigneten Transportern und Enzymen zur Produktion von Wehrsubstanzen. Eine kombinierte Biosynthese, wie *Chrysomela lapponica* sie durchführt, ist dabei relativ ungewöhnlich, denn diese Spezies (und alle anderen der Interrupta-Gruppe<sup>[14]</sup>) produziert einen extrem großen und vielfältigen Pool an Wehrsubstanzen durch den simultanen Einsatz und die Verknüpfung beider Strategien. Durch eine breite Substrattoleranz ihrer Transporter und Enzyme ist es möglich, auch strukturell verschiedene Substanzen der neuen Wirtspflanze für die Biosynthese von Wehrsubstanzen zu akquirieren.

### 1.2.2 Kombinierte Biosynthese in anderen Spezies

Die Strategie einer kombinierten Biosynthese ist von Vorteil, weil durch *de novo* Synthese die Abhängigkeit von einer bestimmten Wirtspflanze reduziert wird. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, durch Sequestrierung eine relativ kostengünstige Strategie der Biosynthese zu realisieren. Blattkäfer der Gattung *Oreina* machen sich eine solche Strategie zu Nutze, indem sie zwischen der *de novo* Synthese von Cardenoliden und Sequestrierung von Pyrrolizidinalkaloid(PA)-*N*-oxiden wechseln. Welche Strategie eingesetzt wird, hängt von der Verfügbarkeit von PA-enthaltenden und nicht PA-enthaltenden Wirtspflanzen ab<sup>[105]</sup>. Iridoid-produzierende Larven der Spezies *Plagiodera versicolora* und *Phratora laticollis* sind in der Lage zwischen der *de novo* Synthese des Iridoid-Vorläufers 8-OH-Geraniolglucosid und der Sequestrierung dieses Edukts aus Pflanzen zu wechseln. So kann auch im Falle eines Wirtspflanzenwechsels die chemische Verteidigung aufrechterhalten werden<sup>[76]</sup>. Auch außerhalb der Ordnung der Käfer findet sich ein solches Phänomen. Schmetterlings-Larven der Spezies *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) besitzen die Fähigkeit, in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenchemie (*Passiflora* ssp.) entweder Monoglucosyl-Cyclopentenyl-Cyanogene zu sequestrieren oder aliphatische cyanogene Glucoside *de novo* aus Aminosäuren herzustellen<sup>[33]</sup>.

### 1.3 Der Blattkäfer *Chrysomela lapponica*

Während viele sequestrierende Spezies Wirtspflanzen einer bestimmten Familie fressen, wurde für einen Vertreter der Interrupta-Gruppe bereits nachgewiesen, dass er in der Lage ist, mit Wirtspflanzen unterschiedlicher Familien umzugehen. *Chrysomela lapponica* ist innerhalb der Interrupta-Gruppe die einzige Spezies, deren allopatrische<sup>1</sup> Populationen entweder auf Weiden- (Salicaceae) oder Birkengewächsen (Betulaceae) leben<sup>[34, 46, 48, 88]</sup>. Die kasachische Population aus der Westaltai-Region ist sogar in der Lage, parallel auf beiden Wirtspflanzen-Spezies zu fressen (Abb.: 1-3).

---

<sup>1</sup> Allopatrie: das Nicht-Überschneiden, d.h. die vollständige räumliche Trennung, der Verbreitungsgebiete von Arten, Unterarten oder Populationen

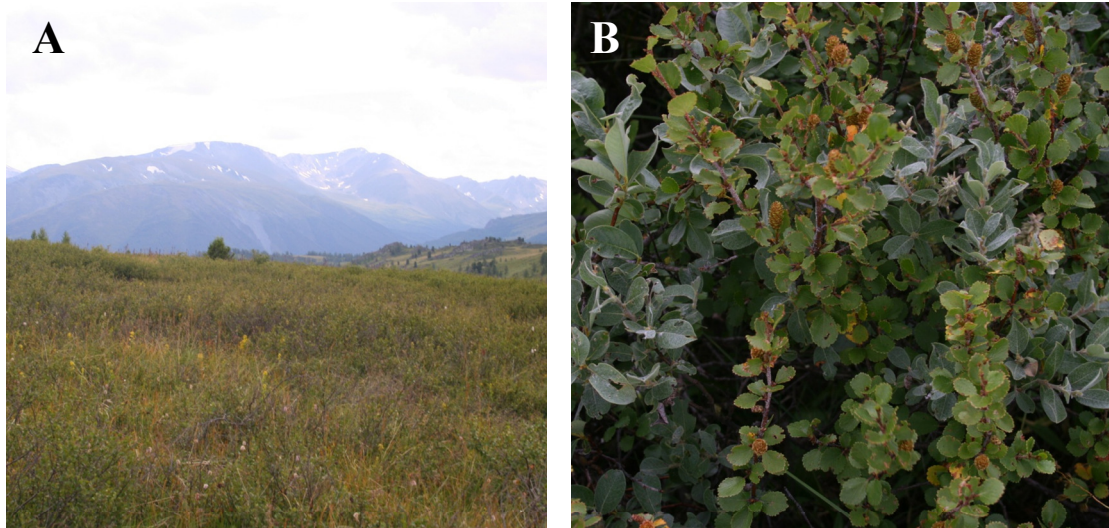


Abbildung 1-3: (A) Fundort der kasachischen *Chrysomela lapponica* Population im Westaltai. (B) Ineinanderwachsende Weiden und Birken, auf denen die Larven parallel fressen können (©Wilhelm Boland).

*C. lapponica* ist nur in der Paläarktis verbreitet und hier von Nordlappland bis zu den Pyrenäen, und vom östlichsten Teil Russlands (Kamchatka) bis Nordjapan anzutreffen<sup>[89, 125]</sup>. Während die Art in Nordeuropa relativ kontinuierlich verbreitet ist, beschränken sich die Vorkommen in Mitteleuropa auf einzelne inselartige, meist höher gelegene, kühle und feuchte Biotope<sup>[45, 70]</sup>.



Abbildung 1-4: *Chrysomela lapponica*. (A) Imago (©Karla Tolzin-Banasch), (B) Larve (©Kerstin Ploß).

*Chrysomela lapponica* ist als Vertreter der Interrupta-Gruppe in der Lage, in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenchemie sowohl Salicylaldehyd als auch die bereits beschriebenen Ester (Kap.: 1.2) zu biosynthetisieren. Die Biosynthese der Ester in den Larven ist noch nicht eingehend untersucht worden. Bereits bekannt ist,



dass die Ester durch eine kombinierte Biosynthese hergestellt werden. Glucosidisch gebundene Blattalkohole werden in das Drüsenreservoir transportiert<sup>[74]</sup>. Dort wird die Glucose-Einheit durch eine Glucosidase abgespalten, so dass der Alkohol frei vorliegt. Diesen Teil der Biosynthese bezeichnet man als Sequestrierung. Der Acylrest wird *de novo* aus dem internen larvalen Aminosäurepool gebildet<sup>[12, 121]</sup>. Im Reservoir findet schließlich die Acylierung der Alkohole mit Hilfe einer Acyltransferase<sup>[73]</sup> statt und die Ester werden gebildet. Über den Mechanismus der Acylierungsreaktion, die Natur des reaktiven Acyldonors, sowie den Ort des Aminosäureabbaus zu Säuren ist bisher nichts bekannt.

Zur Untersuchung des Transports von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen wurden bereits 2001 in dieser Arbeitsgruppe Thioglucoside eingeführt. Feld<sup>[35, 36]</sup> und später auch Kuhn<sup>[73-75]</sup> untersuchten die Transporteigenschaften der Thioglucoside in das Drüsenreservoir mit diesen synthetischen Analoga der Blattalkoholglucoside. Thioglucoside als Schwefelanaloga der natürlichen Glucoside ähneln den natürlichen *O*-Glucosiden stark in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Der wesentliche Unterschied zu den *O*-Glucosiden besteht in der Beständigkeit gegenüber hydrolysierenden Enzymen wie beispielsweise Glucosidasen<sup>[73]</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaft konnte nachgewiesen werden, dass das Aglucon erst im Reservoir abgespalten wird. Zudem sind die Glucosidtransporter in *C. lapponica* gegenüber ausschließlich sequestrierenden Spezies oder *de novo* Produzenten zwar hochselektiv für Glucoside, nicht aber spezifisch für das Aglucon<sup>[73]</sup>.

Der Ursprung des Acylrests der Ester wurde in Analogie zu anderen Spezies in Aminosäuren vermutet. Ein Nachweis dieses Biosyntheseweges erfolgte 1997 von Schulz *et al.*, indem [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-Valin in die Larven injiziert und der Einbau in Isobutyrate mit GC-MS verfolgt wurde<sup>[121]</sup>.

Trotz dieser Ergebnisse konnte in der Vergangenheit leider kein detaillierter Biosyntheseweg für die Esterproduktion postuliert werden. Und obwohl vielfältige Anstrengungen unternommen wurden, den enzymatisch katalysierten Schritt der Veresterung aufzuklären<sup>[73]</sup>, gibt es bis heute keinen sinnvollen Vorschlag für diesen wichtigen Teilschritt der Biosynthese.

## 2 Aufgabenstellung

---

### Quantifizierung der Sekretinhaltsstoffe

Hilker und Schulz veröffentlichten 1994 eine Übersicht über die Zusammensetzung des Wehrsekrets von *C. lapponica* in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenchemie<sup>[58]</sup>. Diese Arbeit beinhaltet nicht die Quantifizierung der Substanzen. Das jedoch ist wichtig, um den Import von Wehrsubstanzvorstufen zu charakterisieren. Weiterhin stellt sich die Frage, ob es Präferenzen für den Import bestimmter Substanzen gibt und ob hochkonzentrierte Hauptsubstanzen mit entsprechendem toxischen Potential vorhanden sind? Zudem ist es von Interesse, die Wehrchemie der verschiedenen Populationen von *C. lapponica* untereinander und mit der anderer Arten zu vergleichen, um Rückschlüsse auf die evolutionäre Entwicklung zu ziehen. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit die wesentlichen Substanzen im Sekret von *C. lapponica* identifiziert und quantifiziert werden.

### Korrelation Wehrsubstanzen vs. Wirtspflanzenchemie

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Untersuchungen zum Transport von glucosidisch gebundenen Wehrsubstanzvorstufen in das Reservoir durchgeführt<sup>[74, 75]</sup>. Diese wurden allerdings mit synthetischen Thioanaloga der natürlichen *O*-Glucoside und unnatürlichen (hohen) Konzentrationen durchgeführt. Aus diesem Grund sind die daraus gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf die natürliche Transportkapazität und Selektivität nur bedingt aussagekräftig. Um eine Aussage über das natürliche Ausmaß des Transports treffen zu können, soll in dieser Arbeit die Zusammensetzung des Wehrsekrets mit der Zusammensetzung der entsprechenden Vorstufen in der Wirtspflanze verglichen werden.

### Insektizide und mikrobiologische Wirksamkeit des Wehrsekrets

Daran schließt sich die Frage nach der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen auf verschiedene Organismen an. Bisherige Arbeiten über das Wehrsekret von *C. lapponica* zeigten lediglich, dass Salicylaldehyd sowohl abwehrend auf Ameisen als auch antimikrobiell wirkt. Es soll nun gezeigt werden, welche anderen Substanzen im

larvalen Sekret eine Wirkung auf ausgewählte Bakterien, Hefen und Pilze haben. Daraus kann möglicherweise auch ein Wirkmechanismus abgeleitet werden.

#### Aufklärung der Teilschritte der Biosynthese

Im Gegensatz zu anderen Spezies der Chrysomelina, die auf bestimmte Wirtspflanzen festgelegt sind, gibt es bei *C. lapponica* allopatrische Populationen auf Weide und Birke. Eine kasachische Population ist sogar in der Lage, abwechselnd auf Birke und Weide zu fressen. Diese Flexibilität erfordert ein hohes Maß an Anpassungsfähigkeit, insbesondere weil die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in beiden Wirtspflanzen spezialisiert stark variieren. Die Wehrchemie von *C. lapponica* basiert auf einem Import von glucosidisch gebundenen Pflanzeninhaltsstoffen. Um bei einer Veränderung der Pflanzeninhaltsstoffe die Verteidigung trotzdem aufrechterhalten zu können, muss die Biosynthese (Enzyme, Transporter) flexibel genug sein, um auf diese Änderungen zu reagieren. Die Strategie der gemischten Biosynthese von Estern, wie sie in der Interrupta-Gruppe beobachtet wird, ist bisher nur in Ansätzen untersucht worden. Aufgrund der enormen Vielfalt an Wehrsubstanzen in den Sekreten wird ein hocheffektiver und genereller Acylierungsmechanismus vermutet. In dieser Arbeit soll nun der genaue Biosyntheseweg der Ester untersucht werden, um die enorme Anpassungsfähigkeit zu erklären.

#### Lokalisierung der Biosynthese

Von weiterem Interesse ist die Lokalisierung der einzelnen Teilschritte der Biosynthese. Finden alle Schritte in dem abgeschlossenen System der Drüsenreservoir statt oder sind die Teilschritte in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert? Von anderen Spezies der Chrysomelina ist bereits bekannt, dass die frühen Stufen der Iridoidbiosynthese, nämlich die Bildung des glucosidisch gebundenen 8-OH-Geraniols, im Fettkörper und erst die Cyclisierung zum Iridoid im Reservoir stattfindet<sup>[22]</sup>. Möglicherweise ist auch in die Esterbiosynthese bei *C. lapponica* nicht nur das Reservoir, sondern auch der metabolisch hochaktive Fettkörper involviert.

#### Ausmaß *de novo* Synthese vs. Sequestrierung

Von *C. lapponica* Larven ist bereits bekannt, dass sie einen Teil ihrer Wehrsubstanzen sowohl sequestrieren als auch *de novo* produzieren können. Das Ausmaß und die Flexibilität soll in dieser Arbeit im Detail mit Hilfe der Isotopenmassenspektrometrie



untersucht werden. Das gibt Aufschluss darüber, wie anpassungsfähig die Larven an neue Umweltbedingungen sind und ob sie einen evolutiven Vorteil aus der Fähigkeit zur kombinierten Bioynthese ziehen können.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

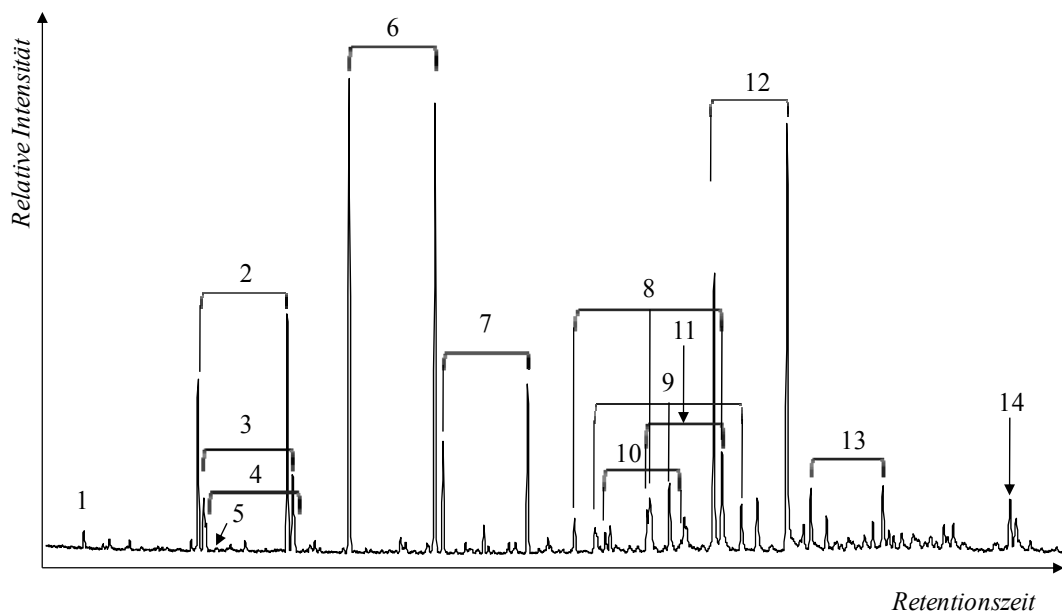
---

#### 3.1 Qualitative Analyse des Wehrsekrets von *Chrysomela lapponica* Larven

In vergangenen Arbeiten wurden bereits Anstrengungen unternommen, die Vielfalt der Wehrsekretinhaltsstoffe in den allopatrischen Populationen von *C. lapponica* zu charakterisieren<sup>[47, 48, 58]</sup>. Innerhalb der Interrupta-Gruppe variiert die Zusammensetzung der Wehrsekrete relativ stark. Diese Variation ist zum einen auf die unterschiedliche Wirtspflanzenchemie zurückzuführen. Zum anderen spielen aber noch evolutive Aspekte eine Rolle, wie die Rekrutierung bestimmter Enzyme aus dem Primärstoffwechsel, die dann in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten involviert sind.

Besonders schön lässt sich die Auswirkung einer unterschiedlichen Wirtspflanzenchemie an den allopatrischen Populationen von *C. lapponica* studieren (Populationen auf Weide: Frankreich, Finnland, Deutschland, Population auf Birke: Tschechien, Population auf Weide und Birke: Kasachstan). Ist in der Pflanze Salicin enthalten, so ist die Hauptkomponente im Sekret Salicylaldehyd. In den Birke fressenden Populationen dominieren hingegen die Blattalkoholester. Andererseits spielen aber noch evolutive Aspekte eine Rolle. So kommen in Weiden neben Salicin auch andere glucosidisch gebundene Vorstufen vor. Die Weide fressenden Populationen sind durchaus in der Lage Ester herzustellen. Aber die für die Herstellung von Salicylaldehyd aus Salicin notwendige Salicylalkoholoxidase<sup>[20, 92, 136]</sup> scheint sehr viel aktiver (ähnlich wie in den sequestrierenden Spezies) als die Acyltransferase zu sein, die in die Esterproduktion involviert ist. Zudem sind vielleicht die Importsysteme spezialisiert auf Salicin. Das ist typisch für sequestrierende Spezies, wie *Chrysomela populi*. Ihr Transportsystem importiert selektiv Salicin (Discher *et al.*, ChemBioChem 2009, accepted), auch wenn andere Vorstufen angeboten werden.

Um der Frage nachzugehen, welches Substanzspektrum die bisher nicht untersuchte kasachische Population aufweist, wurde das Sekret einer qualitativen Analyse unterzogen. Die Analyse des Wehrsekrets dieser auf *Betula nana* lebenden Larven zeigte, wie alle auf Birke lebenden Populationen, eine große Vielfalt an enthaltenen Substanzen (Abb.: 3-1). Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich mit synthetischen Standards oder Spektren aus der Literatur.



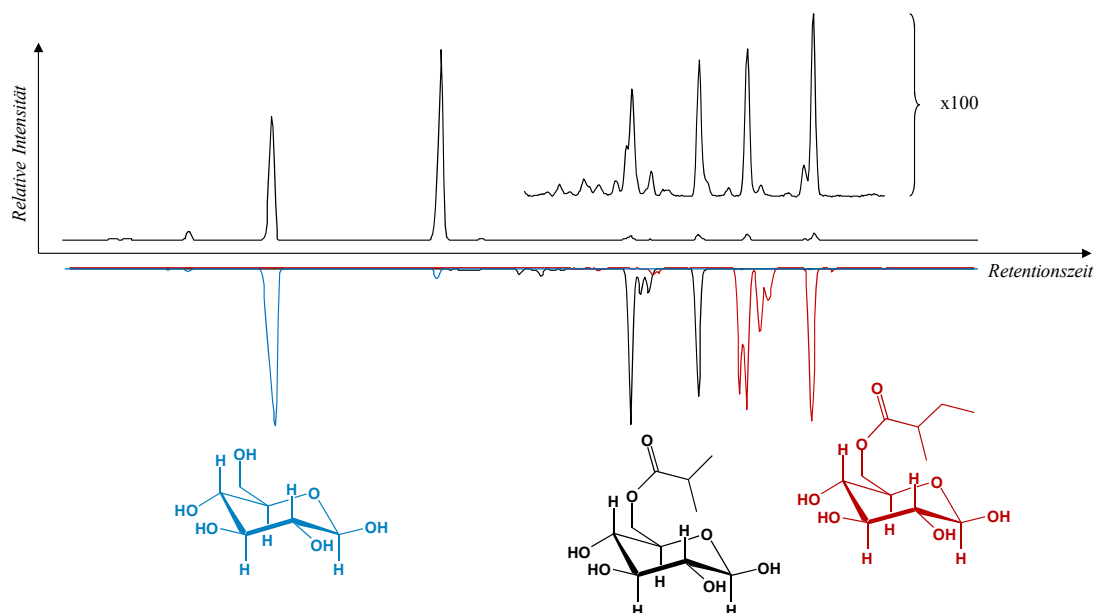
#	Substanz	#	Substanz
1	Benzylalkohol*	8b	Mischung von 1,3-Hexandiyl-1-isobutyrat-3-(2-methylbutyrat) <sup>#</sup> , 1,3-Hexandiyl-1-(2-methylbutyrat)-3-isobutyrat <sup>#</sup>
2a	(Z)-3-Hexenylisobutyrat*	8c	1,3-Hexandiyl-1,3-di-2-methylbutyrat <sup>#</sup>
3a	Hexylisobutyrat*	9	?-diester <sup>#</sup>
4a	5-Hexenylisobutyrat <sup>#</sup>	10a	8-OH-Geranylisobutyrat <sup>#</sup>
5	Benzoessäure*	11a	8-OH-Linalylisobutyrat*
2b	(Z)-3-Hexenyl-2-methylbutyrat*	10b	8-OH-Geranyl-2-methylbutyrat <sup>#</sup>
3b	Hexyl-2-methylbutyrat*	11b	8-OH-Linalyl-2-methylbutyrat*
4b	5-Hexenyl-2-methylbutyrat <sup>#</sup>	12a	p-OH-Phenylethylisobutyrat*
6a	Benzylisobutyrat*	12b	p-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat*
6b	Benzyl-2-methylbutyrat*	13a	Betuligenolisobutyrat*
7a	Phenylethylisobutyrat*	13b	Betuligenol-2-methylbutyrat*
7b	Phenylethyl-2-methylbutyrat*	14	Methylinolenat*
8a	1,3-Hexandiyl-1,3-diisobutyrat <sup>#</sup>		

**Abbildung 3-1: GC-MS-Analyse der leichtflüchtigen Bestandteile des Sekrets von *Chrysomela lapponica* (Wirtspflanze: *Betula nana*) und Identifizierung der Hauptsubstanzen. \*Identifizierung durch synthetische Standards, <sup>#</sup>Identifizierung durch Spektrenvergleich.**

Die GC-MS-Messungen ergaben, dass Isobuttersäure- und 2-Methylbuttersäureester von Blattalkoholen den größten Anteil in der Birke fressenden Populationen aus Kasachstan darstellen. Daneben treten in geringer Menge auch Benzoate auf. Freie

Alkohole und Säuren konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde in bestimmten Weide fressenden Populationen, wie der finnischen Population, ein ganz anderes Substanzspektrum nachgewiesen. Hier sind die Hauptsubstanzen Salicylaldehyd, sowie Methyl- und Ethylester langkettiger gesättigter und ungesättigter Fettsäuren.

Die MSTFA-Derivatisierung des Sekrets von kasachischen *C. lapponica* Larven und anschließende GC-MS-Analyse ergab, dass eine erhebliche Menge Glucose im Wehrsekret vorhanden ist. Analog zu den Blattalkoholen und deren Estern wurden erstmals auch Glucose-6-*O*-isobutyrate und Glucose-6-*O*-2-methylbutyrate nachgewiesen (Abb.: 3-2).



**Abbildung 3-2:** GC-MS-Analyse des Sekrets von kasachischen *Chrysomela lapponica* nach MSTFA-Derivatisierung und Vergleich mit synthetischen Standards.

Bei der chromatographischen Analyse der Zucker im Sekret konnten immer mehrere Struktur- (Pyranose, Furanose oder offene Ketalform) bzw. Konfigurationsisomere ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -Form) beobachtet werden, so dass sich ein recht komplexes chromatographisches Bild ergab, welches Glucose und den beiden Glucose-6-*O*-estern entspricht.

Aufgrund der Ionenserien und der relativen Intensitäten kann zwischen den verschiedenen Isomeren unterschieden werden (Tab.: 3-1). So ist das Ion  $m/z=319$

charakteristisch für Hexofuranosen und die Intensität des Ions  $m/z=204$  abhängig von der Ringgröße (Intensität: <5% (Furanose), 30-100% (Pyranose))<sup>[10, 130]</sup>.

**Tabelle 3-1: Übersicht über charakteristische Ionenserien der isomeren Glucosestrukturen.**

Isomer	Charakteristische $m/z$
$\alpha$ -Glucopyranose	73, 129, 147, 191, 204 (100%), 217, 305, 435
$\beta$ -Glucopyranose	
$\alpha$ -Glucofuranose	73, 147, 191, 205, 217 (100%), 319
$\beta$ -Glucofuranose	
Offene Ketalform	73, 103, 117, 129, 147, 191, 204 (100%), 217, 246, 273

Zwei- oder mehrfach acylierte Glucose konnte im Sekret nicht nachgewiesen werden. Ebenso wurden weder Galactose noch andere Monosaccharide im Sekret gefunden. Zuckerderivate, wie die Gluconsäuren, wurden im Sekret nicht identifiziert. Dieser Befund und die Abwesenheit von Disacchariden (Maltose, Sucrose, Lactose, Cellobiose) bestätigen frühere Arbeiten<sup>[35]</sup>.

Durch eine Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid konnten freie Säuren, wie Essigsäure, Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure und Benzoesäure im *C. lapponica* Sekret identifiziert und quantifiziert werden. In verschiedenen Käferspezies (Cantharidae, Carabidae, Dytiscidae und Tenebrionidae) wurden bereits freie Säuren im Wehrsekret nachgewiesen. So verteidigen sich Spezies der Familie der Laufkäfer (Carabidae) mit den kurzkettigen Vertretern Methansäure, Essigsäure, Methacrylsäure, Crotonsäure, *n*-Buttersäure, Isobuttersäure, Tiglinsäure oder *trans*-2-Hexansäure. Die Schwimmkäfer (Dytiscidae) verteidigen sich z.B. mit Benzoesäure oder *p*-OH-Benzoesäure. In bestimmten Spezies der Schwarzkäfer (Tenebrionidae) wurde bereits die längerkettige *n*-Oktansäure nachgewiesen. Nicht zuletzt verteidigen sich die Weichkäfer (Cantharidae) mit Dihydromatricarsäure<sup>[11]</sup>. Larven von *Gastrophysa cyanea* (Chrysomelinae) verteidigen sich mit Ölsäure<sup>[63]</sup>.

### 3.2 Quantifizierung der Sekretinhaltsstoffe mit GC-MS

Frühere Arbeiten zur Zusammensetzung des Wehrsekrets von *C. lapponica* Larven beinhalteten nicht die Quantifizierung der Inhaltsstoffe<sup>[47, 58]</sup>. Durch die Quantifizierung wird deutlich, dass im Sekret der Birke fressenden Population aus Tschechien sowie der Weide (*Salix caprea*) fressenden Population aus Deutschland Blattalkohole und deren Ester in annähernd äquimolaren Konzentrationen wie Glucose und die neu identifizierten Glucoseester vorliegen. In der kasachischen Population hingegen übersteigt die Glucose- und Glucoseesterkonzentration die der Blattalkohole um ein Sechsfaches. Die Ursache für die variierenden Glucosekonzentrationen in den Chrysomelina-Spezies ist in der biosynthetischen Strategie zu suchen und wird im Folgenden eingehend diskutiert.

#### 3.2.1 Glucose in Sekreten der Chrysomelina Spezies

Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe ergab, dass die kasachische Population von *C. lapponica* eine circa sechsfach höhere Menge an Glucose im Sekret aufweist, als theoretisch durch die Sequestrierung von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen importiert werden kann (Tab.: 3-3). Das gleiche Phänomen konnte bei *Chrysomela mainensis interna* beobachtet werden, einer Spezies der Interrupta-Gruppe, die in Alaska beheimatet ist und auf Erle lebt. Bei den anderen Spezies und Populationen trat dieses Phänomen nicht auf. Dort zeigte sich auf der Birke fressenden *C. lapponica* Population (Tschechien) ein annähernd äquimolares Verhältnis von Blattalkoholen und Glucose. Auf den salicinreichen Weide fressenden Populationen (Finnland und Frankreich) findet sich durchgehend ein deutlicher Überschuss an Blattalkoholen. Die Populationen aus Roché Sanadoire (Frankreich) und Oberrich (Deutschland), welche auf der salicinarmen *Salix caprea* fressen, zeigten ein ähnliches Sekretmuster in den Estern, Alkoholen und Glucose wie die Birke fressende Population aus Tschechien. Die untersuchte sequestrierende Spezies (*Chrysomela populi*) hat mit 22 µg Glucose pro mg Sekret eine ca. 14-fach höhere Menge an importiertem Salicylalkohol im Vergleich zur Glucosekonzentration. Durch die Spaltung der glycosidischen Bindung von Salicin wird hier zusätzlich Glucose importiert. Möglicherweise gibt es auch spezifische Glucose-Exporter, durch welche der Glucose-Rücktransport limitiert wird.

**Tabelle 3-2: Quantifizierung der Wehrsubstanzen in verschiedenen Populationen von *Chrysomela lapponica* und *Chrysomela mainensis interna*. n.d. nicht detektiert, - nicht bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibrierung mit jeweils drei Standardkonzentrationen.**

Ausgewählte Substanzen	<i>C. lapponica</i> auf <i>Betula nana</i> (Uryl, Kasachstan) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix caprea</i> (Roche Sanadoire, Frankreich) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Betula pubescens</i> (Kladská, Tschechien) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix borealis</i> (Kevo, Finnland) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix breviserrata</i> (Saint-Véran, Frankreich) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix caprea</i> (Oberrich, Deutschland) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. mainensis interna</i> auf <i>Alnus rugosa</i> (Fairbanks, Alaska, USA) lebend [ng/mg Sekret]
Essigsäure	216.7	-	-	-	-	-	-
Isobuttersäure	97.1	-	-	-	-	-	-
2-Methylbuttersäure	33.0	2781.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzaldehyd	n.d.	n.d.	n.d.	18.4	35.8	n.d.	n.d.
Benzylalkohol	30.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86.7
Salicylaldehyd	n.d.	14.5	33.0	291279	139256	n.d.	n.d.
Phenylethanol	n.d.	n.d.	n.d.	0.49	n.d.	n.d.	0.1
(Z)-3-Hexenylisobutytrat	374.3	531.3	776.2	n.d.	n.d.	114.7	0.5
Hexylisobutytrat	200.9	149.6	251.5	n.d.	n.d.	27.2	0.3
Benzoesäure	3.0	4780.3	n.d.	21.4	53.1	n.d.	4.7
(Z)-3-Hexenyl-2-methylbutytrat	968.6	1059.1	867.5	n.d.	50.2	228.7	3.3
Hexyl-2-methylbutytrat	277.8	174.0	275.0	n.d.	n.d.	37.8	1.2
2-OH-Benzylalkohol	n.d.	n.d.	n.d.	237.6	n.d.	n.d.	n.d.
Benzylisobutytrat	1552.0	218.5	599.6	8.3	50.3	33.7	1.3
8-OH-Linalool	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.8
Benzyl-2-methylbutytrat	891.0	198.8	470.2	5.8	63.2	24.2	3.9
Phenylethylisobutytrat	287.8	142.4	453.3	20.1	88.6	24.1	0.5
Phenylethyl-2-methylbutytrat	375.3	450.2	890.4	17.5	237.9	62.2	3.0
(Z)-3-Hexenylbenzoat	2.3	n.d.	n.d.	7.0	14.4	n.d.	0.6

Ausgewählte Substanzen	<i>C. lapponica</i> auf <i>Betula nana</i> (Uryl, Kasachstan) lebend	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix caprea</i> (Roche Sanadoire, Frankreich) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Betula pubescens</i> (Kladská, Tschechien) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix borealis</i> (Kevo, Finnland) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix breviserrata</i> (Saint-Véran, Frankreich) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. lapponica</i> auf <i>Salix caprea</i> (Oberriech, Deutschland) lebend [ng/mg Sekret]	<i>C. matniensis</i> interna auf <i>Alnus rugosa</i> (Fairbanks, Alaska, USA) lebend [ng/mg Sekret]
Phenylethylbenzoat	n.d.	n.d.	n.d.	18.0	n.d.	n.d.	n.d.
8-OH-Linalylisobutyrat	34.6	1703.3	5257.2	n.d.	n.d.	194.9	1.7
8-OH-Linalyl-2-methylbutyrat	47.6	2987.9	2512.8	n.d.	n.d.	258.2	5.1
<i>p</i> -OH-Phenylethylisobutyrat	2697.7	109.6	1183.3	n.d.	157.7	24.1	0.4
<i>p</i> -OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat	5551.3	255.4	1466.9	n.d.	265.7	96.3	1.0
Betuligenolisobutyrat	992.5	n.d.	1214.1	n.d.	n.d.	n.d.	0.2
Betuligenol-2-methylbutyrat	1068.7	n.d.	1068.7	n.d.	n.d.	n.d.	1.4
Glucose	84362.5	6889.0	10804.5	390.2	9735.5	486.7	801.2
Glucose-6- <i>O</i> -isobutyrat	4300.0	5470.9	380.7	n.d.	n.d.	146.6	66.9
Glucose-6- <i>O</i> -2-methylbutyrat	7075.0	6122.7	344.6	n.d.	n.d.	201.5	190.0
Palmitinsäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	503.8	83.8	n.d.	n.d.
Stearinsäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	203.3	44.7	n.d.	n.d.
Arachinsäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	27.3	n.d.	n.d.	n.d.
Linolsäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	77.4	16.9	n.d.	n.d.
Linolensäuremethylester	481.6	n.d.	n.d.	730.9	124.8	n.d.	n.d.
Nonadecansäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	10.0	n.d.	n.d.	n.d.
Ölsäuremethylester	n.d.	n.d.	n.d.	39.0	n.d.	n.d.	n.d.
Palmitinsäureethylester	n.d.	n.d.	n.d.	109.2	n.d.	n.d.	n.d.
Stearinsäureethylester	n.d.	n.d.	n.d.	51.2	19.0	n.d.	n.d.



Andererseits ist es auch möglich, dass die evolutiv jüngeren Sequestrierer ihren Glucoseexport aus dem Reservoir noch nicht an die neuen Bedingungen des zusätzlichen Glucoseimports aus den Wirtspflanzen angepasst haben. Aus diesem Grund findet sich bei der Ester produzierenden Spezies *C. lapponica* eine erhöhte Glucosekonzentration. Bei dieser Gruppe wird zusätzlich zu den Blattalkoholglucosiden vermutlich auch Glucose aus dem Transport der autogen hergestellten Fettsäuren vom Fettkörper zum Reservoir importiert (Kap.: 3.3.5.6). Somit liegt hier eine enorm große Menge an Glucose im Reservoir vor, die anscheinend nur zu einem verschwindend geringen Teil zurück gewonnen werden kann<sup>1</sup>.

Die *de novo* Produzenten (*Gastrophysa viridula*, *Phaedon cochleariae*, *Plagioderia viridipennis*, *Plagioderia versicolora*, *Phaedon semimarginatus* und *Plagioderia rileyi equadoriensis*) weisen mit 0-700 ng Glucose pro mg Sekret nur eine sehr geringe Konzentration bzw. gar keine Glucose im Sekret auf. *De novo* Produzenten sind auf die autogene Biosynthese ihrer Wehrsubstanzen einschließlich von Glucose spezialisiert. Diese aufwändige Biosynthesestrategie erfordert einen enormen Einsatz an Energie. Aus diesem Grund existieren in den Larven hocheffiziente Systeme zum Rücktransport von wehrstrategisch nicht genutzten, aber energiereichen Substanzen wie Glucose.

Der extreme Überschuss an Glucose in der kasachischen *C. lapponica* Population und bei *C. mainensis interna* allerdings ist ein Paradoxon, denn es wird ein sechsfacher Überschuss an Glucose beobachtet als theoretisch durch Blattalkoholglucoside importiert werden kann. Wenn man den Transport der Säuren aus dem Fettkörper als Glucoside mit in Betracht zieht, dann ergibt sich immerhin noch ein dreifacher Überschuss an Glucose. Möglicherweise werden auch höhermolekulare glucosidisch gebundene Substanzen aus der Wirtspflanze importiert, die wir mit der GC-MS-Analytik des Sekrets nicht quantifizieren konnten.

---

<sup>1</sup> persönliche Mitteilung von Jacques M. Pasteels

**Tabelle 3-3: Verhältnis Blattalkohole/Glucose in verschiedenen *Chrysomela lapponica* Populationen und und anderen verwandten Spezies.**

	Population	Konzentration Glucose, 6- <i>O</i> -Glucoseester umgerechnet auf Glucose [µg/mg Sekret]	Verhältnis $n_{\text{Blattalkohole}}/n_{\text{Glucose}}$
Esterproduzenten	<i>C. mainensis interna</i> (Alaska)	1.0	0.15 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Kasachstan)	92.3	0.16 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Tschechien)	11.3	1 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Deutschland)	0.7	1.6 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Roché Sanadoire, Frankreich)	15.0	1.8 : 1
Salicylaldehyd- produzenten	<i>C. populi</i>	21.9	14 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Saint-Véran, Frankreich)	9.7	21 : 1
	<i>C. lapponica</i> (Finnland)	0.4	1100 : 1
<i>De novo</i> Produzenten	<i>P. rileyi equadoriensis</i>	0.7	keine pflanzenbürtigen Alkohole
	<i>P. semimarginatus</i>	0.4	
	<i>P. viridipennis</i>	0.1	
	<i>P. cochleariae</i>	0.07	
	<i>P. versicolora</i>	0.03	
	<i>G. viridula</i>	0	

Damit stellt sich die Frage, warum einige Spezies eine solch enorme Menge an energiereicher Glucose und Glucoseestern akkumulieren? Als mögliche Erklärung für die extrem hohen Gehalte an Glucose im Sekret könnte die Herabsetzung des Dampfdruckes dienen. Durch die spezielle Komposition des Wehrsekrets aus leichtflüchtigen Estern wäre die Verminderung der Verdunstung ein positiver Effekt, um den Verlust von Wehrsubstanzen gering zu halten. Andererseits könnte die hohe Glucosekonzentration von 8-14% in *C. lapponica* (Kasachstan) und *C. mainensis interna* antibakteriell wirken. Diese Vermutung wird in Kapitel 3.4 noch genauer diskutiert werden.

### 3.3 Aufklärung der Biosynthese der Esterproduktion in *Chrysomela lapponica*

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, konnte die Biosynthese der Ester in *C. lapponica* bisher nicht vollständig und detailliert aufgeklärt werden. Interessante Fragen, wie involvierte reaktive Intermediate und die Lokalisierung der Teilschritte der Biosynthese, konnten bisher nicht geklärt werden. In dieser Arbeit wurden nun verschiedene Experimente (Kap.: 3.3.1-3.3.5.) durchgeführt, um diesen einzigartigen und produktreichen Biosyntheseweg aufzuklären. Dabei wird im ersten Teil der Sequestrierungsprozess in kasachischen *C. lapponica* charakterisiert. Im zweiten Teil wird die *de novo* Synthese von Säuren aus Aminosäuren detailliert beschrieben. Anschließend werden Versuche und Ergebnisse zur Aufklärung des enzymatisch katalysierten Transacylierungsprozesses vorgestellt, an deren Ende ein neuer und in Insekten einzigartiger Biosyntheseweg vorgeschlagen wird.

#### 3.3.1 Sequestrierung von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen

In Transportstudien mit Thioglucosiden beobachtete Kuhn zum ersten Mal, dass nicht nur die gefütterten Thioglucoside im Wehrsekret auftauchen, sondern auch Derivate. Er vermutete damals, dass es sich dabei um Isobutyrate und 2-Methylbutyrate der Thioglucoside handelt<sup>1</sup>. Die fehlenden Referenzsubstanzen zwangen ihn damals dazu, die Thioglucosidester als Thioglucoside zu quantifizieren, was im Regelfall zu einer Überquantifizierung der Ester geführt hat, da diese im MS bis zu 30% stärker fragmentieren als die freien Thioglucoside.

In der vorliegenden Arbeit wurden synthetische Referenzsubstanzen der Thioglucosid-Ester hergestellt, um diese damit zu identifizieren und die absolute Menge an aufgenommenen Thioglucosiden zu rekalkulieren. Es wurde vermutet, dass die Thioglucoside vorrangig in der 6-*O*-Position der Zucker verestert werden. Des Weiteren traten im Fall von 8-OH-Geraniolthioglucosid auch Diester auf, die durch Veresterung beider primärer Hydroxylgruppen sowohl am Zucker als auch am Aglycon gebildet wurden.

Um die Selektivität der natürlichen Acyltransferase zu simulieren, wurde eine Methode von Woudenberg van Oosterom<sup>[146]</sup> verwendet, die die Acylierung mit

---

<sup>1</sup> mündliche Mitteilung von J. Kuhn

*Candida antarctica* Lipase B (CALB) in tert. Butanol mit den Ethylestern der entsprechenden Säuren durchführte. Die hohe Regioselektivität der CALB gegenüber den Substraten liegt im limitierten Platzangebot des aktiven Zentrums ( $10 \times 4 \times 12 \text{ \AA}^3$ ), der Hydrophobizität der Enzymtasche und der Art der Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates begründet<sup>[2]</sup> (Mechanismus siehe Kap.: 5.16.1).

So konnten die Thioglucoside ausschließlich in der 6-*O*-Position der Zucker bzw. an den primären OH-Gruppen des Aglycons acyliert werden. Auf eine Synthese der gemischten Ester (Isobutyrat, 2-Methylbutyrat) wurde verzichtet, da die identisch substituierten Ester den Hauptteil darstellen.

Bei den Transportuntersuchungen an kasachischen Larven (Daten von 2006) zeigte sich ein ähnliches Transportmuster wie bei den anderen Populationen aus Frankreich, Finnland und Tschechien (Daten von Jürgen Kuhn 2003) (Abb.: 3-3).

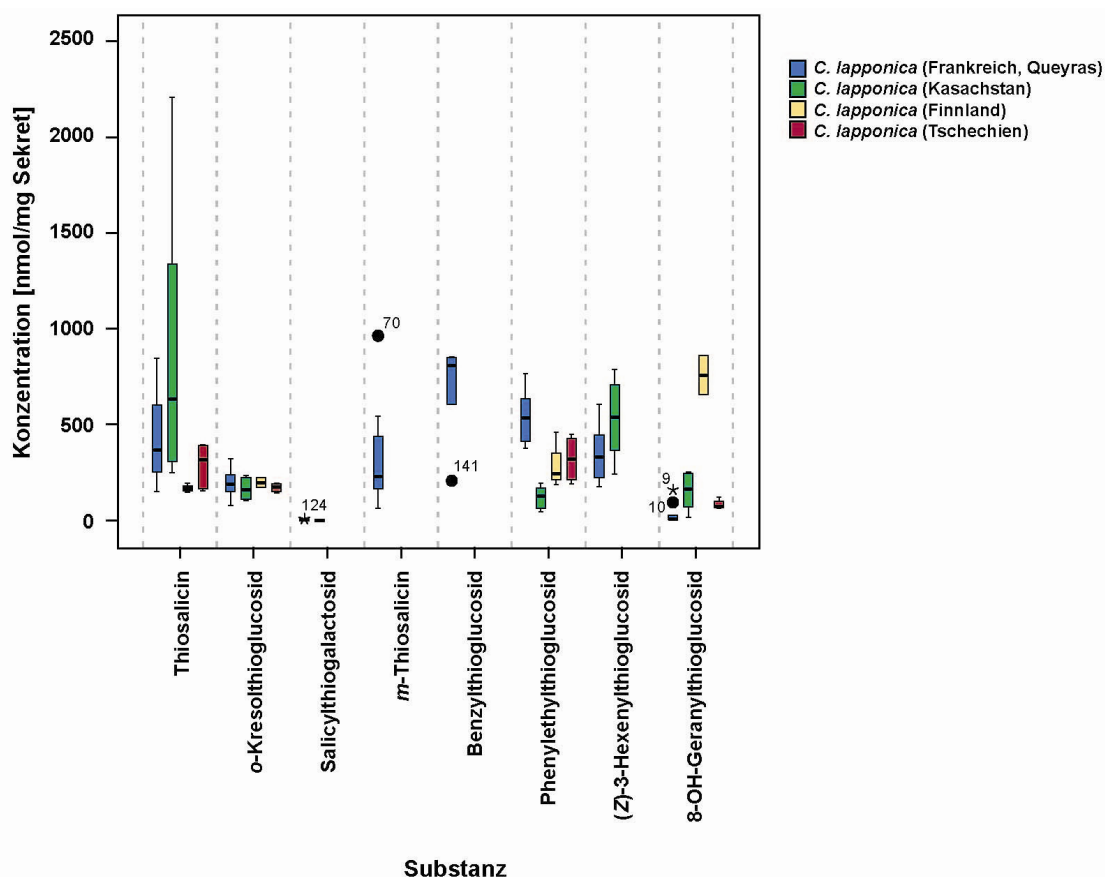


Abbildung 3-3: Vergleich der aufgenommenen Thioglucoside zwischen verschiedenen *Chrysomela lapponica* Populationen. Die Nummern bezeichnen Ausreisser in den verwendeten Datensätzen und können mit Hilfe der beigefügten CD identifiziert werden.

Innerhalb der kasachischen *C. lapponica* Population zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $F(6,31)=5.958$ ,  $p=0.05$ ) in den Transportraten von Salicylthiogalactosid zu *o*-Kresolthioglucosid ( $p=0.19$ ) und (*Z*)-3-Hexenylthioglucosid ( $p=0.31$ ). Die Tatsache, dass das offensichtlich bevorzugt transportierte Thiosalicin statistisch gesehen keine unterschiedliche Transportrate aufweist, liegt in der hohen Standardabweichung begründet. Allerdings konnten keine Ausreißer identifiziert werden, so dass keine Daten eliminiert werden durften und somit die große Varianz das Vorhandensein eines signifikanten Unterschieds möglicherweise überdeckt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Transportraten einzelner Thioglucoside in den verschiedenen Populationen. Ein signifikanter Unterschied ( $F(3,23)=3.288$ ,  $p=0.039$ ) konnte für Thiosalicin zwischen der französischen und der finnischen Population ( $p=0.008$ ) nachgewiesen werden. Ein hochsignifikanter Unterschied ( $F(3,21)=17.566$ ,  $p=0.000$ ) stellte sich bei Phenylethylthioglucosid zwischen der französischen und der kasachischen Population ( $p=0.000$ ) heraus.

Abschließend kann gesagt werden, dass trotz signifikanter Unterschiede in den Transportraten der einzelnen Populationen das Transportmuster trotzdem sehr ähnlich ist. Alle Thioglucoside werden in einem ähnlichen Ausmaß transportiert. Damit liegt auch bei der kasachischen Population ein Glucosidtransport vor, der die Glucoseeinheit erkennt, aber nur eingeschränkt zwischen den Agluca differenziert.

### 3.3.2 *De novo* Produktion von Säuren aus Aminosäuren

Neben der Sequestrierung von pflanzenbürtigen Glucosiden ist die *de novo* Synthese von Säuren aus dem internen larvalen Aminosäurehaushalt in die Esterbiosynthese bei *C. lapponica* involviert. In der Natur finden sich viele Beispiele für die *de novo* Produktion von Säuren aus Aminosäuren. So sind alle bekannten kurzkettigen Carbonsäuren in Ameisen, Käfern und Schmetterlingen aus dem Aminosäuremetabolismus abgeleitet<sup>[9, 12, 52, 116, 122, 123, 131]</sup>.

1997 wiesen Schulz und Kollegen<sup>[120, 121]</sup> nach, dass auch *C. lapponica* Larven die Säurekomponenten der Ester autogen herstellen. Sie injizierten Valin- $[^2\text{H}_8]$  in die Larven und beobachteten nach 24 h gelabelte Isobutyrate. Ebenso wiesen sie nach, dass auch Phenylethanol *de novo* aus Phenylalanin hergestellt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Untersuchungen fortgeführt und es konnte beobachtet werden, dass nicht nur Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure und Benzoesäure aus Valin (Val), Isoleucin (Ile) bzw. Phenylalanin (Phe) hergestellt werden. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass für den Abbau von Phe sowohl ein oxidativer Weg zu Säuren als auch ein reduktiver Weg zu Alkoholen besteht. Bei der Applikation von Val und Ile konnte im Gegensatz dazu keine Umwandlung zu den entsprechenden Alkoholen (2-Methylpropanol, Isopropanol, 2-Methylbutanol, 1-Methylpropanol) beobachtet werden. Die Fütterung des Ile-Isomers [ $^{13}\text{C}$ ]-Leucin führte nicht zum Einbau in Säuren und Alkohole.

Im Folgenden sollen die Markierungsgrade für verschiedene Substanzen nach Fütterung mit  $\beta$ -[ $^{13}\text{C}$ ]-Phe (Abb.: 3-4, Tab.: 3-4), [ $^{13}\text{C}_6$ ]-Ile (Abb.: 3-5, Tab.: 3-5) und Val-[ $^2\text{H}_8$ ] (Abb.: 3-6, Tab.: 3-6) dargestellt werden. Die Analytik der Experimente mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren wurde mit GC-C-IRMS durchgeführt, eine Technik, bei der die Substanzen nach Trennung auf einer GC-Säule in einem Rohr mit CuO verbrannt werden und anschließend eine massenspektrometrische Analyse des entstandenen  $^{12}\text{CO}_2$  und  $^{13}\text{CO}_2$  erfolgt. Die Auswertung der Experimente mit deuteriertem Valin erfolgte mit GC-EIMS.

Aufgrund des Vorkommens von Essigsäure im Sekret der *C. lapponica* Larven wird auch das Auftreten von acetylierten Alkoholen vermutet. Analog zum Metabolismus von Val, Ile und Phe wird die Synthese von Essigsäure aus Alanin (Ala) vorgeschlagen. In dieser Arbeit konnte dieser Weg leider nicht belegt werden, da die Fütterungsstudien mit  $^{13}\text{C}$ -Ala zu einer extrem verminderten Produktion von Sekret führte, so dass die Stoffmengen der Ester für eine Analyse mit GC-C-IRMS nicht mehr ausreichten.

Aus anderen Aminosäuren abgeleitete Säuren konnten im Sekret nicht nachgewiesen werden.

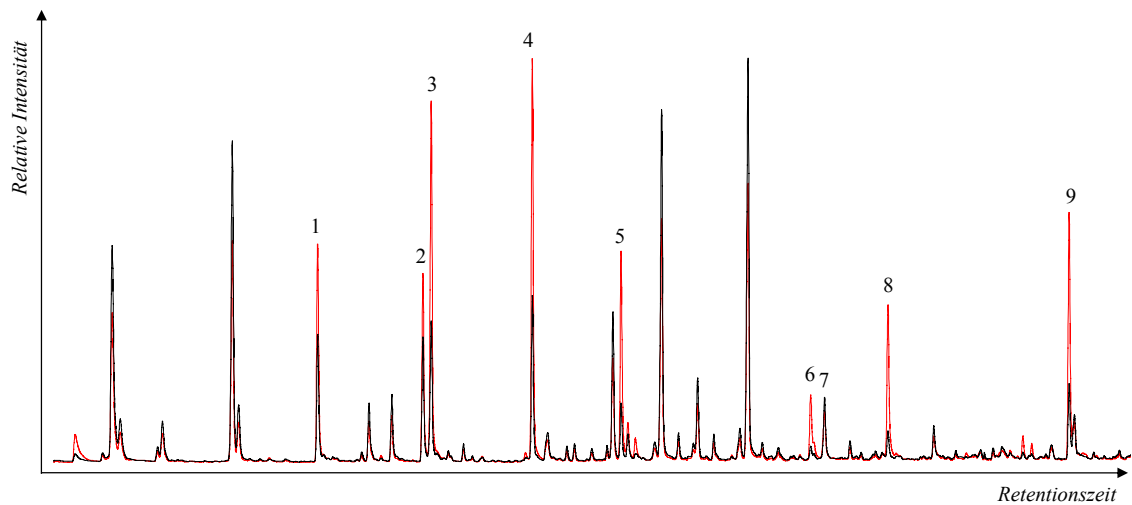


Abbildung 3-4: Überlagerung der IRMS-Chromatogramme ( $m/z=44$  und  $45$ ) der Sekrete nach Fütterung von  $\beta$ - $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin. Überlappende Spuren zeigen keinen Einbau, stark erhöhte rote Signale beweisen einen Isotopeneinbau. (1) Benzylisobutyrat, (2) Benzyl-2-methylbutyrat, (3) Phenylethylisobutyrat, (4) Phenylethyl-2-methylbutyrat, (5) (*Z*)-3-Hexenylbenzoat, (6) Benzylbenzoat, (7) *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat, (8) Phenylethylbenzoat, (9) 8-OH-Linalylbenzoat.

Tabelle 3-4: Markierungsgrade nach Fütterung von  $\beta$ - $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin.

#	Substanz	$\delta^{13}\text{C}$	Markierungsgrad [% $^{13}\text{C}$ ]
1	Benzylisobutyrat	1580	2.82
2	Benzyl-2-methylbutyrat	1231	2.45
3	Phenylethylisobutyrat	2813	4.11
4	Phenylethyl-2-methylbutyrat	2674	3.97
5	( <i>Z</i> )-3-Hexenylbenzoat	4575	5.90
6	Benzylbenzoat	5516	6.82
7	<i>p</i> -OH-phenylethyl-2-methylbutyrat	319	1.46
8	Phenylethylbenzoat	8249	9.41
9	8-OH-linalylbenzoat	3818	5.14

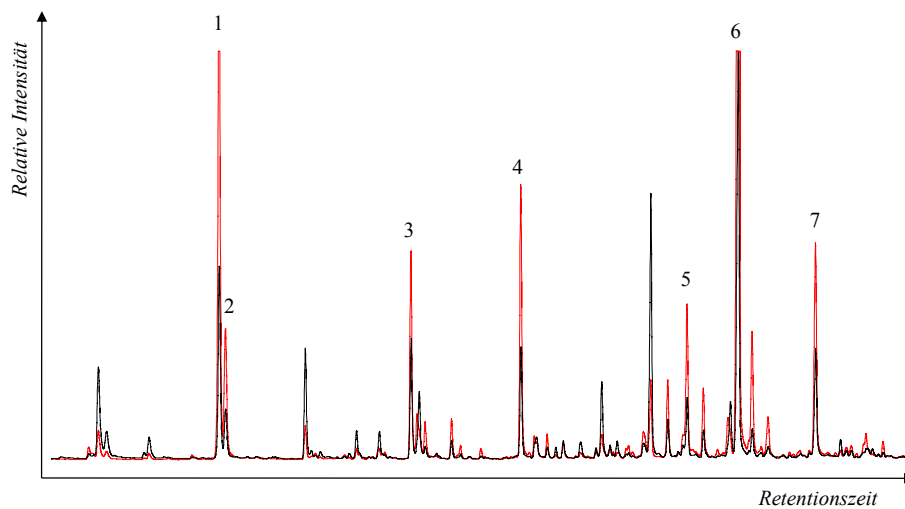
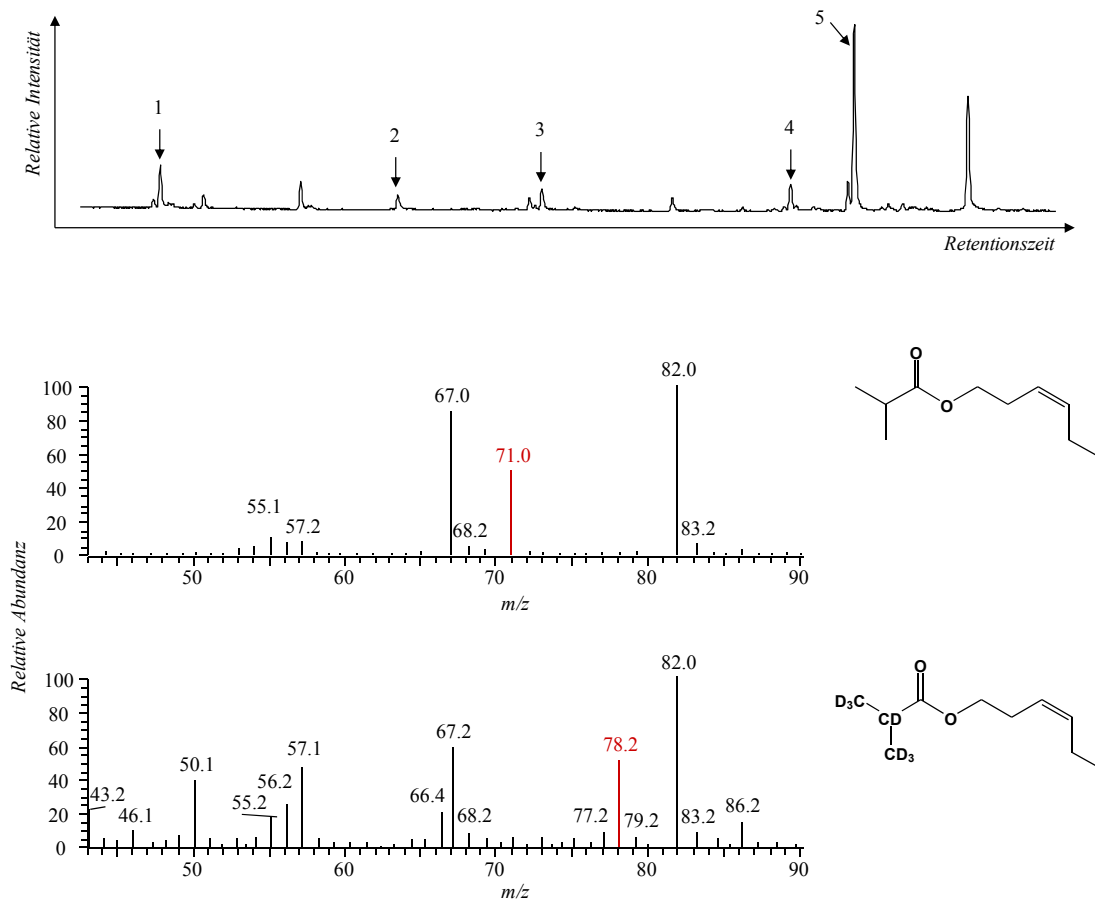


Abbildung 3-5: Überlagerung der IRMS-Chromatogramme ( $m/z=44$  und  $45$ ) der Sekrete nach Fütterung von  $^{13}\text{C}_6$ -Isoleucin. Überlappende Spuren zeigen keinen Einbau, stark erhöhte rote Signale beweisen einen Isotopeneinbau. (1) (*Z*)-3-Hexenyl-2-methylbutyrat, (2) Hexyl-2-methylbutyrat, (3) Benzyl-2-methylbutyrat, (4) Phenylethyl-2-methylbutyrat, (5) 8-OH-Geranyl-2-methylbutyrat, (6) 8-OH-Linalyl-2-methylbutyrat, (7) *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat.

Tabelle 3-5: Markierungsgrade nach Fütterung von [ $^{13}\text{C}_6$ ]-Isoleucin.

#	Substanz	$\delta^{13}\text{C}$	Markierungsgrad [% $^{13}\text{C}$ ]
1	( <i>Z</i> )-3-Hexenyl-2-methylbutyrat	7880	9.07
2	Hexyl-2-methylbutyrat	8144	9.32
3	Benzyl-2-methylbutyrat	4972	6.29
4	Phenylethyl-2-methylbutyrat	7547	8.76
5	8-OH-Geranyl-2-methylbutyrat	9459	10.52
6	8-OH-Linalyl-2-methylbutyrat	5489	6.80
7	<i>p</i> -OH-phenylethyl-2-methylbutyrat	5996	7.29





**Abbildung 3-6:** GC-MS-Analyse der Sekrete nach Fütterung von [ $^2\text{H}_8$ ]-Valin am Beispiel von (*Z*)-3-Hexenylisobutyrat - TIC ungelabelt und gelabelt. (1) (*Z*)-3-Hexenylisobutyrat, (2) Benzylisobutyrat, (3) Phenylethylisobutyrat, (4) 8-OH-Geranylisobutyrat, (5) 8-OH-Linalylisobutyrat.

**Tabelle 3-6:** Markierungsgrade nach Fütterung von [ $^2\text{H}_8$ ]-Valin.

#	Substanz	Markierungsgrad [% $^2\text{H}$ ]
1	( <i>Z</i> )-3-Hexenylisobutyrat	16.55
2	Benzylisobutyrat	13.13
3	Phenylethylisobutyrat	18.62
4	8-OH-Geranylisobutyrat	18.26
5	8-OH-Linalylisobutyrat	14.07

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Larven also in der Lage sind ca. 15 Substanzen ausschließlich autogen herzustellen. Der ökologische Sinn dieser sehr breiten *de novo* Syntheseaktivität ist in der Anpassung an unterschiedliche Wirtspflanzen zu suchen. Normalerweise findet ein Wirtspflanzenwechsel bevorzugt statt,

wenn sich die Inhaltsstoffe sehr ähneln, d.h. eine phytochemische Brücke vorhanden ist. Der Wirtspflanzenwechsel bei *C. lapponica* von Weiden- auf die chemisch recht verschiedenen Birkengewächse läuft entgegen der von Ehrlich und Raven postulierten phytochemischen Brücke<sup>[29, 30]</sup>. Die Fähigkeit, Wehrsubstanzen autogen herzustellen, erleichtert aber dann einen Wirtspflanzenwechsel, wenn die chemische Zusammensetzung sich stark vom vorherigen Wirt unterscheidet. Die Fähigkeit zur *de novo* Synthese von Wehrsubstanzen macht solch einen Wechsel vermutlich überhaupt erst möglich. So kann die Larve ihre chemische Abwehr aufrechterhalten auch wenn keine geeigneten Vorstufen sequestriert werden können. Allerdings stellt die komplette *de novo* Synthese eine biochemisch aufwändigere Variante der Verteidigung dar. Aus diesem Grund wird die Larve bestrebt sein, zur Sequestrierung bzw. gemischten Biosynthese zurückzukehren.

### 3.3.3 Postulierung der Biosynthesewege für die Produktion von Alkoholen und Säuren aus Phenylalanin, Valin und Isoleucin

Die Synthese von Isobuttersäure und 2-Methylbuttersäure aus Val bzw. Ile verläuft vermutlich über den gängigen Aminosäureabbauweg, der die Desaminierung und oxidative Decarboxylierung umfasst. Der Produktion von Benzoesäure aus Phe liegt vermutlich ein Biosyntheseweg ähnlich der  $\beta$ -Oxidation zugrunde, wie er bereits in Pflanzen und Bakterien beschrieben wurde<sup>[1, 32, 53, 81]</sup>. Dabei wird zuerst über eine PAL(Phenylalanin-Ammonia-Lyase) –abhängige Reaktion Zimtsäure-CoA gebildet, das dann zu 3-OH-3-Phenylpropionyl-CoA hydratisiert wird. Anschließend erfolgt die Oxidation der Hydroxylfunktion, gefolgt von einer Kettenverkürzung durch eine  $\beta$ -Ketothiolase. Die Produktion von Benzylalkohol könnte ebenfalls über den Weg des Zinnamoyl-CoA verlaufen, wobei dann aber der Bildung des 3-OH-3-Phenylpropionyl-CoA eine Retro-Aldolreaktion zu Benzaldehyd folgt. Ein solcher Biosyntheseweg wurde bereits in *Nicotiana tobaccum* beschrieben<sup>[115]</sup>. Durch NADPH-abhängige Reduktion würde Benzylalkohol gebildet. Die Bildung von Phenylethanol und *p*-OH-Phenylethanol folgt wahrscheinlich der Biosynthesesequenz aus Transaminierung und oxidativer Decarboxylierung zu Phenylacetaldehyd und nachfolgender Reduktion durch NADPH, wobei der Bildung des *p*-OH-

Phenylethanol die Hydroxylierung durch eine Phenylalanin-Hydroxylase (EC 1.14.16.1) vorausgeht (Abb.: 3-7).

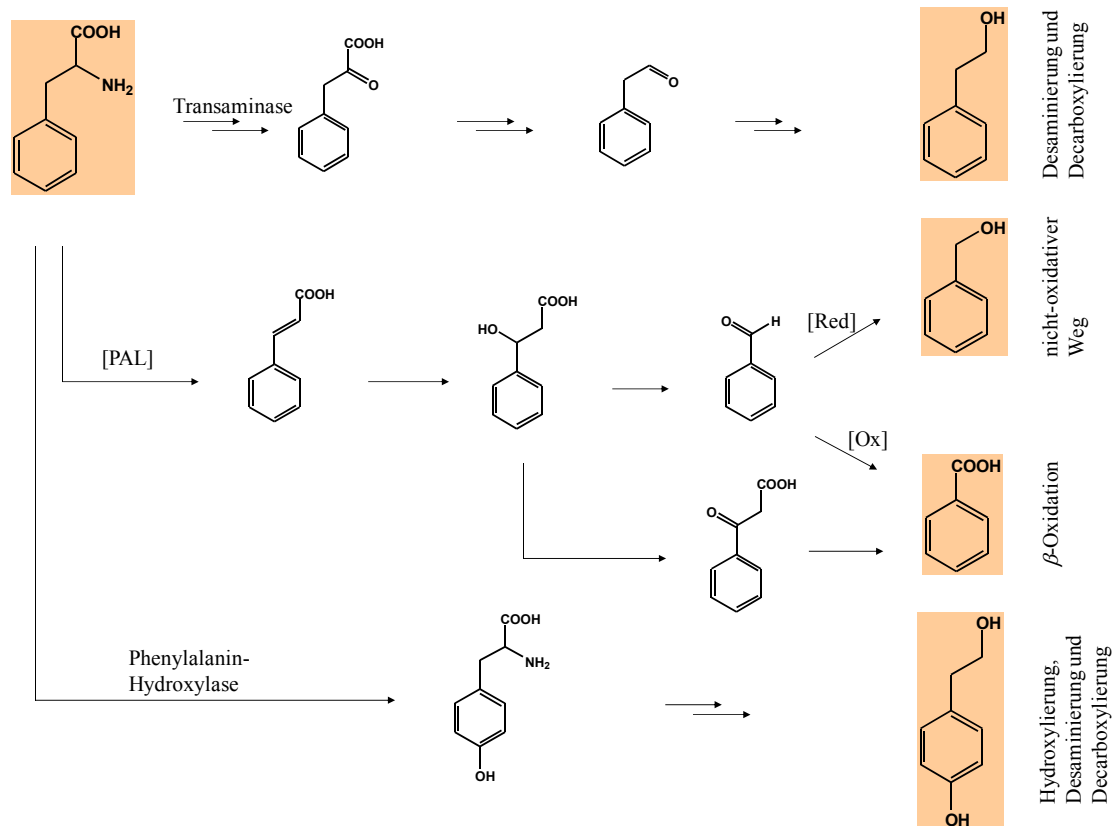
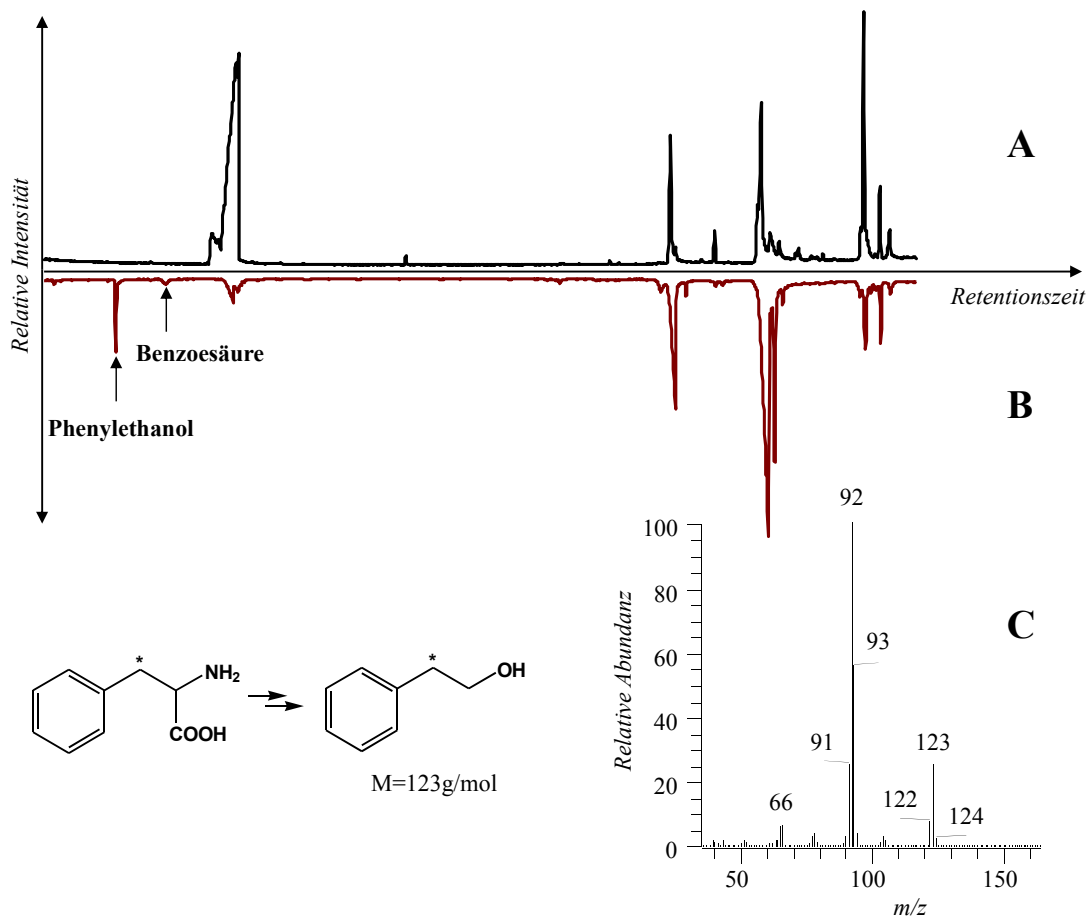


Abbildung 3-7: Postulierte Biosynthesewege für Phenylethylalkohol, Benzylalkohol, *p*-OH-Phenylethylalkohol und Benzoesäure aus Phenylalanin.

### 3.3.4 Lokalisierung des Aminosäureabbaus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Aminosäureabbau zu Säuren nicht im Reservoir stattfindet, obwohl hier alle übrigen Teilschritte der Esterbiosynthese ablaufen. Um den Ort des Aminosäureabbaus zu bestimmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Experimente zur Lokalisierung des Aminosäureabbaus und dem Transportmechanismus der Fettsäuren durchgeführt. In einem ersten Experiment konnte durch *in vitro* Versuche mit Sekret und isotope markiertem Ile belegt werden, dass die Umwandlung von Aminosäure über Oxosäure zu Carbonsäure nicht im Reservoir stattfindet. Im zweiten Experiment wurde Benzoesäure-[ $^2\text{H}_5$ ] in die larvale Hämolymphe injiziert bzw. gefüttert. In beiden Fällen konnte durch gaschromatographische Analysen ein Transport der Säure in das Reservoir nachgewiesen werden. Es sind also Transportwege über die Hämolymphe vorhanden.

Der Ort des Aminosäureabbaus wurde im metabolisch hochaktiven Fettkörper vermutet. Deshalb wurde Fettkörpergewebe präpariert und mit  $\beta$ - $^{13}\text{C}$ -Phe inkubiert. Die gaschromatographische Analyse des Ethylacetatextrakts zeigte die Bildung von isotopenmarkiertem Phenylethanol (Abb.: 3-8). Der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsgrad betrug dabei 73%.



**Abbildung 3-8: Lokalisierung des Aminosäureabbaus im Fettkörper anhand der Umwandlung von  $\beta$ - $^{13}\text{C}$ -Phenylalanin in  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Phenylethanol. (A) Kontrolle, (B) Inkubation des Fettkörpers mit  $^{13}\text{C}$ -Phe, (C) Massenspektrum von  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Phenylethanol.**

Damit konnte nachgewiesen werden, dass der Aminosäureabbau zu Phenylethanol im Fettkörper stattfindet und anschließend ein Transport der Säure über die Hämolymphe ins Drüsenreservoir erfolgt. Vermutlich findet auch hier ebenso wie bei den sequestrierten Blattalkoholen der Transport als glucosidisch gebundenes Intermediat statt. Im Chromatogramm zeigte sich auch eine Bildung von Benzoesäure. Aufgrund der geringen Konzentration konnte kein Isotopeneinbau in die Säure nachgewiesen werden (Abb.: 3-8). Die geringe Bildung von Benzoesäure deckt sich mit unseren

Beobachtungen, dass im Sekret der kasachischen Population so gut wie keine Benzoate auftreten.

### 3.3.5 Mechanismus der Transacylierungsreaktion

Nachdem die Teilschritte der Sequestrierung von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen und *de novo* Synthese von Säuren aus Aminosäuren im Detail untersucht wurden (Kap.: 3.3.1-3.3.4), sollte der biosynthetisch außerordentlich spannende Schritt der Transacylierung aufgeklärt werden.

Transacylierungsreaktionen in der Natur finden häufig unter CoA-Aktivierung statt, da Acyl-CoAs eine hohe Acylübertragungskapazität besitzen. So sind Acetyl-CoA und Propionyl-CoA unverzichtbare Intermediate beim Fettsäureabbau ( $\beta$ -Oxidation), bei der Produktion von Ketonkörpern als alternative Energieträger in Fastenzeiten oder bei der Cholesterinbiosynthese über den Terpenstoffwechsel. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass auch die Esterbildung in den larvalen Drüsenreservoirien dieser Aktivierungsart unterliegt<sup>[121]</sup>. Wiederholte Aktivitätstests mit Isobutyryl-CoA ergaben keinen Nachweis des gewünschten Produkts. Auch ein direkter Nachweis von Acyl-CoAs über MALDI-TOF-Analyse oder Fluoreszenzderivatisierung mit Chloracetaldehyd und anschließender HPLC-FLD-ESI-MS-Analyse der Etheno-Adenin-Derivate verlief negativ. Ebenso konnten Acyl-AMPs als energiereiche Intermediate bei der Acyl-CoA-Synthese nicht im Sekret nachgewiesen werden. *N*-Acylcysteine sind wichtige Acyl-CoA-Analoga bei der Aufklärung der Polyketidbiosynthese in Bakterien. Allerdings ist ihre Amidbindung weniger energiereich als die Thioester-Brücke der Acyl-CoA-Derivate. Aus diesem Grund ist die Acylübertragung durch *N*-Acylcysteine eher unwahrscheinlich und diese Intermediate konnten auch im Sekret nicht nachgewiesen werden.

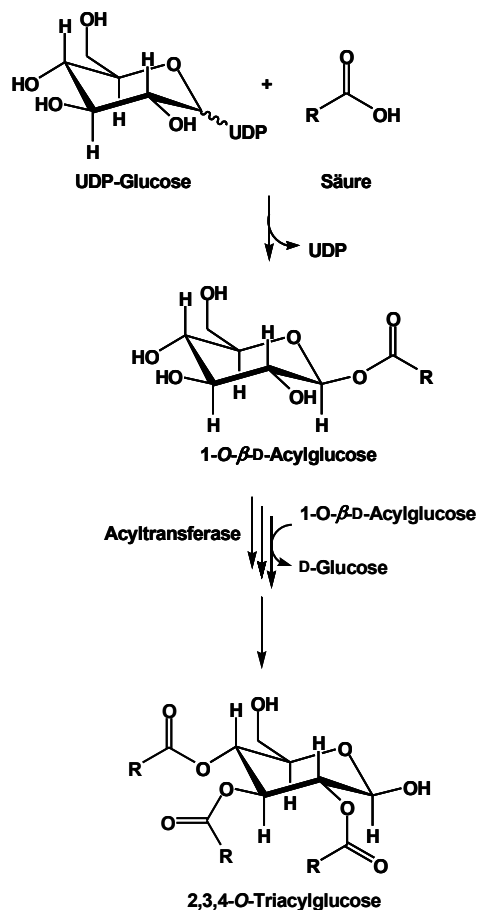
Versuche mit Sekret, welches von Larven abgenommen wurde, haben aber gezeigt, dass die Zugabe eines Substrats, z.B. Heptanol, genügt, um eine Produktbildung, z.B. Heptylisobutyrat und Heptyl-2-methylbutyrat, zu bewirken. Dieses Experiment beweist, dass der acylübertragende Faktor sowie alle involvierten Enzyme im Sekret vorhanden sein müssen. Aus diesem Grund ist es möglich, *in vitro* Experimente mit Sekret durchzuführen, was die Forschung unabhängig von der mit ca. drei Wochen

sehr kurzen Verfügbarkeit der Larven macht. Wiederholte Experimente haben gezeigt, dass das Sekret auch nach wiederholtem Gefrieren und Auftauen, bzw. nach zweijähriger Lagerung noch eine messbare Acylübertragungsaktivität besitzt.

### 3.3.5.1 Aufklärung des Acyldonors

Da die aus tierischen und bakteriellen Stoffwechseln bekannten Transacylierungsmechanismen auf die Biosynthese der Ester in *C. lapponica* nicht angewendet werden konnten, wurde auch in Pflanzen nach biosynthetischen Vorbildern gesucht.

In den Trichomen von Solanaceen gibt es 2,3,4-*O*-Triacylglucosen, die zur Verteidigung beitragen. Die Acyleinheiten können dabei C<sub>4</sub>- und C<sub>5</sub>-Säuren sowie verzweigte und unverzweigte C<sub>10</sub>-, C<sub>11</sub>- und C<sub>12</sub>-Säuren sein<sup>[141]</sup>. Das auffallend



ähnliche Produktspektrum im Hinblick auf acylierte Glucosen im Sekret der Larven ließ den Schluss zu, einen ähnlichen Biosyntheseweg in den Larven zu vermuten.

Die Biosynthese der Acylglucosen in den Pflanzen wurde bereits im Detail studiert und es liegen sogar schon Sequenzdaten für die involvierten Acyltransferasen vor<sup>[84, 93, 127-129]</sup>. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu den Serincarboxypeptidasen, welche als Exopeptidasen Aminosäurereste vom C-Terminus eines Proteins hydrolytisch abspalten, werden die pflanzlichen Acyltransferasen den SCPL-Acyltransferasen (*serine carboxypeptidase like*) zugeordnet.

**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung der Biosynthese von 2,3,4-*O*-Triacylglucosen in Pflanzen. Die Aktivierung der Fettsäuren erfolgt durch Transglucosylierung von UDP-Glucose. Die schrittweise Disproportionierung von 1-*O*-β-D-Acylglucosen führt anschließend zur Bildung von Glucosepolyestern. Modifiziert nach Kuai<sup>[72]</sup>.

Der pflanzliche Biosyntheseweg beruht auf einer Aktivierung der Säuren durch UDP-Glucose, wobei ein 1-*O*-Acylzucker gebildet wird. Für 1-*O*-Sinapoyl- $\beta$ -D-glucose wurde ein Acyltransfer-Potential von -35.7 kJ/mol experimentell ermittelt<sup>[94]</sup>. Einen ähnlichen Wert besitzen Thioester, wie z.B. CoA. Damit zeigen die 1-*O*-Acylzucker ein sehr hohes Acylgruppenübertragungspotential<sup>[83]</sup>. Anschließend werden durch dreimalige Disproportionierung und Transacylierung die 2,3,4-*O*-Triacylglucosen gebildet (Abb.: 3-9).

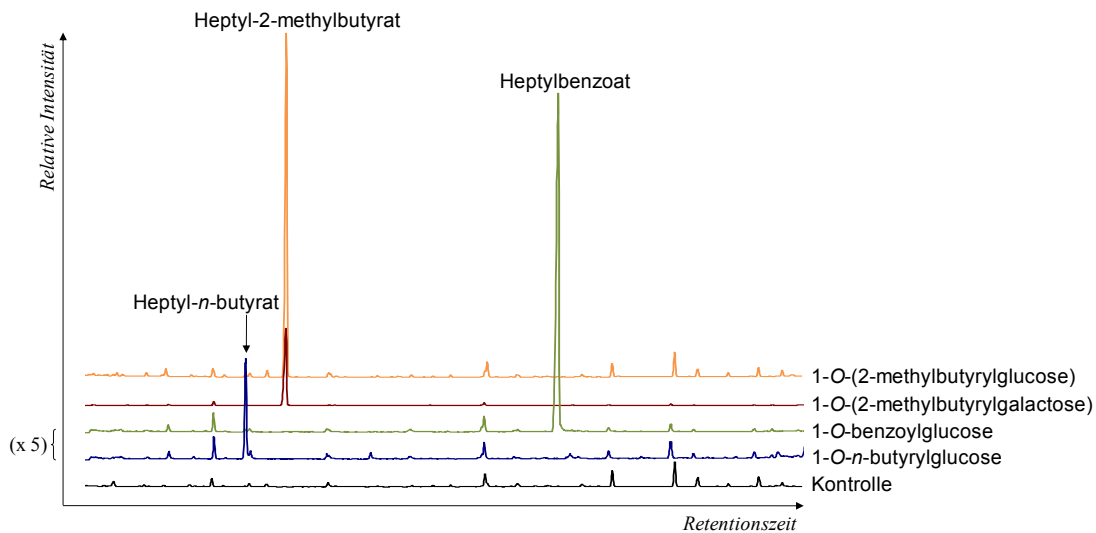
### 3.3.5.2 Synthese von 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen

Um eine mögliche Aktivität der 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen mit dem larvalen Sekret nachzuweisen, wurden synthetisch analoge Vertreter hergestellt.

Die Synthese von reinen 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen stellt hohe Anforderungen an die Stereoselektivität der Reaktionsführung, da sich im Reaktionsgemisch ein Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren einstellt. Bols und Hansen<sup>[15, 16]</sup> entwickelten ein Synthesekonzept, welches eine hohe Ausbeute des gewünschten  $\beta$ -Anomers liefert. Dabei verwendeten sie Triethylamin als starke Base, welche die Mutarotation beschleunigt. Zusammen mit einer sehr langsamen Zugabe des Säurechlorids wird das Anomerengleichgewicht zu Gunsten des stärker nukleophilen  $\beta$ -Anomers verschoben, da die Acylierungsgeschwindigkeit durch Senkung der Säurechlorid-Konzentration herabgesetzt werden kann (siehe Kap.: 5.16.2).

Die mit dieser Reaktion synthetisierten 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen und -galactosen wurden in Aktivitätsuntersuchungen mit Rohsekret eingesetzt.

Sowohl die 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen als auch die -galactosen zeigten eine eindrucksvolle Acylübertragungsaktivität auf das artifizielle Substrat 1-Heptanol. 1-*O*- $\beta$ -D-2-methylbutyrylglucose, 1-*O*- $\beta$ -D-benzoylglucose und 1-*O*- $\beta$ -D-2-methylbutyrylgalactose wiesen einen ähnlich hohen Umsatz auf. Die Applikation von 1-*O*- $\beta$ -D-*n*-butyrylglucose, das nicht aus dem Aminosäuremetabolismus abgeleitet werden kann, zeigte einen verminderten Umsatz von ca. 20% (Abb.: 3-10).



**Abbildung 3-10: Aktivitätstest des Rohsekrets mit verschiedenen 1-O- $\beta$ -D-Acylglucosen und 1-O- $\beta$ -D-2-methylbutyrylgalactose.**

Versuche, 1-O- $\beta$ -D-acylglucosen im Sekret mit GC-EIMS nach MSTFA-Derivatisierung bzw. mit HPLC-APCI-MS nachzuweisen, verliefen negativ. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass das Substrat sehr energiereich ist und somit sofort abreagiert. Die Konzentration des Substrates im Sekret ist folglich extrem gering (aus der Nachweisgrenze der Methode ergibt sich eine Konzentration, die für 1-O- $\beta$ -D-2-CH<sub>3</sub>-butyrylglucose unter 3.6 ng/ $\mu$ l Sekret liegen muss). Zudem ist es eine effiziente Strategie der Larve, derart energiereiche und somit kostspielige Substanzen nicht auf Vorrat zu synthetisieren, sondern sie je nach Bedarf (nämlich im Verteidigungsfall oder nach einer Häutung, wenn Sekret neu produziert werden muss) bereitzustellen.

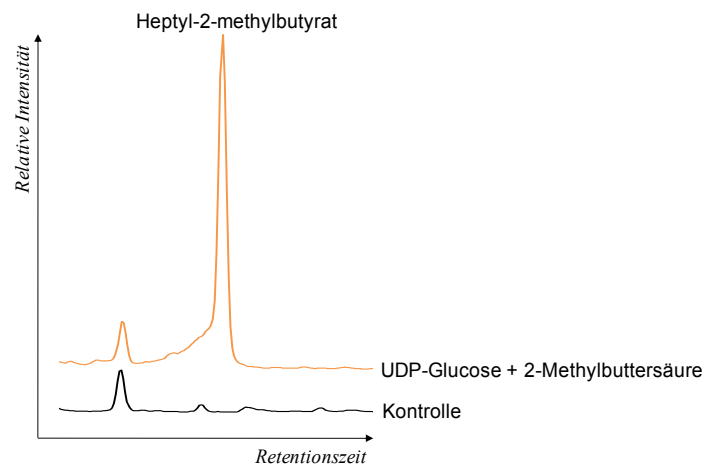
### 3.3.5.3 Biosynthese des Acyldonors aus Aminosäuren

Ghangas and Steffens<sup>[41]</sup> haben in Blättern der Tomate (*Lycopersicon pennellii*) bereits nachgewiesen, dass die Bildung von 1-O- $\beta$ -D-acylglucosen über eine Aktivierung von Säuren mit UDP-Glucose verläuft.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde in den Larven vermutet. Zur Untersuchung der UDP-Glucosyltransferreaktion wurde ein Aktivitätsassay mit Rohsekret durchgeführt, bei dem der Umsatz von UDP-Glucose mit verschiedenen Säuren verfolgt wurde. Den effektivsten Umsatz zeigte das natürliche Substrat 2-Methylbuttersäure. Weiterhin



zeigten auch sterisch gehinderte Säuren und Oxosäuren einen deutlichen Umsatz (Abb.: 3-11).



**Abbildung 3-11: Aktivitätstest des Rohsekrets mit UDP-Glucose und 2-Methylbuttersäure.**

Die Zugabe von 2-Oxobuttersäure resultierte in der Bildung von Heptyl-2-oxobutyrat. Damit konnte nachgewiesen werden, dass der letzte Schritt des Aminosäureabbaus, die Decarboxylierung der Oxosäure, nicht im Reservoir stattfindet, da ansonsten 2-Oxobutyrat als Zwischenprodukt des Aminosäureabbaus sofort zu Butyrat umgewandelt worden wäre.

Bemerkenswert ist die breite Substrattoleranz der UDP-Glucosyltransferase. Nicht nur aromatische Säuren, sondern auch langkettige und sterisch gehinderte Säuren werden von dem Enzym als Substrat akzeptiert und in quantitativem Maße umgesetzt.

#### 3.3.5.4 Substratspezifität der Acyltransferase

Zur Ermittlung der Substratvielfalt, die die Acyltransferase akzeptiert, wurden Aktivitätstests mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt. Es zeigte sich deutlich, dass die Acyltransferase ein breites Spektrum an Alkoholen, Säuren und 1-*O*- $\beta$ -D-Acylzuckern umsetzen kann (Tab.: 3-7). Selbst Substrate, mit denen die Acyltransferase in der Natur nicht konfrontiert wird, wie Pivalinsäure, 1-*O*- $\beta$ -D-2-methylbutyrylgalactose oder 3-Heptanol, werden in deutlicher Menge umgesetzt. Diese extrem breite Substratspezifität macht diese Acyltransferase geeignet für den

industriellen Einsatz bei der Esterproduktion, z.B. in der Duftstoff- und Nahrungsmittelindustrie.

**Tabelle 3-7: Substratspektrum der larvalen Acyltransferase**

	Substrat	Produktbildung
Säuren	2-Methylbuttersäure	+
	Stearinsäure	+
	Pivalinsäure	+
	Oktansäure	+
	Furan-2-carbonsäure	+
	Benzoessäure	+
	2-Oxobuttersäure	+
1- <i>O</i> - $\beta$ -D-acylglycosen	1- <i>O</i> -2-methylbutyrylglucose	+
	1- <i>O</i> -2-methylbutyrylgalactose	+
	1- <i>O</i> -benzoylglucose	+
	1- <i>O</i> - <i>n</i> -butyrylglucose	+
Alkohole <sup>1[73]</sup>	1-Heptanol	+
	3-Heptanol	+
	2-Ethyl-1,3-hexandiol	+
	3-Ethyl-3-pentanol	-
	Phenol-d <sub>6</sub>	-
	1-Heptylamin	-

### 3.3.5.5 Postulierung des Reaktionsmechanismus der Acyltransferase-Reaktion

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, zu welcher Enzymklasse die larvalen Acyltransferasen gehören. Die Acylübertragungsreaktion in den Pflanzen nutzt Serincarboxypeptidase-abgeleitete Enzyme<sup>[84, 93, 127, 128]</sup>. Ein Inhibitionsversuch der larvalen Acyltransferase aus Rohsekret mit dem für Serinproteasen spezifischen Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zeigte bei einer Konzentration von 2 mM eine Hemmung der Acylübertragung<sup>2</sup>. Die Aussagekraft dieser Hemmwirkung ist

<sup>1</sup> Daten von Jürgen Kuhn

<sup>2</sup> Mündliche Mitteilung von Roy Kirsch

allerdings gering, da die Konzentration, bei der eine Hemmwirkung einsetzt, relativ hoch ist.

Interessant ist die Tatsache, dass diese Acyltransferasen, mit ihrer katalytischen Triade typisch für die  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, vermutlich aus dem Primärstoffwechsel rekrutiert wurden. Von Roy Kirsch durchgeführte Sequenzanalysen der cDNA-Bibliothek aus Drüsengewebe der französischen *C. lapponica* Larven zeigten allerdings keine Homologien zu bereits bekannten SCPL-Acyltransferasen. Dieses negative Ergebnis ist zu erwarten, da diese Acyltransferasen auch aus anderen  $\alpha/\beta$ -hydrolytischen Enzymen, wie den Carboxypeptidasen<sup>[86]</sup>, Prolyloligopeptidasen<sup>[38]</sup>, Lipasen<sup>[78, 96, 145]</sup>, Esterasen<sup>[18]</sup>, Thioesterasen<sup>[8, 28, 80, 85]</sup> oder Hydroxynitrillyasen<sup>[79, 93, 139]</sup> sowie  $\beta$ -Glucosidasen<sup>[69]</sup> abgeleitet sein können. Die Ableitung aus Glucosidasen ist sehr wahrscheinlich für *C. lapponica* Larven, da im Reservoir Glucosidasen vorhanden sind. Trotzdem kann auch die Qualität der cDNA-Bibliothek über das Finden bzw. Nicht-Finden von Übereinstimmungen entscheiden.

### 3.3.5.6 Biosynthesekonzept für Acylderivate

Die Untersuchungen bewiesen, dass die Biosynthese der Ester in *C. lapponica* Larven über 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen als Acyldonor geführt wird. Diese Art der Aktivierung wurde bereits in Pflanzen nachgewiesen, ist aber bisher im Insekten- und Tierreich völlig unbekannt. Die Aktivierung von Glucose geschieht dabei über die Reaktion von UDP-Glucose mit Säuren. Als Acylakzeptor fungieren Alkohole, die aus der Wirtspflanze sequestriert bzw. *de novo* aus Aminosäuren gebildet wurden. Ebenso kann Glucose, die durch Deglucosylierung der Blattalkoholglucoside frei gesetzt wird, als Acylakzeptor wirken.

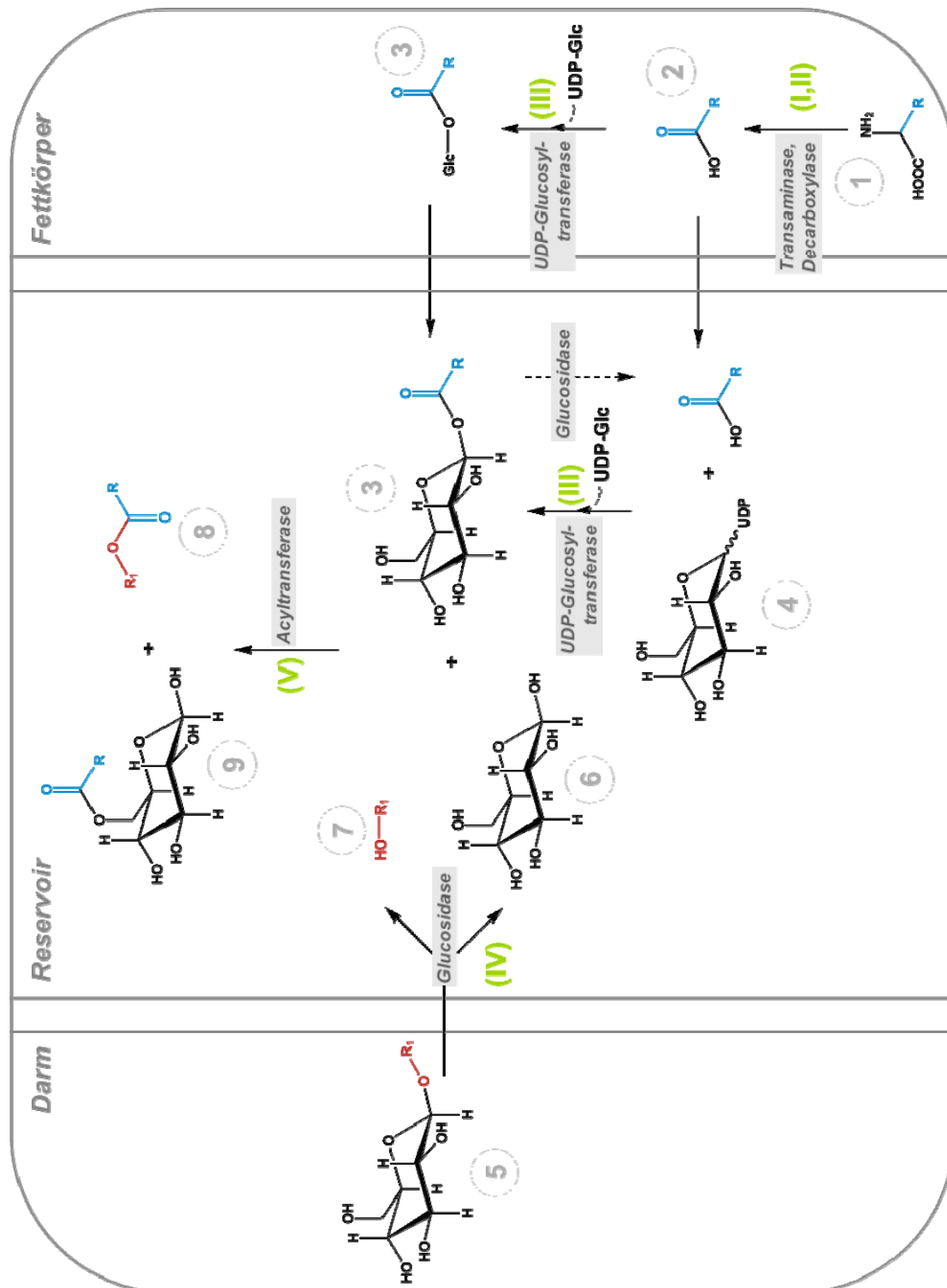
Interessant ist die Frage nach der Herkunft der UDP-Glucose bzw. ob die Biosynthese der 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen aus UDP-Glucose überhaupt im Reservoir stattfindet. Möglicherweise wird die im Fettkörper gebildete Säure bereits dort mit UDP-Glucose zu 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucose umgesetzt, welche über den Hämolymphestrom zum Reservoir transportiert wird und anschließend über Glucosidtransporter in das Drüsenreservoir gelangt. Der zuletzt genannte Mechanismus würde den energetisch günstigeren Prozess darstellen, da so kein Import von ATP und UTP für die Bildung der UDP-Glucose in das Reservoir nötig wären. Das ist deshalb für die Larve vorteilhaft, da der

Reservoirinhalt regelmäßig entleert wird und somit energiereiche Strukturen verschwendet würden. Möglich wäre auch die vollständige Biosynthese von 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen aus UDP-Glucose und Säure im Reservoir. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass im Sekret eine UDP-Glucosyltransferase-Aktivität vorhanden ist (Kap.: 3.3.5.3). Somit kann auch dort die Glucosylierung der freien Säuren zu 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen vollzogen werden. Im Hinblick auf die 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen ist die beträchtliche Glucosidaseaktivität im Reservoir nicht zu vernachlässigen. Deshalb wäre auch der ergänzende Einsatz beider Glucosylierungssysteme vorstellbar: Im Fettkörper synthetisierte 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen werden in das Reservoir transportiert, in welchem eine Glucosidase möglicherweise einen Teil der reaktiven, glucosidanalogen 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen spaltet. Durch die Anwesenheit eines zweiten UDP-Glucosylierungssystems im Reservoir wird dieser Teil wieder zu den reaktiven 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen umgesetzt, welche dann von der Acyltransferase verwertet werden können. Somit würden zwei sich ergänzende Glucosylierungssysteme vorliegen, die zur Aufrechterhaltung der Biosynthese dienen. In zukünftigen Arbeiten sollten kinetische Vergleiche zwischen den Blattalkoholglucosiden und den 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen als Substrat der Glucosidasen im Reservoir durchgeführt werden. Es stellt sich die Frage, ob 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen in Gegenwart der Glucosidasen überhaupt stabil sind oder sofort deglucosyliert werden. Ein UDP-Glucosylierungssystem im Reservoir ist nur sinnvoll, wenn sich die Hydrolysegeschwindigkeiten von sequestrierten Blattalkoholglucosiden und 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen deutlich voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend kann für die Biosynthese der Ester in *C. lapponica* Larven folgender Weg postuliert werden (Abb.: 3-12): Im Fettkörper findet die Transaminierung (I) und oxidative Decarboxylierung (II) der Aminosäuren **1** zu Säuren **2** statt. Anschließend kann auf zwei verschiedenen Wegen die Glucosylierung (III) der Säure mit UDP-Glucose **4** erfolgen: (a.) Die Säure wird im Fettkörper mit UDP-Glucose glucosyliert und die gebildete 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucose **3** wird dann über die Hämolymphe<sup>1</sup> ins Reservoir transportiert oder (b.) Die freie Säure **2** wird über die Hämolymphe ins Reservoir transportiert und im Reservoir mit UDP-Glucose zur 1-*O*-

---

<sup>1</sup> Hämolymphe: Leibeshöhlenflüssigkeit

Abbildung 3-12: Postulierter Biosyntheseweg von Wehrsubstanzen in *Chrysomela lapponica*.

$\beta$ -D-Acylglucose **3** glucosyliert. Aus dem Darm werden glucosidisch gebundene Blattalkohole **5** in das Reservoir transportiert und zu Glucose **6** und freiem Alkohol **7** deglucosyliert (IV). Im Reservoir findet dann der Transfer (V) der Acylgruppe von 1-O- $\beta$ -D-Acylglucose **3** auf den Alkohol **7** bzw. Glucose **6** statt. Durch diese Reaktion werden Ester sowie Glucose-6-O-ester gebildet.

Zusätzliche Aktivitätstests mit den Sekreten des Sequestrierers *Chrysomela populi* und des Iridoidproduzenten *Phaedon cochleariae* fielen negativ aus. Vermutlich haben diese evolutiv gesehen älteren Vertreter die Acyltransferase aus dem Primärstoffwechsel noch nicht für die Biosynthese ihrer Wehrsubstanzen rekrutiert bzw. ist dieses Enzym bei ihnen nicht aktiv. Die Entwicklung der Acyltransferase scheint auf die höher entwickelten Esterproduzenten begrenzt zu sein, während die basalen Gruppen noch über kein (funktionsfähiges) Enzym verfügen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die adulten Tiere der Spezies *C. lapponica* scheinbar eine völlig andere Wehrstrategie verfolgen. Ihr Wehrsekret enthält 3-Nitropropionate in der 6'-, 2',6'- bzw. 3',6'-Position des  $\Delta^3$ -Isoxazolin-5-onglucosids<sup>[110]</sup>. Betrachtet man allerdings die Biosynthese der Substanz genauer, so zeigt sich eine extreme Ähnlichkeit zum larvalen Biosyntheschema (Abb.: 3-13). Randoux *et al.*<sup>[7, 95, 114]</sup> wiesen nach, dass die Biosynthese von  $\Delta^3$ -Isoxazolin-5-on und 3-Nitropropionsäure von der Aminosäure Aspartat ausgeht. In konsekutiven Schritten von Oxidation und Decarboxylierung werden so die beiden Substanzen *de novo* gebildet. Die Bildung des Glucosids erfolgt durch die Reaktion mit UDP-Glucose. Der Acyltransfer der 3-Nitropropionsäure könnte dann analog mit der gleichen Acyltransferase wie in den Larven stattfinden. Man findet also auch hier die äquivalenten Teilschritte der Biosynthese in den Adulten wieder: *de novo* Synthese von Säuren aus Aminosäuren, Sequestrierung von Glucose, eine UDP-Glucosyltransferreaktion und die Veresterung mit *de novo* produzierten Säuren. Diese offensichtliche Ähnlichkeit der larvalen und adulten Biosynthesewege für Wehrsubstanzen liegt vermutlich darin begründet, dass die Rekrutierung einmal vorhandener Enzyme ökonomisch sinnvoller ist, als der Einsatz neuer Enzyme.

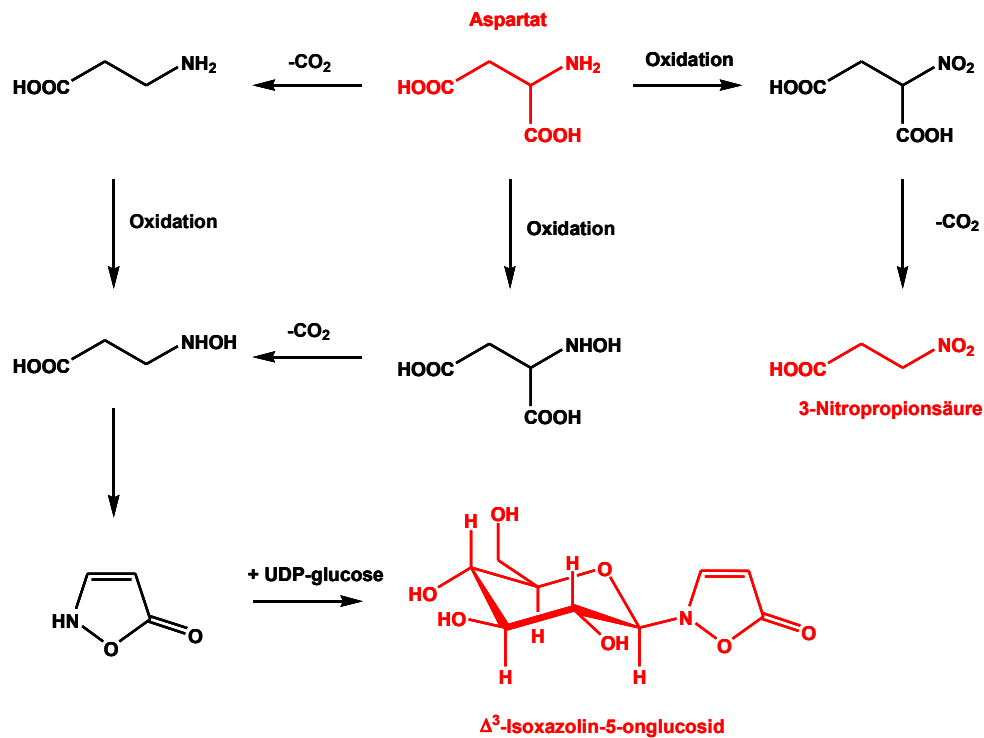


Abbildung 3-13: Reaktionsschema der Biosynthese von 3-Nitropropionsäure und  $\Delta^3$ -Isoxazolin-5-onglucosid nach Randoux *et al.*<sup>[114]</sup>

In diesem Zusammenhang ist die larvale und adulte Wehrchemie des Käfers *Chrysomela populi* evolutiv gesehen besonders interessant. Die Larven sind ausschließlich Sequestrierer von Salicin. Sie nutzen dann eine Salicylalkoholoxidase (SAO), um deglucosylierten Salicylalkohol in die Wehrsubstanz Salicylaldehyd zu überführen<sup>[20, 92]</sup>. Als Imagines hingegen produzieren sie wie *C. lapponica* Nitropropionsäure und Isoxazolinonglucoside<sup>[110]</sup>. Vermutlich folgt in beiden Spezies die Biosynthese der gleichen Sequenz. Wenn die Hypothese der Rekrutierung gleicher Enzyme im larvalen und adulten Organismus richtig ist, sollte hinterfragt werden, warum *C. populi* Larven nicht in der Lage sind Blattalkoholester zu bilden. Ein Vergleich der biosynthetisch involvierten Enzyme anhand von cDNA-Bibliotheken sollte Aufschluss über eventuell vorhandene Sequenzähnlichkeiten geben. Durch heterologe Expression der entsprechenden Gene könnte dann ein Funktionalitätsnachweis geführt werden.

### 3.3.6 Untersuchungen zum Ausmaß der *de novo* Produktion von Säuren und Alkoholen

Wie bereits erwähnt (Kap.: 1.2.1), ist die *de novo* Produktion von Sekretinhaltsstoffen eine biosynthetisch aufwändigere Strategie als die Sequestrierung. Im Falle einer Veränderung der Wirtspflanzenchemie hilft es aber der Larve, ihre chemische Verteidigung aufrechtzuerhalten. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt (Kap.: 3.3.2), dass eine ganze Reihe an Wehrsubstanzen auch ausschließlich *de novo* hergestellt werden kann. Ändert sich die Chemie der Wirtspflanze durch jahreszeitliche Schwankungen oder findet gar ein Wirtspflanzenwechsel statt, wie er während der Evolution von *C. lapponica* mehrfach vorgekommen ist, dann wäre die Larve so in der Lage, ihre Verteidigung durch den flexiblen Wechsel zwischen Sequestrierung und *de novo* Synthese trotzdem aufrechtzuerhalten. Zur Untersuchung des Ausmaßes dieses flexiblen Einsatzes beider Strategien wurde ein künstlicher Wirtspflanzenwechsel von *Betula nana* auf eine nicht als Wirtspflanze genutzte *Salix* ssp. herbeigeführt. Zur Untersuchung des Ursprungs der Alkoholeinheit wurden die Isotopensignaturen ausgewählter Wirtspflanzen-Alkohole sowie die Isotopensignaturen der Sekretalkohole vor und nach dem Wirtspflanzenwechsel mit GC-C-IRMS analysiert. Da bei diesem Experiment ausschließlich der Alkoholteil der Ester von Interesse war, wurden die Sekretester vor der Analyse hydrolysiert (Abb.: 3-14).

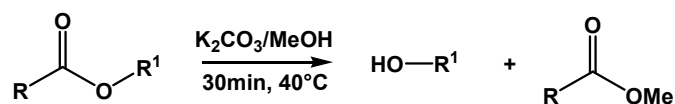
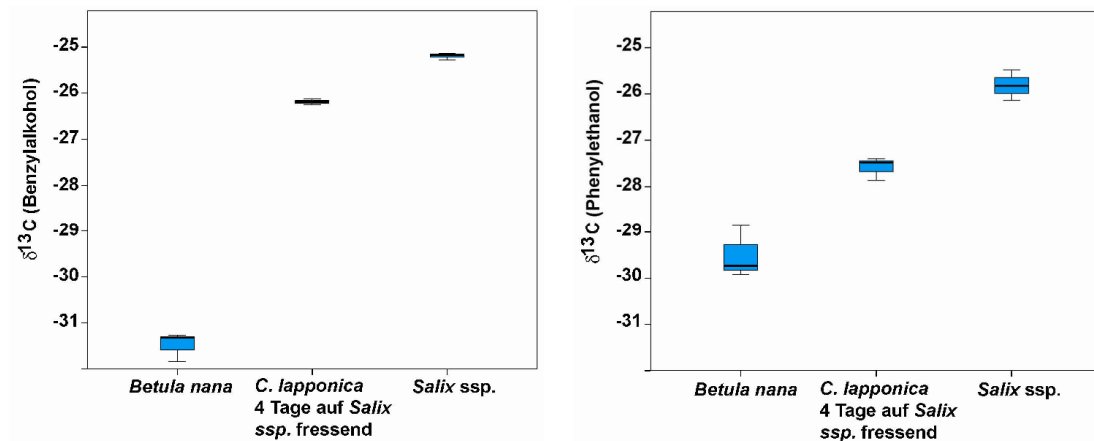


Abbildung 3-14: Formelschema zur Hydrolyse von Estern mit  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ .

Bei der Analyse der Proben zeigte sich, dass nach vier Tagen Fraß der Larven auf der nicht-natürlichen Wirtspflanze *Salix* ssp. die Isotopensignaturen von Benzylalkohol und Phenylethanol weder der natürlichen Wirtspflanze *Betula nana* entsprechen noch die Signatur des artifiziellen Wirtes *Salix* ssp. tragen (Abb.: 3-15). Eine ähnliche Isotopensignatur der Wirtspflanzenalkohole und Sekretalkohole deutet auf ein hohes Maß an Sequestrierung hin, während auffallend unterschiedliche Signaturen ein hohes Maß an *de novo* Synthese vermuten lassen könnten.





**Abbildung 3-15:** Isotopensignaturen von Benzylalkohol und Phenylethanol in der natürlichen Wirtspflanze *Betula nana*, der nicht-natürlichen Wirtspflanze *Salix ssp.* und des Sekrets nach vier Tagen Fraß auf *Salix ssp.*

Die Isotopensignatur ist abhängig von Umweltfaktoren, wie der geographischen Lage als auch von isotopendiskriminierenden enzymatischen Prozessen<sup>[6, 126]</sup>. Aufgrund der fehlenden Werte der Isotopensignaturen bei Fraß auf *Betula nana* am Tag Null des Wechsels kann nicht abschließend bewiesen werden, ob die beobachtete Differenz in den Signaturen auf eine von Natur aus intensive *de novo* Synthese der Alkohole hindeutet oder das Resultat des noch nicht abgeschlossenen Anpassungsprozesses an die neue Wirtspflanzenchemie darstellt, obwohl Benzylalkohol und Phenylethanol von Beginn an aus der neuen Wirtspflanze sequestriert werden. Dieses Szenario ist allerdings unwahrscheinlich, da die Reservoirs jeden Tag entleert wurden und somit ein vollständiger Austausch der pflanzlichen Präkursoren gewährleistet war. Somit ist ein signifikanter *de novo* Beitrag zur Biosynthese der Alkohole naheliegend.

### 3.3.7 Aminosäurezusammensetzung der Wirtspflanzen

#### 3.3.7.1 Produktion von Abwehrsubstanzen als Abbaumechanismus von überschüssigen Aminosäuren

Aufgrund der Spezialisierung der verschiedenen Populationen auf unterschiedliche Wirtspflanzen wurde vermutet, dass die Pflanzenchemie stark die chemische Zusammensetzung des Sekrets beeinflusst. So produzieren die Birke fressenden

Populationen große Mengen an Estern, bei denen die Säurekomponenten aus nachweislich pflanzenbürtigen Aminosäuren abgeleitet sind. In den salicinreichen Weide fressenden Populationen wird hingegen die Produktion von Salicylaldehyd bevorzugt. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass Birke höhere Konzentrationen an Aminosäuren, speziell Val (Isobutyrate), Ile (2-Methylbutyrate) und Phe (Benzoate) enthält. Zusätzlich wurde Ala als möglicher Acetatvorläufer genauer untersucht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Aminosäurezusammensetzung von *Betula nana* als Wirtspflanze der Ester produzierenden Population, sowie von *Salix breviserrata* als Wirtspflanze der Salicylaldehyd produzierenden Population untersucht (Abb.: 3-16). Dabei zeigte sich, dass *Salix breviserrata* bei den essentiellen Aminosäuren Val ( $F(1,4)=452.672$ ,  $p=0.000$ ), Phe ( $F(1,4)=1212.525$ ,  $p=0.000$ ) und Ile ( $F(1,4)=282.969$ ,  $p=0.000$ ) ähnlich wie die meisten anderen Aminosäuren (nicht dargestellt) eine hochsignifikant höhere Konzentration an freien Aminosäuren aufweist. Bei den proteingebundenen Aminosäuren kehrt sich das Ergebnis um.

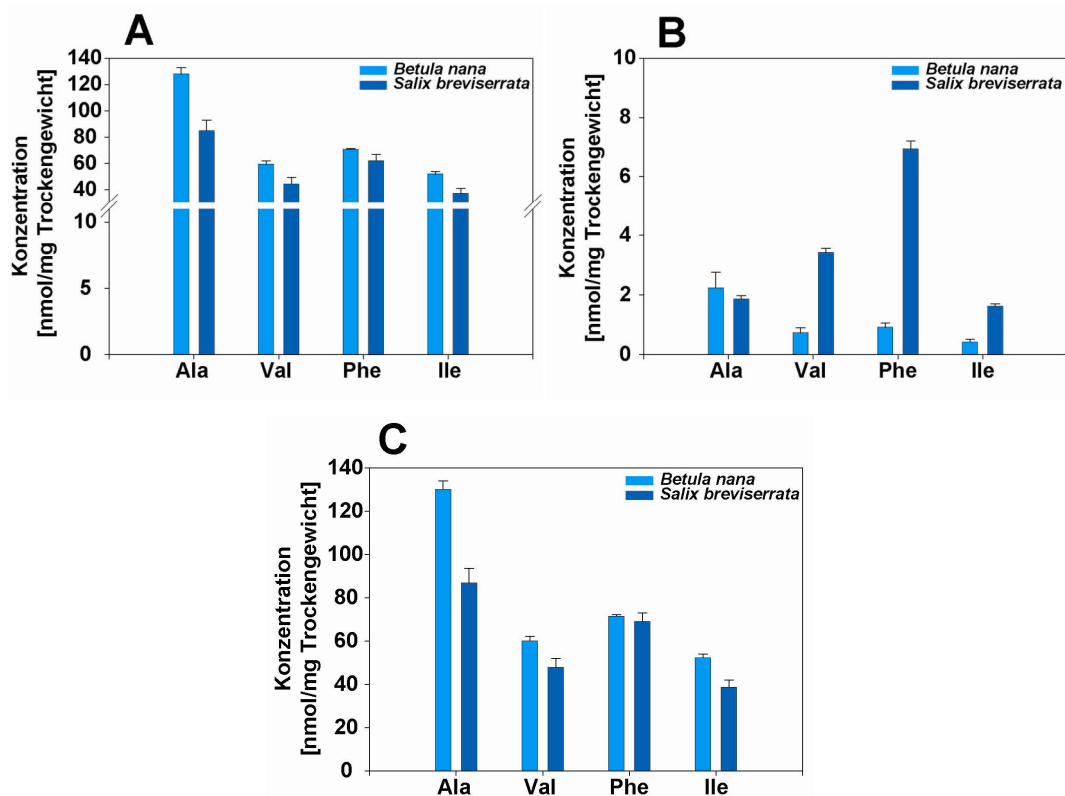


Abbildung 3-16: Konzentration an (A) gebundenen und (B) freien Aminosäuren, sowie (C) Gesamtamino säurekonzentration in *Betula nana* und *Salix breviserrata*, (n=3).

Hier ist bei Val ( $F(1,4)=23.037$ ,  $p=0.009$ ), Phe ( $F(1,4)=10.680$ ,  $p=0.031$ ), Ile ( $F(1,4)=38.734$ ,  $p=0.003$ ) und Ala ( $F(1,4)=68.585$ ,  $p=0.001$ ) eine signifikant höhere Konzentration, genauso wie bei vielen anderen Aminosäuren (nicht dargestellt), in den Blättern von *Betula nana* zu finden. Berechnet man hingegen die Gesamtaminosäurekonzentration, dann zeigt sich in den Blättern von *Betula nana* für Val ( $F(1,16)=61.941$ ,  $p=0.000$ ), Ala ( $F(1,16)=278.132$ ,  $p=0.000$ ) und Ile ( $F(1,16)=130.653$ ,  $p=0.000$ ) eine hochsignifikant höhere Konzentration als in *Salix breviserrata*. Bei Phe ( $F(1,16)=3.425$ ,  $p=0.083$ ) konnte statistisch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die signifikant höheren Gesamtaminosäurekonzentrationen von Ala, Val und Ile in *Betula nana* unterstützen zwar die Hypothese des Aminosäureabbaus durch die Esterbildung. Allerdings sind die statistisch nachgewiesenen Unterschiede objektiv gesehen so gering, dass es eine andere Erklärung für die Esterbildung geben muss.

Die leicht erhöhten Aminosäurekonzentrationen, speziell von Val, Ile und Ala, in *Betula nana* können nur unwesentlich zur Bevorzugung der Esterbildung beitragen.

Zusätzlich zu den beiden erwähnten Wirtspflanzenspezies wurde auch die kasachische Hochgebirgs-Weidenspezies (*Salix* spp.) untersucht, auf der die *C. lapponica* Larven alternativ fressen. In den Sekreten dieser Larven wurde kein Salicylaldehyd detektiert, stattdessen aber ein Esterspektrum, das den Birke fressenden Spezies stark ähnelt. Sollte die Hypothese der Esterproduktion aufgrund eines Überangebots an Aminosäuren stimmen, dann sollten *Betula nana* und die zuvor beschriebene *Salix* spp. eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung haben. Die Untersuchungen bestätigen, dass die Aminosäurekonzentrationen an Val und Ile hier nicht signifikant voneinander differieren. Bei Ala und Phe ist eine signifikant ( $p=0.05$ ) höhere Konzentration in *Betula nana* zu beobachten.

Aufgrund dieses Sachverhalts kann zwar ein kleiner Beitrag der Aminosäurekonzentration in den Pflanzen zur Wahl des Biosyntheseweges vermutet werden. Letztlich ist der Unterschied in den Gesamtaminosäurekonzentrationen aber zu gering, als dass ein klarer Einfluss bestätigt wird. Zudem ist nichts über die Transporteigenschaften der larvalen Aminosäuretransporter bekannt. Die interne larvale Aminosäurekonzentration wird nicht durch passiven Import bestimmt, sondern ist abhängig von der Transportkapazität der Aminosäuretransporter. Somit kann auch ein großes externes Angebot an Aminosäuren auf ein verwertbares Maß für die Larven reduziert werden.

### 3.3.8 Korrelation Blattalkohole vs. Sekretalkohole

Vorangegangene Experimente zum Ausmaß des Transports von verschiedenen Thioglucosiden haben bewiesen, dass der Großteil der verwendeten Thioglucoside in statistisch gleicher Menge in das Reservoir transportiert wird (Kap.: 3.3.1). Dieses Experiment gibt Aufschluss über das theoretische, aber nicht das natürliche Transportverhalten, da die Menge der angebotenen Thioglucoside ( $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) die natürliche Konzentration der Alkohole im Blatt weit übersteigt. Mit dem vorliegenden Experiment soll gezeigt werden, in welchem Konzentrationsverhältnis die Blattalkohole in der Wirtspflanze vorkommen und ob es Präferenzen für den Import bestimmter Alkohole gibt. Dazu wurden die Konzentrationen der aus den fünf Hauptsubstanzen abgeleiteten Alkohole im Sekret bestimmt. Ebenso wurde Blattmaterial der Wirtspflanze *Betula nana* auf die Alkoholkomposition untersucht (Tab.: 3-8).

**Tabelle 3-8: Prozentualer Anteil der Alkohole in den Wirtspflanzen und im Sekret, bezogen auf fünf Hauptkomponenten im Sekret der ausschließlich auf *Betula nana* fressenden Larven.**

Substanz	Anteil in Wirtspflanze [%]	Prozentualer Anteil in Sekret [%]
(Z)-3-Hexenol	7.2	12.5
Benzylalkohol	8.1	18.4
Phenylethanol	2.6	6.4
<i>p</i> -OH-Phenylethanol	18.5	<b>51.2</b>
Betuligenol	<b>63.6</b>	11.5

Es zeigte sich, dass die Mengenverhältnisse der Blattalkohole in der Wirtspflanze nicht im Sekret wiedergefunden werden können. Es scheint klare Präferenzen für den Import von *p*-OH-Phenylethanol zu geben, während Betuligenol als Hauptkomponente der Wirtspflanze nur in limitiertem Ausmaß importiert wird.

### 3.4 Wirkungsweise der Wehrsubstanzen

Diese Arbeit hat Beiträge zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Wehrsekrets und über das Ausmaß und die Selektivität des Transports von

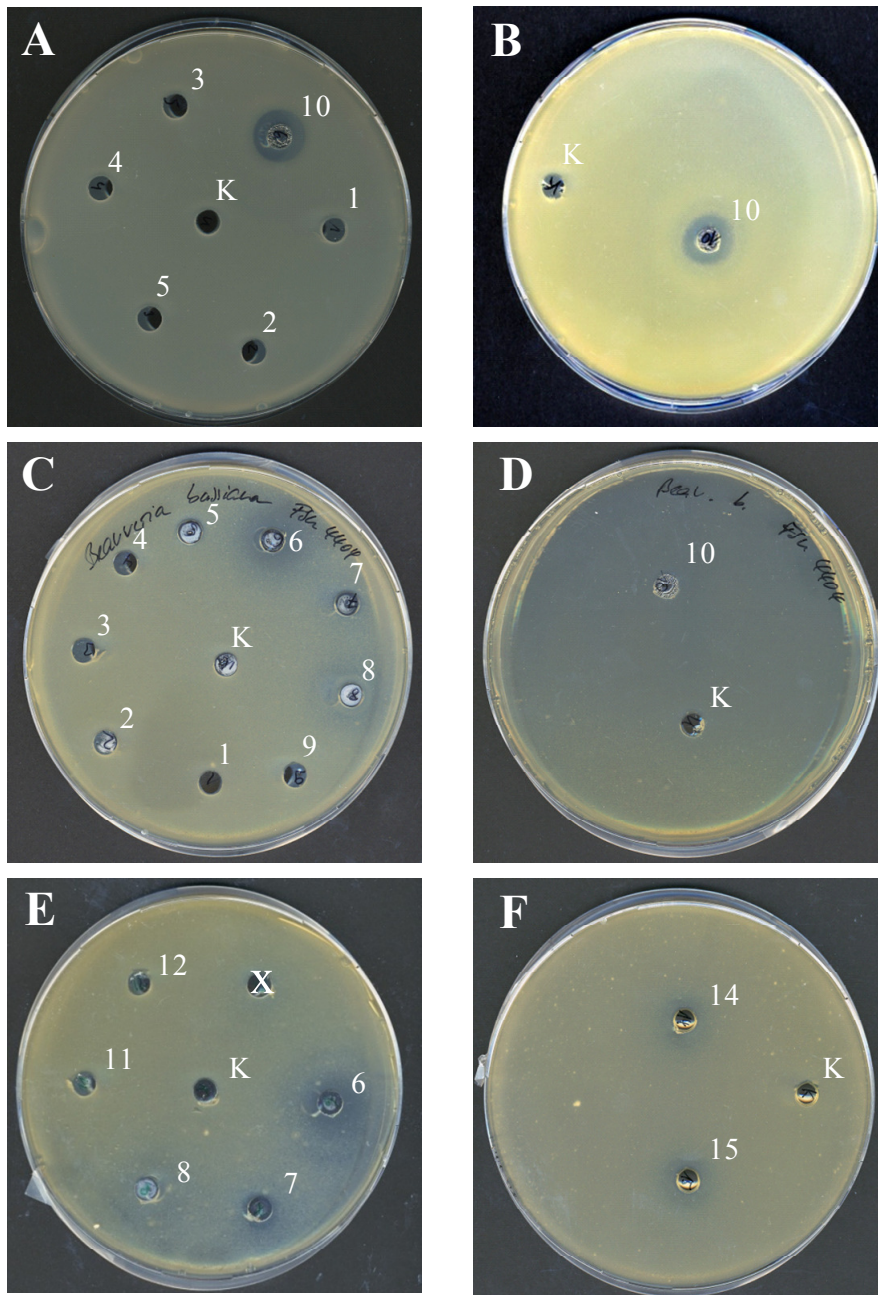
Wehrsubstanzvorstufen aus den Wirtspflanzen, sowie über die Biosynthese der Wehrsubstanzen geleistet. Gänzlich unbekannt ist darüber hinaus die Wirkungsweise des Wehrsekrets der Birke fressenden *C. lapponica* Populationen. Frühere Arbeiten wiesen nach, dass Salicylaldehyd durch seine antimikrobiellen Eigenschaften als Verteidigungssubstanz der Weiden bewohnenden Populationen wirkt<sup>[49]</sup>. Die Wehrsekrete der auf Birke lebenden Spezies enthalten kein Salicylaldehyd, sondern Säuren, Alkohole und deren Ester. Diesen wurde bisher kein antibakterieller, antifungaler und zytotoxischer Effekt gegen Insektenzellen (*Trichoplusia ni*)<sup>[49]</sup> nachgewiesen. Die abwehrende bzw. giftig wirkende Substanz im Sekret wurde daher bisher nicht identifiziert. Die im Sekret vorhandenen leichtflüchtigen Ester von Blattalkoholen haben möglicherweise eher die Aufgabe einer long-range-Abwehr, da sie leichtflüchtig sind und die Population in eine „Duftwolke“ einhüllen.

Mit dem derzeitigen Stand des Wissens können wir unter Betrachtung der Inhaltsstoffe bei der kasachischen Population sowie der tschechischen Population eigentlich nicht von einem Wehrsekret sprechen, da keiner der nachgewiesenen Inhaltsstoffe über ein Giftpotential verfügt. Im Gegenteil, die Ester, wie Benzylisobutyrat finden teilweise als Duft- und Aromastoffe Anwendung in der Nahrungsmittel- und Duftstoffindustrie. Die erstmals in dieser Arbeit nachgewiesenen 6-*O*-Acylglucosen scheinen ebenfalls über kein toxisches Potential zu verfügen. Für pflanzliche 2,3,4-Tri-*O*-acylglucosen wurde zwar bereits ein abwehrender Effekt auf Blattläuse nachgewiesen<sup>[44, 97]</sup>. Die Giftigkeit der Triacylglucosen scheint auf deren Hydrolyse zurückzuführen zu sein, bei der Carbonsäuren frei gesetzt werden. Carbonsäuren sind mit zunehmender Kettenlänge in der Lage, die lipophilen Zellmembranen von Predatoren zu durchdringen. Die größte Toxizität wurde dabei für Laurinsäure nachgewiesen<sup>[124]</sup>. Für die 6-*O*-Acylglucosen ist diese Hypothese nicht anwendbar, da die Säurekomponenten nur eine Kettenlänge von C<sub>4</sub> bzw. C<sub>5</sub> besitzen und zudem die 6-*O*-Ester stabiler sind als die pflanzlichen 2,3,4-*O*-Triacylglucosen und somit weniger freie Säuren gebildet werden.

Zu einem geringen Teil (3%) liegen auch freie Säuren (Essigsäure, Isobuttersäure, 2-CH<sub>3</sub>-Buttersäure und Benzoesäure) vor. Diesen wird aber eher ein Pheromon-Charakter zugeschrieben. So nutzen Rentiere diese Säuren als Territorialmarker<sup>[21]</sup>. Rhesus-Affen nutzen Essigsäure und Isobuttersäure als männliches Sexstimulans<sup>[17, 25, 64, 91]</sup>. Eine direkte ichthyotoxische und antifungale Wirkung wurde bisher nur für



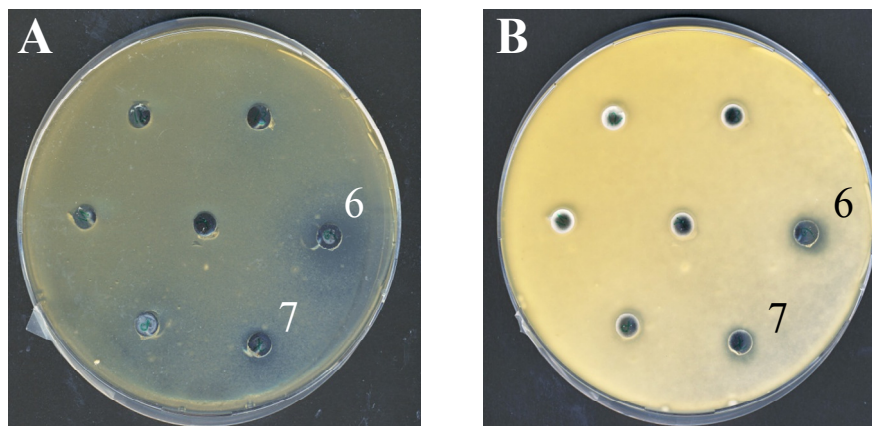




**Abbildung 3-17:** Agardiffusionstests mit natürlichen Konzentrationen verschiedener Sekretinhaltsstoffe gegen (A) *Escherichia coli* N100, (B) *Saccharomyces cerevisiae* h107, (C-F) *Beauveria bassiana* FSU-4404: (1) Benzylalkohol: 0.4 mM, (2) (Z)-3-Hexenylisobutyrat: 5.0 mM, (3) Essigsäure: 4.5 mM, (4) Benzylisobutyrat: 10.9 mM, (5) Phenylethyl-2-methylbutyrat: 4.1 mM, (6) *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat: 31.3 mM, (7) Betuligenolisobutyrat: 5.3 mM, (8) 8-OH-Linalyl-2-methylbutyrat: 0.2 mM, (9) Glucose: 605 mM, (10) Salicylaldehyd: 1681 mM (finnische *C. lapponica* Population), (11) Glucose-6-*O*-isobutyrat: 24.2 mM, (12) Glucose-6-*O*-2-methylbutyrat: 97.8 mM, (14) Isobuttersäure: 1.4 mM, (15) 2-Methylbuttersäure 0.4 mM, (K) Kontrolle: EtOH.

Eine Hemmung des Wachstums kann bei Gram-negativen Bakterien durch Salicylaldehyd beobachtet werden. Alle anderen getesteten Substanzen zeigten keine Inhibierung des Wachstums. Die Versuche bestätigen die antibakterielle Wirkung von Salicylaldehyd auf ausgewählte Gram-negative, aber nicht das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis*<sup>[49]</sup>. Gross untermauerte die antibakterielle und antifungale Wirkung von Salicylaldehyd durch ein Experiment, in dem er das Wehrsekret aus den Drüsenreservoirien von *Phratora vitellinae* entfernte. Daraus resultierte eine erhöhte Anfälligkeit der Larven für Infektionen durch die entomopathogenen Pilze *Beauveria bassiana* und *Metarhizium anisopliae*<sup>[50]</sup>.

Interessanterweise konnte bei beiden Stämmen von *Beauveria bassiana* eine Hemmung des Wachstums in der Gegenwart von Salicylaldehyd, *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat, *p*-OH-Phenylethylisobutyrat (gegen *Beauveria bassiana* FSU-4404 getestet, keine Abbildung) und Betuligenolisobutyrat beobachtet werden. Diese Hemmung ist auch nach sieben Tagen noch deutlich nachzuweisen (Abb.: 3-18).



**Abbildung 3-18:** Agardiffusionstests mit (6) *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat: 31.3 mM, (7) Betuligenolisobutyrat: 5.3mM gegen *Beauveria bassiana* FSU-4404. (A) nach drei Tagen, (B) nach sieben Tagen.

*p*-OH-Phenylethylester stellen mit ca. 50 Massen-% die Hauptsubstanzen in den Sekreten der kasachischen Population dar. Diese Substanzen sind ebenfalls in anderen Populationen aus Tschechien, Frankreich (Saint-Véran, Roché-Sanadoire) und Deutschland zu finden. Des Weiteren konnten sie auch im Sekret der Erle fressenden Spezies *C. mainensis interna* aus Alaska nachgewiesen werden (Kap.: 3.2).



Dieselben Substanzen zeigten auch eine inhibierende Wirkung auf *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* sowie eine schwache Hemmung auf das Wachstum von *Escherichia coli*.

Die erstmalig im Sekret von *C. lapponica* Larven nachgewiesenen 6-*O*-Acylglucosen zeigten trotz der hohen Konzentrationen in den Hemmhoftests keine Wirkung auf *E. coli*, *P. syringae* pv. *glycinea* und *Beauveria bassiana* FSU-4404. Da ihnen auf diesem Weg keine mikrobiologische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob sie doch nur als Nebenprodukte der Transacylierungsreaktion aufzufassen sind. Möglicherweise diskriminiert die larvale Acyltransferase aufgrund ihrer breiten Substrattoleranz nicht zwischen wehrstrategisch aktiven und inaktiven Stoffen, sondern verestert den Großteil der im Reservoir vorhandenen Stoffe.

Zusätzlich zu den Estern wurden auch die korrespondierenden freien Säuren Isobuttersäure und 2-CH<sub>3</sub>-Buttersäure auf ihre Hemmwirkung gegen *Beauveria bassiana* FSU-4404 getestet. Dabei stellte sich heraus, dass beide Säuren in Konzentrationen von 10 mM eine deutliche Hemmwirkung nach 72 h zeigen. Diese Hemmwirkung verliert sich allerdings nach sieben Tagen. Damit ist die Wirkung wohl eher auf eine temporäre Erniedrigung des pH-Wertes in der Wachstumszone zurückzuführen und greift nicht grundlegend in den mikrobiellen Organismus ein wie im Falle der Benzoesäure<sup>[71, 118, 138, 142, 143]</sup>. Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure und Benzoesäure stellen mit einer Summe von ca. 130 ng/mg Sekret zudem eine Minorität unter den Sekretinhaltsstoffen dar. Eine Hydrolyse der Ester trägt aufgrund ihrer Stabilität nur geringfügig zur Erhöhung der Konzentration an freien Säuren bei. Essigsäure mit 220 ng/mg Sekret zeigte keine antimikrobielle Wirkung.

Die extrem hohen Glucosekonzentrationen von bis zu 14% zeigten keine Hemm- und auch keine wachstumsfördernde Wirkung in den Agardiffusionstests. Vermutlich sind die hohen Konzentrationen auf den eingeschränkten Rücktransport aus dem Reservoir zurückzuführen (Kap.: 3.2.1). Ein positiver und willkommener Nebeneffekt der hohen Glucosekonzentrationen könnte die Erniedrigung des Dampfdruckes des Sekrets verbunden mit einer verminderten Verdunstung der leichtflüchtigen Ester sein.

Zusätzlich zu den Einzelsubstanzen wurde auch eine, aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit, 25-fach verdünnte Lösung des Sekrets in einem Hemmhoftest mit

*Beauveria bassiana* FSU-4404 verwendet. Hierbei konnte keine Hemmwirkung festgestellt werden. Allerdings zeigte ein Test mit verschiedenen Konzentrationen der mikrobiologisch wirksamen *p*-OH-Phenylethylester, dass auch hier die natürliche Konzentration im Sekret die minimal wirksame Konzentration darstellt. Aus diesem Grund kann auch für das verdünnte Sekret keine Hemmwirkung beobachtet werden.

In diesem Test konnte für drei der Hauptsubstanzen im Sekret der Birke fressenden *C. lapponica* Larven eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. Die Produktion einer solchen Vielfalt an Substanzen, wie sie in Birke fressenden Populationen beobachtet wird, scheint hingegen andere wehrstrategische und biosynthetische Gründe zu haben. Auf der einen Seite kann die Komposition die Wirksamkeit einzelner Substanzen steigern. Auf der anderen Seite kann auch das Zusammenspiel der selektiven, aber unspezifischen Glucosidtransporter und die breite Substratspezifität der Acyltransferase (Kap.: 3.3.5.4) für das große Substanzspektrum im Sekret verantwortlich sein.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

---

Im Laufe der Evolution haben Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae) erstaunlich vielfältige Verteidigungsmechanismen gegen Fraßfeinde entwickelt. Dazu gehören nicht nur morphologische Charakteristika und bestimmte Verhaltensweisen, sondern auch eindrucksvolle chemische Verteidigungsstrategien. Innerhalb des Subtribus Chrysomelina, zu welchem die in dieser Arbeit untersuchte Spezies *Chrysomela lapponica* gehört, lässt sich eine enge Verknüpfung zwischen der Wirtspflanzenchemie und der Zusammensetzung des Sekrets beobachten. Spezies, die *de novo* Iridoide produzieren, sind weitgehend unabhängig von ihren Wirtspflanzen und eine entsprechende Wirtspflanzenvielfalt kann beobachtet werden (Abb.: 1-2). Die Salicylaldehyd produzierenden Spezies sind hingegen auf den Eintrag der Vorstufe Salicin aus Weiden angewiesen. Die sogenannte Interrupta-Gruppe, der *C. lapponica* angehört, zeigt ein sehr breites Spektrum an Wehrsubstanzen, welches von Estern dominiert wird, sofern die Spezies auf Birke oder anderen salicinarmen Wirtspflanzen lebt. Fressen Interrupta-Spezies auf salicinreichen Weiden bevorzugen sie die Bildung von Salicylaldehyd.

Während die Biosynthese der Iridoide und von Salicylaldehyd schon im Detail untersucht wurde<sup>[22, 87, 92, 98, 119, 126, 135, 136]</sup>, ist über die Biosynthese der Ester noch wenig bekannt. Man weiß bereits, dass die Vertreter der Interrupta-Gruppe, somit auch *C. lapponica*, eine biosynthetische Strategie verfolgen, bei der die Sequestrierung von pflanzenbürtigen Alkoholen und die *de novo* Synthese von Säuren aus dem internen larvalen Aminosäurepool miteinander kombiniert wird, um Ester zu produzieren. Gerade in *C. lapponica* gibt es eine so außergewöhnlich hohe Vielfalt an Estern, dass das Prinzip der Acylierungsreaktion von großem wissenschaftlichem und gegebenenfalls auch industriellem Interesse ist. Im Sekret der Birke fressenden Population wurden ca. 60 verschiedene Ester nachgewiesen<sup>[58]</sup>, wobei die Isobutyrate und 2-Methylbutyrate von Blattalkoholen dominieren und Benzoate von Blattalkoholen sowie Methyl- und Ethylester von langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren die Minorität darstellen (Kap.: 3.2). Als Hauptsubstanzen konnten in der kasachischen Birke fressenden Population *p*-OH-Phenylethylisobutyrat und *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat identifiziert werden. Zusätzlich zu den bereits

bekanntem Inhaltsstoffen wurden auch außergewöhnlich große Mengen an Glucose und 6-*O*-Glucoseestern nachgewiesen. Deren Quantifizierung ergab, dass ihre Stoffmengenkonzentration die an Blattalkoholabgeleiteten Estern um ein Sechsfaches übersteigen (Kap.: 3.2.1). Glucose und 6-*O*-Glucoseester konnten auch in allen anderen untersuchten Spezies der *Interrupta*-Gruppe nachgewiesen werden. Die Ursache für den teilweise enormen Überschuss an Glucose im Sekret einiger Spezies konnte noch nicht gefunden werden. In zukünftigen Arbeiten sollte dieses Phänomen, das auf die *Interrupta*-Gruppe beschränkt ist, geklärt werden. Der Ursprung der Glucose könnte durch Injektionsexperimente mit  $^{13}\text{C}_6$ -*O*-Glucosiden und anschließender Bestimmung des Verhältnisses von  $^{13}\text{C}_6/^{12}\text{C}_6$ -Glucose erfolgen.

Eng mit der Produktvielfalt im Sekret von *C. lapponica* ist die Fähigkeit der Larven verbunden, selektiv aber unspezifisch Glucoside aus der Wirtspflanze in das Reservoir zu sequestrieren. Zum Studium dieses Transportverhaltens wurden Thioanaloga der natürlichen *O*-Glucoside synthetisiert. Da diese ebenso verestert werden wie die Blattalkohole wurden für die Quantifizierung des Transports zusätzlich 6-*O*-isobutyryl und 6-*O*-2-methylbutyrylthioglucoide durch enzymatisch katalysierte Veresterung hergestellt (Kap. 5.16.1).

Es hat sich gezeigt, dass der unspezifische Import bezüglich des Aglucons zusammen mit einem selektiven Glucosidtransport in allen untersuchten Populationen von *C. lapponica* beobachtet werden kann (Kap.: 3.3.1).

Neben der Sequestrierung von glucosidisch gebundenen Blattalkoholen wurde auch die *de novo* Produktion von Säuren aus Aminosäuren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Isobutyrate aus Valin, 2-Methylbutyrate aus Isoleucin und Benzoate aus Phenylalanin abgeleitet sind. Zusätzlich zum oxidativen Aminosäureabbau konnte für Phenylalanin auch ein reduktiver Weg nachgewiesen werden, bei dem Phenylethanol, Benzylalkohol und *p*-OH-Phenylethanol gebildet werden (Kap.: 3.3.2). Leucin als Isoleucin-Isomer wurde nicht von den Larven verstoffwechselt. Die Frage nach dem Ort des Aminosäureabbaus konnte geklärt werden. Durch Inkubationsexperimente mit Fettkörpergewebe und  $^{13}\text{C}$ -Phe konnte der Fettkörper als Ort des Aminosäureabbaus identifiziert werden (3.3.4).

Der außerordentlich interessante Schritt der Transacylierung, die im Drüsenreservoir stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Demnach wurden durch Aktivitätstests mit synthetischen Analoga 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen als

Acylendonoren identifiziert (Kap.: 3.3.5.2). Die Biosynthese der 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen erfolgt aus der Reaktion von UDP-Glucose mit den im Fettkörper synthetisierten Säuren (Kap.: 3.3.5.3). Damit konnte für *C. lapponica* ein in Insekten bislang einmaliger Transacylierungsmechanismus nachgewiesen werden. Doch nicht nur dieser neu entdeckte Biosyntheseweg ist von wissenschaftlichem Interesse. Auch die extrem breite Substrattoleranz der Acyltransferase im Hinblick auf Säuren (aminosäureabgeleitete, nicht aminosäureabgeleitete), Alkohole (primäre, sekundäre) und 1-*O*- $\beta$ -D-acylglycosen (Glucose, Galactose) könnte zukünftig in der chemischen Industrie eingesetzt werden (Kap.: 3.3.5.4). Dazu muss die Sequenz des Gens analysiert und die Acyltransferase heterolog expremiert werden. Bislang konnte in einer cDNA-Bibliothek des Drüsengewebes noch keine Übereinstimmung mit bereits bekannten Proteinen gefunden werden. Da dieser Weg erfolgversprechend ist, sollte an der Optimierung der cDNA-Bibliothek gearbeitet werden und bioinformatische Expertise in deren Auswertung einfließen.

Die erfolgreichen Experimente in dieser Arbeit ermöglichen es, für die Biosynthese der Ester in *C. lapponica* Larven einen vollkommen neuen Weg vorzuschlagen. Demnach findet im Fettkörper die Transaminierung und oxidative Decarboxylierung der Aminosäuren zu Säuren statt. Die Säuren werden über die Hämolymphe in das Reservoir transportiert. Anschließend erfolgt vermutlich dort die UDP-abhängige Glucosylierung der Säuren zu 1-*O*- $\beta$ -D-acylglycosen. Alternativ ist auch die UDP-abhängige Glucosylierung der Säuren im Fettkörper mit anschließendem Transport der 1-*O*- $\beta$ -D-acylglycosen über die Hämolymphe ins Reservoir denkbar. Aus dem Darm werden glucosidisch gebundene Blattalkohole in das Reservoir transportiert und die Alkohole dort deglucosyliert. Anschließend findet die enzymatisch katalysierte Transacylierung der 1-*O*- $\beta$ -D-acylglycosen auf den Alkohol statt, wodurch die Ester gebildet werden (Kap.: 3.3.5.6).

Wie bereits erwähnt, sind *C. lapponica* Larven in der Lage, nicht nur Säuren, sondern auch Alkohole *de novo* aus Aminosäuren herzustellen. Damit sind sie theoretisch in der Lage, eine große Zahl der Hauptkomponenten im Sekret autogen herzustellen (Kap.: 3.3.2). Das Ausmaß der *de novo* Synthese gegenüber der Sequestrierung wurde durch Analyse der Isotopensignaturen von Sekretalkoholen und Wirtspflanzenalkoholen mit GC-C-IRMS bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente deuten darauf hin, dass sich *C. lapponica* im Falle eines Wirtspflanzenwechsels, wie er im Laufe der

Evolution mehrfach vorgekommen ist, durchaus auf die *de novo* Synthese von Wehrsubstanzen umstellen kann und somit trotz fehlender pflanzlicher Vorstufen die chemische Verteidigung aufrechterhalten kann (Kap.: 3.3.6). In zukünftigen Arbeiten sollte die zeitabhängige Veränderung der Isotopensignaturen der Sekretalkohole nach einem Wirtspflanzenwechsel mit GC-C-IRMS genauer untersucht werden. Dieser Zeitverlauf gibt Aufschluss über das tatsächliche Ausmaß von *de novo* Synthese und Sequestrierung.

In allen untersuchten *C. lapponica* Populationen wurde die zuvor beschriebene Esterbildung beobachtet, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Kap.: 3.2). Dabei scheint der Einsatz der Esterbildung vom externen Angebot an Salicin durch die Wirtspflanze abhängig zu sein. Als Ursache für diesen Effekt kann zum einen die Aktivität der Salicylalkoholoxidase verantwortlich gemacht werden, die effektiv Salicylalkohol zu Salicylaldehyd umsetzen kann. Diese Substanz wird als Hauptsubstanz im Sekret der salicinreichen Weide fressenden Populationen beobachtet. Auf der anderen Seite wurde vermutet, dass die Esterbildung auch eine Reaktion auf die Aminosäurezusammensetzung der Wirtspflanzen ist. Der Teilschritt der *de novo* Produktion von Säuren aus Aminosäuren könnte vermutlich durch das pflanzliche Angebot an Aminosäuren kontrolliert werden. Für diese Hypothese wurde kein schlüssiger Beweis gefunden, da sich die Konzentrationen an Aminosäuren in *Betula nana* als Wirtspflanze der Ester produzierenden Larven und *Salix breviserrata* als Wirtspflanze der Salicylaldehyd produzierenden Larven nicht erheblich voneinander unterscheiden (Kap.: 3.3.7.1).

Bereits in Kapitel 3.3.1 wurde das Transportverhalten der larvalen Glucosidtransporter mit synthetischen Thioanaloga der natürlichen Blattalkoholglucoside untersucht. Dieses Experiment gab zwar Aufschluss über die enorme Transportkapazität der Glucosidtransporter, nicht aber über das natürliche Transportverhalten von glucosidisch gebundenen Vorstufen aus der Wirtspflanze. Dieses diskriminiert deutlich zwischen verschiedenen Blattalkoholen, wie die Bestimmung der Alkoholzusammensetzung in der Wirtspflanze und im Sekret zeigt. So wird in Birke fressenden Larven glucosidisch gebundenes *p*-OH-Phenylethanol bevorzugt in das Reservoir transportiert, obwohl die Hauptsubstanz in den Blättern der Birke glucosidisch gebundenes Betuligenol ist (Kap.: 3.3.8).

Mit dem vorangegangenen Experiment in engem Zusammenhang steht auch die Beurteilung der Wirkungsweise des Sekrets. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die

mikrobiologische Wirksamkeit der Sekretinhaltsstoffe gegen verschiedene Bakterien, Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und den entomopathogenen Pilz *Beauveria bassiana* untersucht. Dabei erwiesen sich in Hemmhoftests die Hauptsubstanzen *p*-OH-Phenylethylisobutyrat, *p*-OH-Phenylethyl-2-methylbutyrat und Betuligenolisobutyrat im Sekret der Birke fressenden Populationen als andauernd hocheffektiv gegen *B. bassiana*, *P. syringae* pv. *glycinea* und *E. coli*. Die mikrobiologische Wirksamkeit von Salicylaldehyd als Hauptsubstanz der salicinreichen Weide fressenden Populationen konnte bestätigt werden. Alle anderen getesteten Sekretinhaltsstoffe zeigten keine mikrobiologische Wirksamkeit, mit Ausnahme von Isobuttersäure und 2-Methylbuttersäure, die eine kurzzeitige aber nicht dauerhafte Hemmung des Wachstums verursachten (Kap.: 3.4.1). Von weiterem Interesse ist auch die Wirksamkeit des Sekrets gegen Ameisen und andere Prädatoren. Diese sollte durch Präferenz-Experimente sowie Elektroantennogramm-Analysen mit Ameisen evaluiert werden.

## 5 Experimenteller Teil

---

### 5.1 Materialien und Geräte

#### Spektroskopie

NMR-Spektrometer:	Bruker Avance DRX 500
IR-Spektrometer:	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
UV-Spektrometer:	JASCO V-550UV/VIS Spektrophotometer

#### Chromatographie

GC-EIMS:	ThermoQuest Finnigan Trace GC-MS 2000 (Quadrupol) ausgestattet mit einer Alltech EC 5-Säule, 15 m x 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm
LC-MS:	Agilent HP1100 mit Finnigan LCQ (Quelle: APCI oder ESI)
LC-Säulen:	GROM-SIL 120 ODS-7 ph, 4 µm, 125x2 mm
GC-C-IRMS:	Micromass IsoPrime
Präparative HPLC:	Gilson
Säulenchromatographie:	Merck, Kieselgel 60 (0.0963-0.200 mm)
Dünnschichtchromatographie:	Merck, PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F <sub>245</sub> , Schichtdicke 2 mm

### 5.2 Chemikalien

Chemikalien, Enzyme und Standards wurden bei Sigma-Aldrich erworben, sofern nicht anders angegeben.

### 5.3 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS Statistics 17.0 durchgeführt. Um zuverlässige Daten zu erhalten, wurden alle Experimente mehrmals durchgeführt. Ausreißer nach GRUBBS wurden aus den Datensätzen eliminiert. Unterschiede zwischen den Transportraten der Thioglycoside wurden durch univariate Varianzanalyse (ANOVA) festgestellt. Da bei den Thioglucosid-Fütterungsstudien



keine Varianzgleichheit angenommen werden konnte, wurde *post-hoc* der T2-Test nach Tamhane angewandt, um signifikante Unterschiede zwischen den Proben zu evaluieren. Unterschiede in den Aminosäurekonzentrationen wurden durch univariate Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt.

#### 5.4 Käfer und Larven

<i>Chrysomela lapponica</i> (Kasachstan):	Uryl, 49°05'N, 86°01'O
<i>Chrysomela lapponica</i> (Frankreich):	Saint-Véran, 44°41'N, 6°55'O
<i>Chrysomela lapponica</i> (Deutschland):	Oberriech, 47°30'N, 8°20'O
<i>Chrysomela lapponica</i> (Frankreich):	Roche Sanadoire, 45°40'N, 2°40'O
<i>Chrysomela lapponica</i> (Tschechien):	Kladská, 50°01'N, 12°40'O
<i>Chrysomela lapponica</i> (Finnland):	Kevo, 69°45'N, 27°01'O
<i>Chrysomela populi</i> (Deutschland):	Furth im Wald, 49°18'N, 12°50'O
<i>Phaedon cochleariae</i> (Deutschland):	eigene Zucht
<i>Chrysomela mainensis interna</i> (Alaska):	Fairbanks, 64°50'N, 147°38'W
<i>Plagioderia rileyi equadoriensis</i> (Equador):	Cascada de San Rafael, 0°06'S, 77°35'W
<i>Phaedon semimarginatus</i> (Equador):	Baeza, Napo Province, 0°27'S, 77°53'W
<i>Plagioderia viridipennis</i> (Brasilien):	Serra do Maranguape, Fortaleza, 3°43'S, 38°32'W
<i>Plagioderia versicolora</i> (Belgien):	Brüssel, 50°51'N, 4°21'O
<i>Gastrophysa viridula</i> (Belgien):	Brüssel, 50°51'N, 4°21'O

#### 5.5 Haltung der Larven

Die *Chrysomela lapponica* Larven aus Saint-Véran (Frankreich) wurden in einem Weinschrank bei 20 °C und einem Tag/Nachtrhythmus von 16/8 Stunden gehalten. Die Larvenboxen wurden mit einem leicht feuchten Papiertuch ausgelegt und die Larven darin mit *Salix caprea* bzw. *Salix alba* gefüttert.

Experimente mit *C. lapponica* Larven aus Kasachstan wurden während der Exkursionen ins West-Altai (08/2006 & 08/2008) durchgeführt. Die Larven wurden

bei RT (ca. 20-25 °C) in mit leicht feuchtem Papiertuch ausgelegten Larvenboxen gehalten.

Von allen anderen Larven wurde das Sekret von Prof. Jacques M. Pasteels (Brüssel) jeweils vor Ort gesammelt und in zugeschweißten Glaskapillaren nach Jena versendet.

## 5.6 Sammlung von Wehrsekret

Die Larven wurden mit einer Glaskapillare (Hirschmann Laborgeräte, ID: 0.28 mm, Länge: 100 mm) kurz gereizt, so dass sie den Inhalt ihrer Drüsenreservoirs präsentierten. Die Sekretröpfchen wurden anschließend mit der Glaskapillare gesammelt.

## 5.7 Fütterungsexperimente

### 5.7.1 Thioglucoside

Die Versuche wurden in einer Petrischale mit Deckel durchgeführt. Blätter wurden mit einer 10 mM Lösung von Thioglucosiden in Wasser bestrichen, so dass die Konzentration  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$  erreichte. Die Blätter wurden unter einem leichten Luftstrom getrocknet und anschließend 10 Larven darauf gesetzt. Nach 24 h wurde mit einer Kapillare Sekret gesammelt. Das Sekret wurde in einem definierten Volumen MeOH (10-100  $\mu\text{l}$ ) gelöst und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (5 min, 13200 rpm) abgetrennt. Der Überstand wurde mit LC-MS analysiert.

Säule:	GROM-SIL 120 ODS-7 pH, 4 $\mu\text{m}$ , 125 x 2 mm
Temperatur:	20 °C
Laufmittel:	0.5% Essigsäure in Wasser (A) 0.5% Essigsäure in Acetonitril (B)
Detektor:	UV-Detektor – 224 nm, 254 nm, 280 nm

Zeit [min]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	5	0.25
17	100	0.25
25	100	0.25
25.1	5	0.25
35	5	0.25

### 5.7.2 Isotopenmarkierte Aminosäuren

Die Versuche wurden in einer Petrischale mit Deckel durchgeführt. Blätter wurden mit einer 10 mM Lösung von isotopenmarkierter Aminosäure in Wasser bestrichen (DL-Leucin-2- $^{13}\text{C}$ ] (Campro), L-Phenylalanin- $^{2}\text{H}_5$ ] und Valin- $^{2}\text{H}_8$ ] (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), L-Isoleucin- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] (Isotec, Inc.) so dass die Konzentration  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$  erreichte. Die Blätter wurden unter einem leichten Luftstrom getrocknet und anschließend 10 Larven darauf gesetzt. Nach 24 h wurde mit einer Kapillare Sekret gesammelt. Dieses Sekret wurde in  $20 \mu\text{l}$  EtOAc bzw.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 13200 rpm) und der Überstand der GC-C-IRMS-Analytik zugeführt. So konnte experimentell die Isotopensignatur der Substanzen als  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bestimmt werden.

Die Berechnung von  $^{13}\text{C}[\%]$  aus  $\delta^{13}\text{C}$  erfolgte nach folgender Formel:

$$^{13}\text{C}[\%] = \frac{R_{\text{Probe}}}{1 + R_{\text{Probe}}} \cdot 100$$

mit:

$$R_{\text{Probe}} = \frac{\delta^{13}\text{C}[\text{‰}]_{\text{V-PDB}} \cdot R_{\text{V-PDB}}}{1000} + R_{\text{V-PDB}}$$

V-PDB: Vienna Pee Dee Belemnite (Referenz)

$R_{\text{Probe}}$ : Isotopenverhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

$R_{\text{V-PDB}}$ : =0.0112375

$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}]_{\text{V-PDB}}$ : experimentell ermittelter  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert

### 5.7.3 [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Benzoessäure

Die Versuche wurden in einer Petrischale mit Deckel durchgeführt. Blätter wurden mit einer 10 mM Lösung von [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Benzoessäure (Isotec, Inc) in Wasser bestrichen, so dass die Konzentration 0.5 μmol·cm<sup>-2</sup> erreichte. Die Blätter wurden unter einem leichten Luftstrom getrocknet und anschließend 10 Larven darauf gesetzt. Nach 24 h wurde mit einer Kapillare Sekret gesammelt. Dieses wurde in 20 μl EtOAc aufgenommen und der GC-EIMS-Analytik zugeführt.

Säule: Alltech EC-5, 15 m, ID: 0.25 mm, Film: 0.25 μm  
 Trägergas: Helium (3 ml/min)  
 Split: 1/10

Heizrate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	45	2
10	280	5

### 5.8 Inkubation des Fettkörpergewebes mit <sup>13</sup>C-Phenylalanin

Fettkörpergewebe wurde aus 10 Larven präpariert, in 0.5 ml RNA-later überführt und mit 100 μl 10 mM 2-[<sup>13</sup>C]-Phe in H<sub>2</sub>O 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 0.5 ml Ethylacetat extrahiert, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 13200 rpm) und mit GC-EIMS vermessen.

Säule: Alltech EC-5, 15 m, ID: 0.25 mm, Film: 0.25 μm  
 Trägergas: Helium (3 ml/min)  
 Split: ohne

Heizrate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	45	2
10	280	5

## 5.9 Injektionsexperimente

2x69 nl einer 2.5 mM Lösung von [ $^2\text{H}_5$ ]-Benzoessäure (Isotec, Inc.) in 0.9% NaCl in Wasser wurden mit dem WPI Nanoliter 2000 Injector (2.3–73.6 nl, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit ausgezogenen Glaskapillaren (AD: 1.14 mm, ID: 0.5 mm) injiziert.

Die Larven wurden auf ein Blatt *Betula pendula* gesetzt und fressen gelassen. Nach 12 h wurde mit einer Kapillare Sekret gesammelt. Das Sekret wurde in 20  $\mu\text{l}$  EtOAc aufgenommen, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (5 min, 13200 rpm) und mit GC-EIMS vermessen.

Säule:	Alltech EC-5, 15 m, ID: 0.25 mm, Film: 0.25 $\mu\text{m}$
Trägergas:	Helium (3 ml/min)
Split:	ohne

Heizrate [ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Haltezeit [min]
0	45	2
10	280	5

## 5.10 Aktivitätstests mit Rohsekret

### 5.10.1 Lokalisierung des Aminosäureabbaus

*In vivo:* Die ersten zwei Drüsenreservoirs von 10 Larven wurden entleert durch Absammeln des Sekrets. Nachdem die Larven durch Reizung mit einer Federstahlpinzette wiederum zum Ausstülpen ihrer Reservoirs bewegt wurden, wurde je 1 Tropfen einer 100 mM Lösung von L-Isoleucin- [ $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$ ] (Isotec, Inc.) plus 1  $\mu\text{l}$  Heptanol in 0.9%-iger NaCl-Lösung auf ein zuvor entleertes Drüsenreservoir gegeben. Durch Beenden der Reizung saugten die Larven den Tropfen in die Reservoirs zurück. Die Larven wurden 3 h fressen gelassen. Anschließend wurde das Sekret der ersten zwei Drüsenpaare gesammelt, in 20  $\mu\text{l}$  Aceton gelöst und mit GC-

C-IRMS auf die Bildung von gelabeltem Heptyl-2-methylbutyrat untersucht.

*In vitro:* Ob der Aminosäureabbau im Drüsenreservoir stattfindet, wurde getestet, indem die Bildung von gelabeltem Heptyl-2-methylbutyrat im Sekret nach Zugabe von L-Isoleucin-[ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ ] (Isotec, Inc.) und Heptanol in gepuffertem Wehrsekret verfolgt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 10  $\mu\text{l}$  50 mM BIS-TRIS pH 7, 0.5  $\mu\text{l}$  Wehrsekret, 0.5  $\mu\text{l}$  Heptanol, 1  $\mu\text{l}$  einer 100 mM Lösung von L-Isoleucin-[ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ ] in 0.9%-iger NaCl-Lösung. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 28 °C inkubiert und dann mit 40  $\mu\text{l}$  EtOAc extrahiert. Die Proben wurden mit GC-C-IRMS analysiert.

### 5.10.2 1-Acylglucosen

Assays zur Substrat-Identifikation der larvalen Acyltransferasen wurden durchgeführt, indem die Bildung der korrespondierenden Heptylester nach Reaktion von verschiedenen 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen oder -galactosen mit Heptanol in gepuffertem Wehrsekret verfolgt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 10  $\mu\text{l}$  50 mM BIS-TRIS pH 7, 0.5  $\mu\text{l}$  Wehrsekret, 0.5  $\mu\text{l}$  Heptanol and 5  $\mu\text{l}$  40 mM 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucose oder 1-*O*- $\beta$ -D-acylgalactose in Wasser. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 28 °C inkubiert und dann mit 40  $\mu\text{l}$  EtOAc extrahiert. Die Proben wurden mit 10  $\mu\text{l}$  MSTFA bei 50 °C für 1 h derivatisiert, bevor sie der GC-EIMS-Analyse zugeführt wurden.

Säule: Alltech EC-5, 15 m, ID: 0.25 mm, Film: 0.25  $\mu\text{m}$   
 Trägergas: Helium (3 ml/min)  
 Split: 1/7

Heizrata [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	50	2
10	280	5

### 5.10.3 UDP-Glucose

Assays zur Identifikation des Biosyntheseweges der 1-*O*- $\beta$ -D-acylglucosen und -galactosen wurden durchgeführt, indem die Bildung der korrespondierenden Heptylester nach Reaktion von UDP-Glucose mit verschiedenen Carbonsäuren in gepuffertem Wehrsekret verfolgt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 10  $\mu$ l 50 mM BIS-TRIS pH 7, 0.5  $\mu$ l Wehrsekret, 0.5 mg UDP-Glucose, 0.5  $\mu$ l/0.5 mg Carbonsäure und 0.5  $\mu$ l Heptanol. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 28 °C inkubiert und dann mit 40  $\mu$ l EtOAc extrahiert. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l MSTFA bei 50°C für 1 h derivatisiert, bevor sie der GC-EIMS-Analyse zugeführt wurden. Zur Messung wurden die gleichen Geräteparameter gewählt wie in Kapitel 5.10.2.

## 5.11 Agardiffusionstest

### Bakterien:

Für alle Agardiffusionstests wurde 5b-Festmedium<sup>[51]</sup> verwendet, in welches verschiedene bakterielle Indikatorstämme eingepflegt wurden. Mit diesem Test wurde die Wirksamkeit der Substanzen bestimmt. Die Substanz diffundiert in den Agar und die Testorganismen werden somit während des Wachstums einem Konzentrationsgradienten ausgesetzt. Die Empfindlichkeit eines Indikatorstammes und die Konzentration der Testsubstanz bestimmen die Größe des Hemmhofes.

Alle bakteriellen Indikatorstämme wurden über Nacht bei 28 °C in St1-Flüssigmedium (Standard 1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe. Zubereitung: 25 g auf 1 l destilliertes H<sub>2</sub>O. Autoklavieren 20 min bei 121 °C) kultiviert. Die Inokulums-Suspensionen wurden auf eine OD<sub>578 nm</sub> = 1 mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> eingestellt. Zu 2 ml dieser Suspension wurden 48 ml flüssiges, auf 48 °C temperiertes, 5b-Agarmedium gegeben und in Petrischalen (Ø 145 mm) gegossen. Anschließend wurden bis zu 12 Stanzlöcher (Ø 9 mm) pro Platte mit 50  $\mu$ l Testlösung befüllt. Nach einer 24-stündigen Kultivierung der Platten bei 28 °C erfolgte die Auswertung. Zwischen der Größe des Hemmhofes und dem Logarithmus der Wirkstoffkonzentration besteht eine lineare Beziehung.

5b-Festmedium (1 Liter): 8.6g Glycerol, 2.6g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.1g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.01g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 15.0g Bacto-Agar

### Pilze:

Für diesen qualitativen Agardiffusionstest wurde Kartoffel-Glucose-Medium (PDA, potato dextrose agar, Difco) verwendet, in das verschiedene Pilzstämme eingimpft wurden. Die Stämme wurden auf PDA-Medium angezogen. Mit einem Stanzer (9 mm) wurden vier Stücke aus dem Myzel ausgestochen und in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 1, 2 bzw. 3 ml zu 49, 48 bzw. 47 ml flüssigem, zu auf 50 °C temperierten Kartoffel-Glucose-Agar gegeben und in Petrischalen (Ø 145 mm) gegossen. Nach dem Erstarren wurden in jede Platte bis zu elf Löcher (Ø 9 mm) gestantzt, in die 50 µl Testlösung gegeben wurden. Es folgte eine Inkubation bei 28 °C für 24 bis 72 h. Durch die unterschiedlichen Volumina der eingepfhten Testorganismen wurde die Sensitivität des Bioassays variiert. Die qualitative Auswertung des Tests erfolgte durch regelmäßige Beobachtung des Wachstums der Pilze über eine Dauer von 72 h.

## 5.12 Derivatisierungsmethoden

### ▪ Derivatisierung mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA)

Zucker: 1 µmol Zucker wurde in 100 µl Pyridin gelöst und 20 µl MSTFA zugegeben. Die Probe wird 1 h bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Dichlormethan auf 1 ml aufgefüllt.

Wehrsekret: 0.5 µl Wehrsekret wurde in 10 µl Pyridin aufgenommen und mit 20 µl MSTFA 1 h bei 70 °C inkubiert. Die Probe wurde unverdünnt zur GC-MS-Analyse gegeben.



#### ▪ Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid (PFBB)

0.5 µl Sekret wurde mit 5 µl Pentafluorbenzylbromid und 10 µl Triethylamin versetzt und bei 25 °C 3 h inkubiert. Anschließend wurden 30 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und mit 20 µl *n*-Hexan extrahiert. Die *n*-Hexanphase wurde mit GC-EIMS analysiert<sup>[4]</sup>. Zur Messung wurden die gleichen Geräteparameter gewählt wie in Kapitel 5.7.3.

### 5.13 Deglycosylierung von glycosidisch gebundenen Blattalkoholen aus den Wirtspflanzen

Die Extraktion und Deglycosylierung von glycosidisch gebundenen Blattalkoholen aus Pflanzen erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Schulz<sup>[121]</sup>.

2.5 g getrocknetes Blattmaterial wurde mit Flüssigstickstoff gemörsert und 25 ml Wasser zugegeben. Das zermörserte Blattmaterial wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. 10 mg β-Glucosidase (5.2 U/mg), 1 mg α-Glucosidase (5.8 U/mg), 1 mg β-Galactosidase (11.2 U/mg) wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gevortext. Die Suspension wurde 10 min bei 10000 rpm und 20 °C zentrifugiert. 5 ml des Überstandes wurden abgenommen und auf Extrelut-Kartuschen gegeben. Die Kartusche wurde nach 10 min Equilibrierungszeit mit 9 ml Dichlormethan gespült. Die Probe wurde unter einem leichten Stickstoffstrom auf 50 µl eingengt und der GC-EIMS-Analyse und GC-C-IRMS-Analyse zugeführt. Zur Messung der GC-EIMS wurden die gleichen Geräteparameter gewählt wie in Kapitel 5.7.3.

### 5.14 Hydrolyse der Wehrsekrete

Zur Untersuchung des Ausmaßes von *de novo* Synthese und Sequestrierung wurde ein künstlicher Wirtspflanzenwechsel von *Betula nana* auf eine nicht als Wirtspflanze genutzte *Salix* ssp. herbeigeführt. Während der fünf Tage Fraß an *Salix* ssp. wurden täglich die Sekrete auf die Änderung der Isotopensignaturen ausgewählter

Sekretinhaltsstoffe mit GC-C-IRMS untersucht. Zudem wurden die Isotopensignaturen der Wirtspflanzen-Alkohole mit GC-C-IRMS analysiert.

In einem GC-Vial mit Mikroinsert wurden 20 µl gesättigte K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in Methanol vorgelegt. 0.5 µl Sekret wurden zugegeben und gevortext. Die Reaktionsmischung wurde anschließend bei 40 °C 2 h inkubiert. Dann wurden 50 µl Et<sub>2</sub>O und 50 µl H<sub>2</sub>O (zur Phasentrennung) zugegeben und 10 s gevortext. Die Et<sub>2</sub>O-Phase wurde abgenommen und der GC-EIMS sowie GC-C-IRMS-Analytik zugeführt. Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung einer Suspension K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH anstelle von gesättigter K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH vorteilhaft für die Vollständigkeit der Hydrolyse ist. Vermutlich wird so sichergestellt, dass genug Base vorhanden ist, wenn ein Überschuss an zu hydrolysierendem Ester vorliegt.

## 5.15 Aminosäureanalytik in Pflanzen

### 5.15.1 Freie Aminosäuren

10 mg trockenes Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in ein Eppi überführt. Die Extraktion erfolgte mit 1 ml 0.1 M HCl durch einminütiges mechanisches Durchmischen. Danach wurde 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Ein 100 µl-Aliquot wurde in ein Eppi überführt und 400 µl 0.5 M Kaliumborat-Puffer, pH 11, zugegeben. Die Lösungen wurden durchgemischt und 15 min bei RT inkubiert. Es wurde erneut 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein GC-Vial mit Mikroinsert überführt. Die Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) wurde im Autosampler durchgeführt: Dazu wurden 30 µl des Derivatisierungsreagenzes (85 mM OPA, 1.4 mM 2-Mercaptoethanol in Kaliumboratpuffer, pH 11) zugegeben und für 2 min durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Autosamplerspritze durchgemischt. 30 µl wurden anschließend der HPLC-FLD-Analyse zugeführt.

Chromatographische Bedingungen:

Säule: Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm

Temperatur: 33 °C

Detektor: Fluoreszenzdetektor - Ex.: 340 nm, Em.: 445 nm  
 Laufmittel: 0.02M Citratpuffer, pH 5.5 (A)  
 Methanol:Acetonitril=65:35 (B)

Zeit [min]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	15	1.5
28	43	1.5
28.1	100	2.5
30	100	2.5
30.1	15	2.5
31.5	15	2.5

### 5.15.2 Gebundene Aminosäuren

10 mg trockenes Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in ein Eppi überführt. Die Proteinhydrolyse erfolgte durch 24-stündiges Erhitzen in 6 M HCl bei 100 °C.

Danach wurde 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1/60 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Ein 100 µl-Aliquot wurde in ein Eppi überführt und 400 µl 0.5 M Kaliumborat-Puffer, pH 11, zugegeben. Die Lösungen wurden durchmischt und 15min bei RT inkubiert. Es wurde erneut 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein GC-Vial mit Mikroinsert überführt. Die Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) wurde im Autosampler durchgeführt: Dazu wurden 30µl des Derivatisierungsreagenzes (85 mM OPA, 1.4 mM 2-Mercaptoethanol in Kaliumboratpuffer, pH 11) zugegeben und für 2 min durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Autosamplerspritze durchmischt. 30 µl wurden anschließend mittels HPLC-FLD analysiert.

## 5.16 Synthesen

### 5.16.1 Thioglucoside und acylierte Thioglucoside

Thioglucoside wurden analog zu Kuhn<sup>[73, 75]</sup> durch modifizierte Koenigs-Knorr-Kopplung oder Mitsunobu-Kopplung mit anschließender Entschützung mit Natriummethanolat bzw. Entschützung und Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid hergestellt. Die Wahl des Reaktionsweges wurde durch die kommerzielle Verfügbarkeit der Ausgangsstoffe bzw. ökonomische Faktoren beeinflusst.

#### Kopplung nach Koenigs-Knorr

2 mmol 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid (Acetobrom- $\alpha$ -D-glucose) oder 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (Acetobrom- $\alpha$ -D-galactose) und 4 mmol Triethylamin wurden in 4 ml Acetonitril gelöst. Bei Zugabe von 2 mmol phenolischen schwefelsubstituierten Aglycons färbte sich das Reaktionsgemisch gelb. Nach 2 h Rühren bei RT wurden 50 ml Chloroform zugegeben und dreimal mit Wasser gewaschen. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus EtOH. Das Produkt fiel in Form weißer Nadeln aus. Bei nichtkristallisierten Substanzen erfolgte die Reinigung durch MPLC (RP-18 Lichroprep, MeOH/H<sub>2</sub>O=1/1) bzw. High-Speed-Counter-Current-Chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH/CHCl<sub>3</sub>=7/13/8).

#### Mitsunobu-Kopplung

7.4 mmol im Ölpumpenvakuum getrocknetes ADDP wurden in 40 mmol absolutem THF gelöst und unter Eiskühlung wurden 7.4 mmol Trimethylphosphan in THF gegeben. Die orangefarbene Lösung wurde eine halbe Stunde bis zur Entfärbung zu einem schwachen Gelb gerührt. 5 mmol 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-thio- $\alpha$ -D-glucopyranose wurden nach Trocknung im Ölpumpenvakuum zusammen mit 3.7 mmol Aglucon in 20 ml THF gelöst und bei RT zu der Reaktionsmischung gegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei RT gerührt, dann der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Petrolether das entstandene Hydrazid ausgefällt. Nach erneutem Abfiltrieren wurde das Lösungsmittel wieder im

Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE=1/2).

Zur Entschützung wurden die acetylierten Verbindungen alkalisch mit Natriummethanolat verseift.

#### Entschützung mit Natriummethanolat

0.73 mmol des geschützten Glycosids wurden in 10 ml Methanol gelöst, 3 mmol Natriummethanolat hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 12 h bei RT gerührt. Danach wurde mit einem Ionenaustauscher (Amberlite IRC 50) neutralisiert und abfiltriert. Die Reinigung erfolgte über MPLC (RP-18 Lichroprep, MeOH/H<sub>2</sub>O=3/2) bzw. High-Speed-Counter-Current-Chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH/CHCl<sub>3</sub>=7/13/8).

Die Herstellung der acylierten Thioglucoside erfolgte nach einer modifizierten Methode von Woudenberg van Oosterom<sup>[146]</sup>.

#### Synthese von acylierten Thioglucosiden

Die Reaktion wurde unter Inertgas-Athmosphäre durchgeführt. 100 mg Thioglucosid wurde in 10 ml tert. Butanol gelöst. Danach wurden 1 g Molsieb 4 Å zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml einer 12.5%-igen Lösung von Ethylisobutyrat bzw. Ethyl-2-methylbutyrat in tert. Butanol. Nach der Zugabe von 100 mg *Candida antarctica* Lipase B wurde die Reaktionsmischung 24 h bei 40 °C gerührt. Molsieb und das immobilisierte Enzym wurden abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt.

Die CALB gehört zur Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen und hat wie alle Serinproteasen ein aktives Zentrum aus Serin, Histidin und Aspartat. Der Mechanismus folgt einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus, wobei zuerst Serin<sub>105</sub> einen nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff des Acyldonors (Carbonsäureethylester) ausübt und einen

tetraedralen Komplex formt. Im zweiten Schritt verlässt Ethanol als erstes Produkt das aktive Zentrum und ein Acyl-Enzymkomplex wird gebildet. Das zweite Substrat (Alkohol: Thioglucosid) gelangt dann in das aktive Zentrum und bildet durch nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom einen weiteren Komplex mit tetraedraler Geometrie. Das zweite Produkt (Thioglucosidester, Blattalkoholester) verlässt abschließend das aktive Zentrum und das Enzym ist bereit für einen weiteren Reaktionszyklus (Abb.: 5-1).

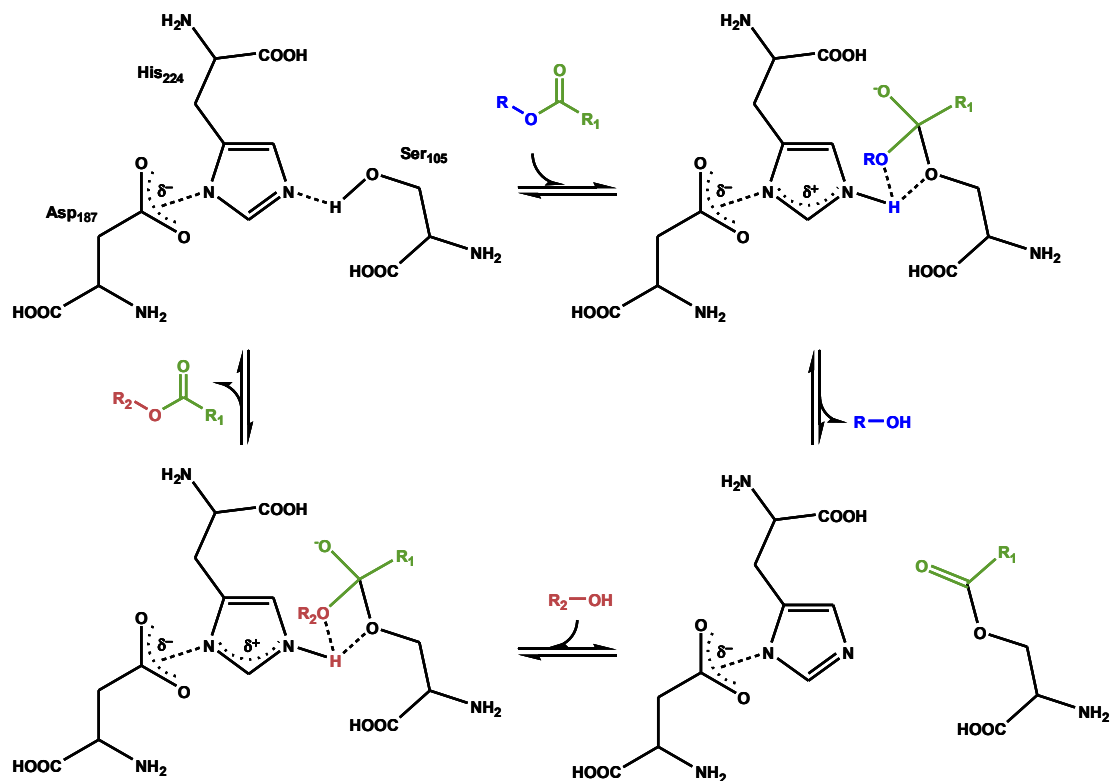
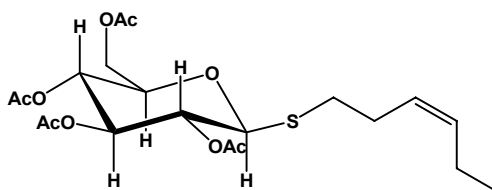


Abbildung 5-1: Reaktionsmechanismus der *Candida antarctica* Lipase B, modifiziert nach Anderson *et al.*<sup>[2]</sup>

Neben der soeben beschriebenen Transesterifizierung katalysiert die CALB auch die Esterhydrolyse und Esterifizierung, sowie die Aminolyse.

Bei bereits charakterisierten Substanzen wurden die Spektren miteinander verglichen<sup>1</sup>. Es wurde darauf verzichtet, die spektralen Daten noch einmal im Detail zu beschreiben. Aus Vereinfachungsgründen werden die durchgeführten APT-NMR-Experimente als <sup>13</sup>C-NMR bezeichnet.

<sup>1</sup> Dissertation, Jürgen Kuhn, 2005

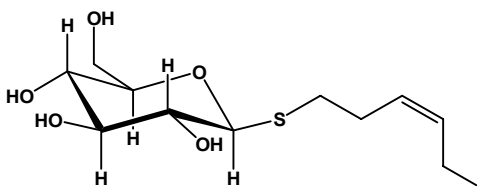
5.16.1.1 (3Z)-Hex-3-en-1-yl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Hergestellt über Mitsunobu-Reaktion aus (*Z*)-3-Hexenol.

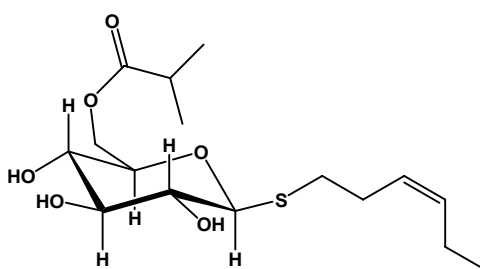
Ausbeute: 79%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

5.16.1.2 (3Z)-Hex-3-en-1-yl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Hergestellt über Entschützung mit Natriummethanolat aus (3Z)-Hex-3-en-1-yl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid.

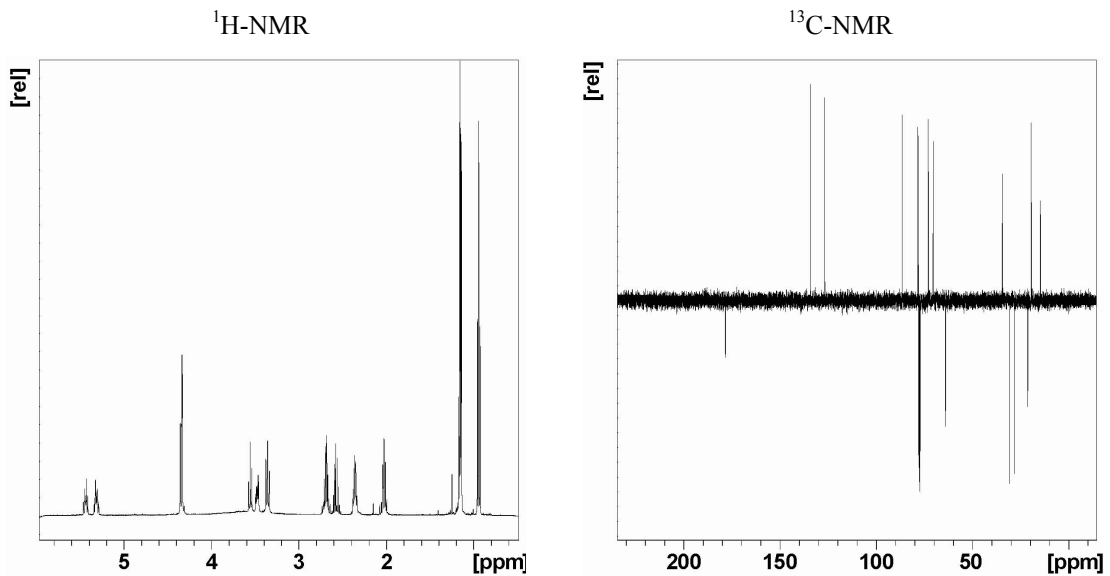


Ausbeute: 60%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

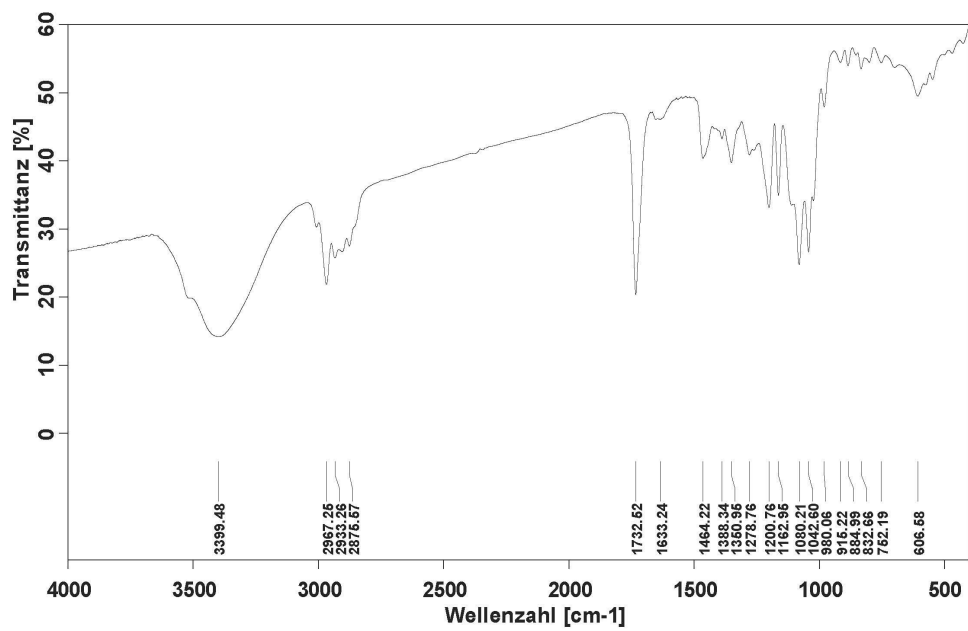
5.16.1.3 (3Z)-Hex-3-en-1-yl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Ausbeute: 66%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 5.46-5.41 (m, 1H), 5.34-5.29 (m, 1H), 4.50 (dd,  $J=12.2$ , 4.4, 1H), 4.35 (d,  $J=9.6$ , 1H), 4.29 (dd,  $J=12.4$ , 2.3, 1H), 3.56 (t,  $J=8.9$ , 1H), 3.48 (ddd,  $J=9.7$ , 4.5, 2.4, 1H), 3.36 (td,  $J=9.3$ , 2.01, 2H), 2.72 (q,  $J=7.9$ , 2H), 2.58 (quin,  $J=7.0$ , 1H), 2.36 (q,  $J=7.7$ , 2H), 2.03 (quin,  $J=7.5$ , 2H), 1.15 (dd,  $J=6.9$ , 2.2, 6H), 0.94 (t,  $J=7.5$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 178.3, 134.2, 126.7, 86.4, 78.4, 77.9, 72.8, 70.3, 63.8, 34.3, 30.7, 28.3, 21.1, 19.4, 19.3, 14.6. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3399, 2967,

2933, 2876, 1733, 1633, 1464, 1388, 1351, 1279, 1201, 1163, 1080, 1043. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 348(1), 233(47), 215(77), 203(20), 169(61), 145(35), 127(54), 115(62), 89(41), 71(100), 55(52). HR-MS  $m/z$  [ $M^+$ ]: berechnet für  $C_{16}H_{28}O_6S$ : 348.160661; gefunden: 348.163345.

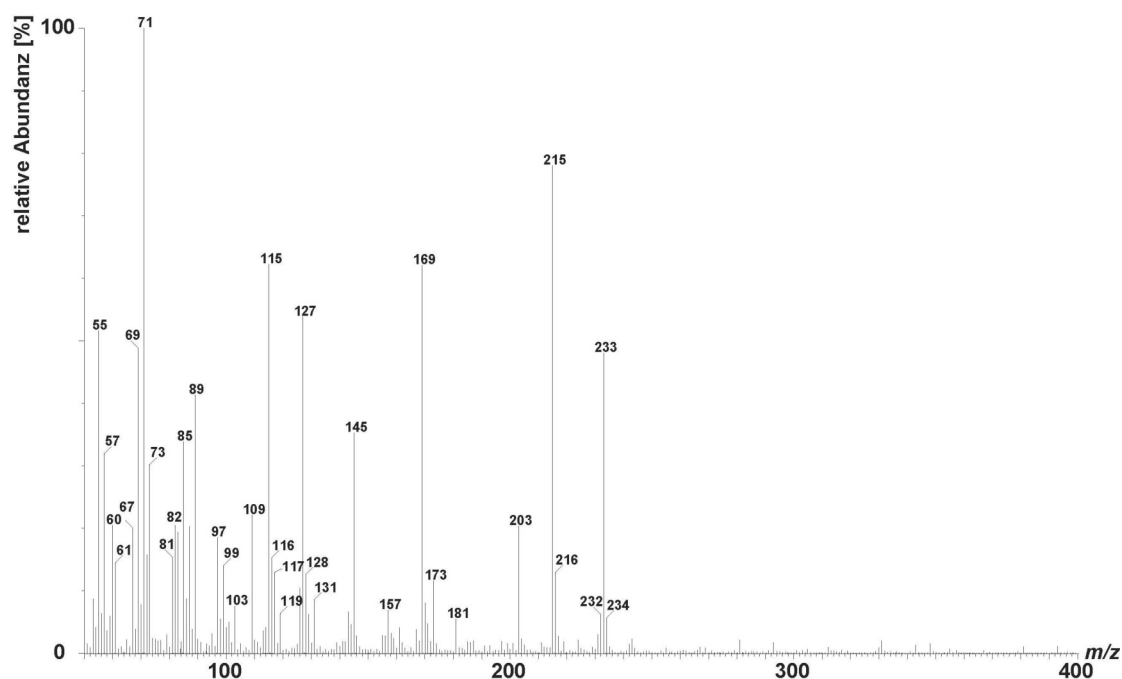
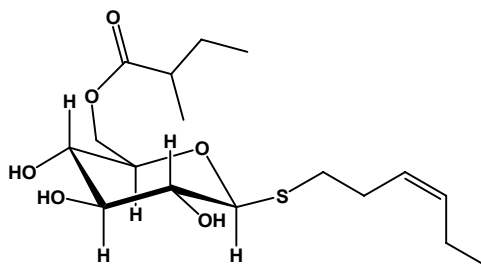


IR

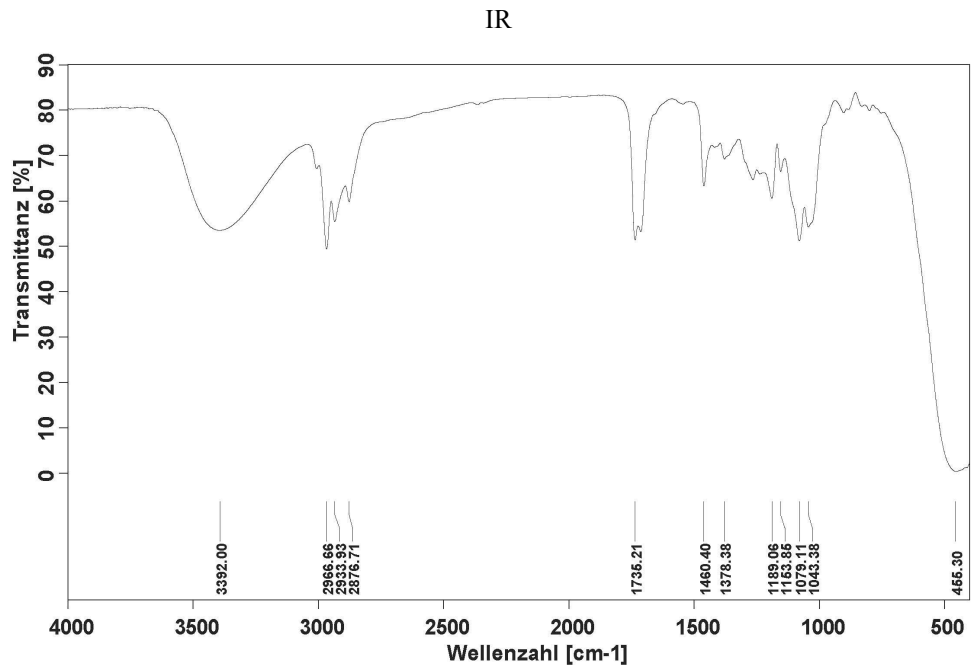
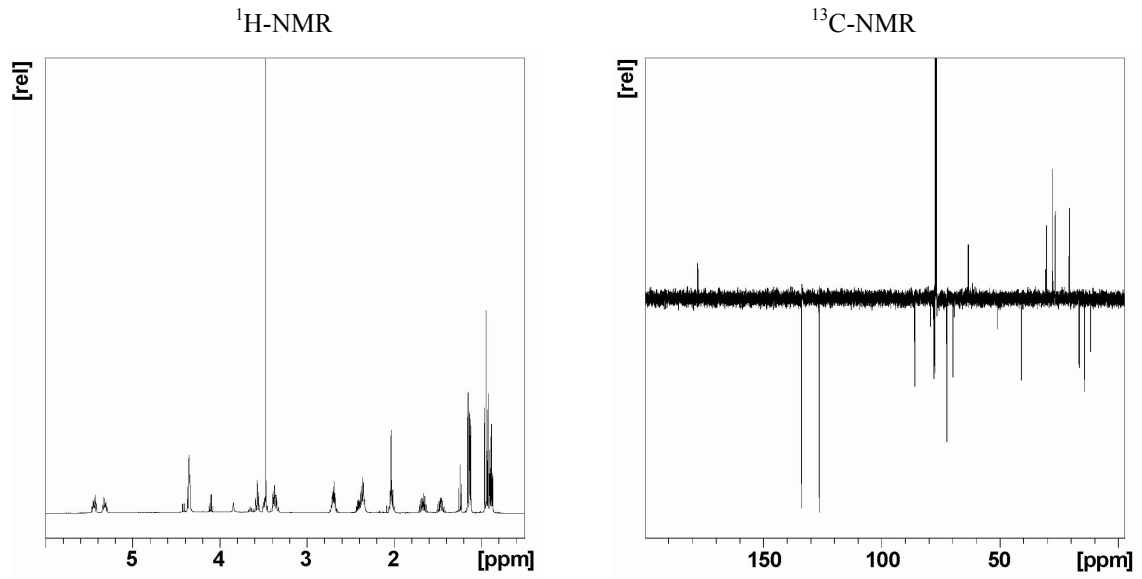




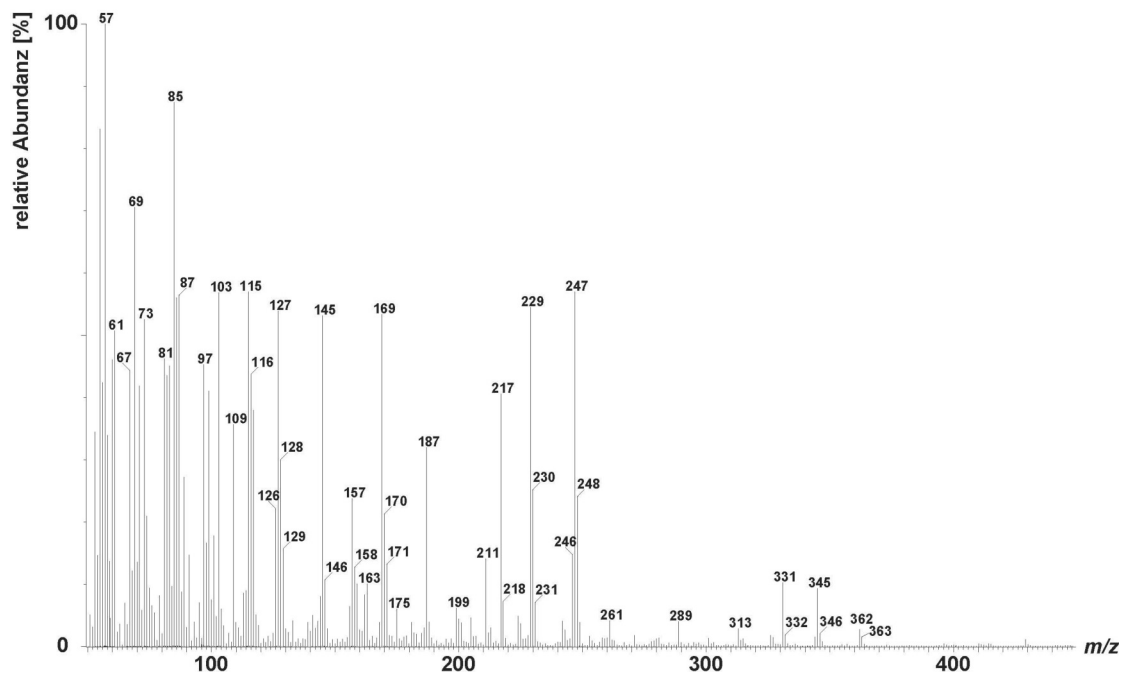
MS

5.16.1.4 (3Z)-Hex-3-en-1-yl-6'-O-(2-methylpropanyl)-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

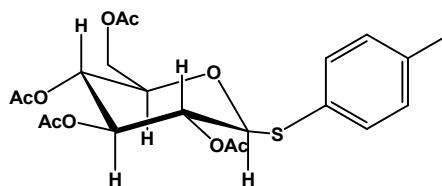
Ausbeute: 66%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 5.49-5.42 (m, 1H), 5.37-5.29 (m, 1H), 4.37 (d,  $J=12.1$ , 2H), 3.58 (t,  $J=9.0$ , 1H), 3.53-3.46 (m, 2H), 3.44-3.22 (m, 2H), 2.77-2.65 (m, 2H), 2.47-2.32 (m, 3H), 2.04 (dq,  $J=7.5$ ,  $J=1.6$ , 2H), 1.68 (dsept,  $J=7.8$ ,  $J=2.1$ , 1H), 1.47 (doct,  $J=7.2$ ,  $J=1.8$ , 1H), 1.14 (dd,  $J=7.2$ , 1.6, 3H), 0.98-0.87 (m, 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 177.7, 133.8, 126.3, 86.0, 79.4, 77.9, 72.4, 69.9, 63.4, 40.9, 30.4, 27.9, 26.6, 20.7, 16.5, 14.3, 11.7 IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3392, 2967, 2934, 2877, 1735, 1460, 1378, 1189, 1154, 1079, 1043. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 362(2), 345(9), 331(10), 247(56), 229(54), 217(40), 187(31), 169(52), 145(52), 127(53), 115(56), 103(56), 85(88), 69(71), 57(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{S}$ : 362.176311; gefunden: 362.175453.



MS



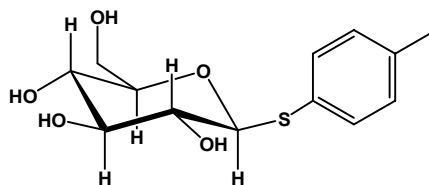
#### 5.16.1.5 4-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid



Hergestellt über Koenigs-Knorr-Kopplung aus *p*-Thiokresol.

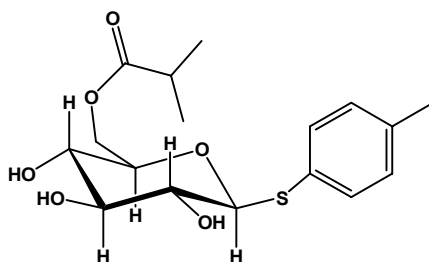
Ausbeute: 96%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

#### 5.16.1.6 4-Tolyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

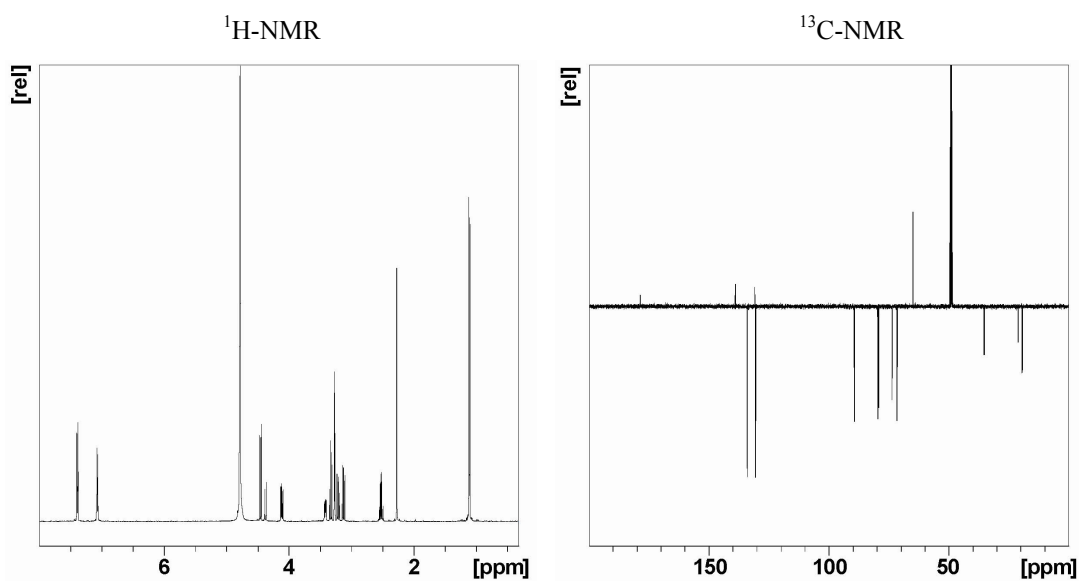


Hergestellt über Entschützung mit Natriummethanolat aus 4-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid.

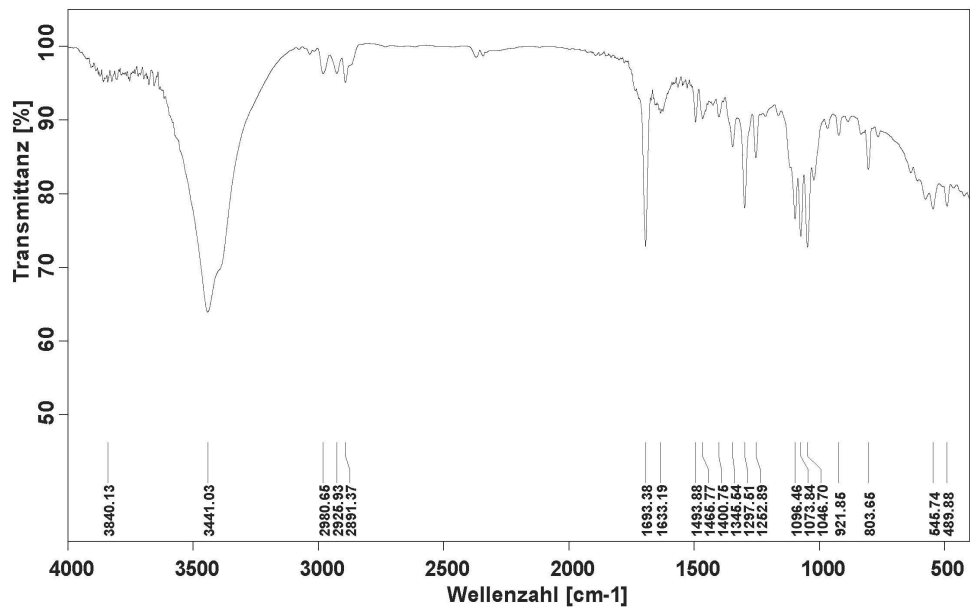
Ausbeute: 90%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

5.16.1.7 4-Tolyl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

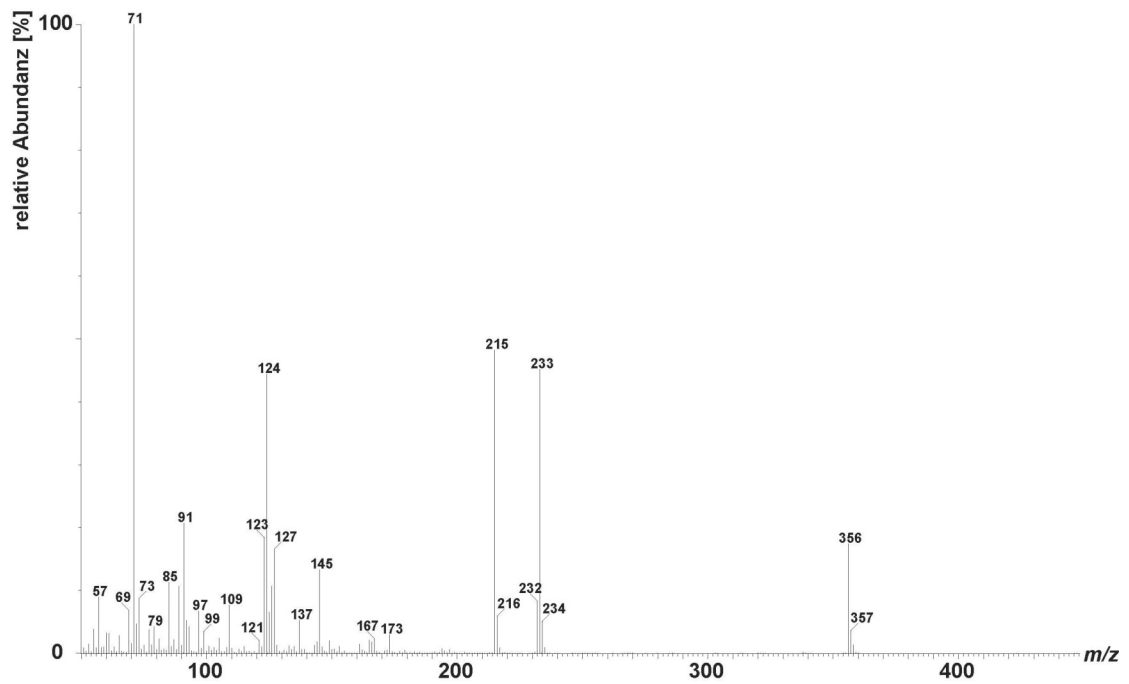
Ausbeute: 64%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.39 (d,  $J=8.0$ , 2H), 7.07 (d,  $J=7.8$ , 2H), 4.45 (d,  $J=9.6$ , 1H), 4.38 (dd,  $J=11.9$ ,  $J=2.1$ , 1H), 4.11 (dd,  $J=11.9$ ,  $J=6.4$ , 1H), 3.44-3.39 (m, 1H), 3.32 (t,  $J=8.9$ , 1H), 3.21 (dd,  $J=9.7$ ,  $J=8.9$ , 1H), 3.12 (dd,  $J=9.9$ ,  $J=8.7$ , 1H), 2.52 (quin,  $J=7.1$ , 1H), 2.27 (s, 3H), 1.11 (dd,  $J=7.0$ ,  $J=1.1$ , 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.6, 139.0, 134.0, 130.8, 130.5, 89.3, 79.5, 79.2, 73.7, 71.5, 64.9, 35.3, 21.1, 19.3. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3441, 2981, 2926, 2891, 1693, 1633, 1494, 1466, 1401, 1346, 1298, 1253, 1096, 1074, 1047, 804. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 356(18), 233(45), 215(48), 145(13), 137(5), 124(44), 109(7), 91(21), 71(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{S}$ : 356.129361; gefunden: 356.127945.

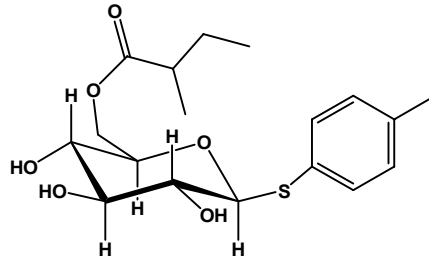


IR

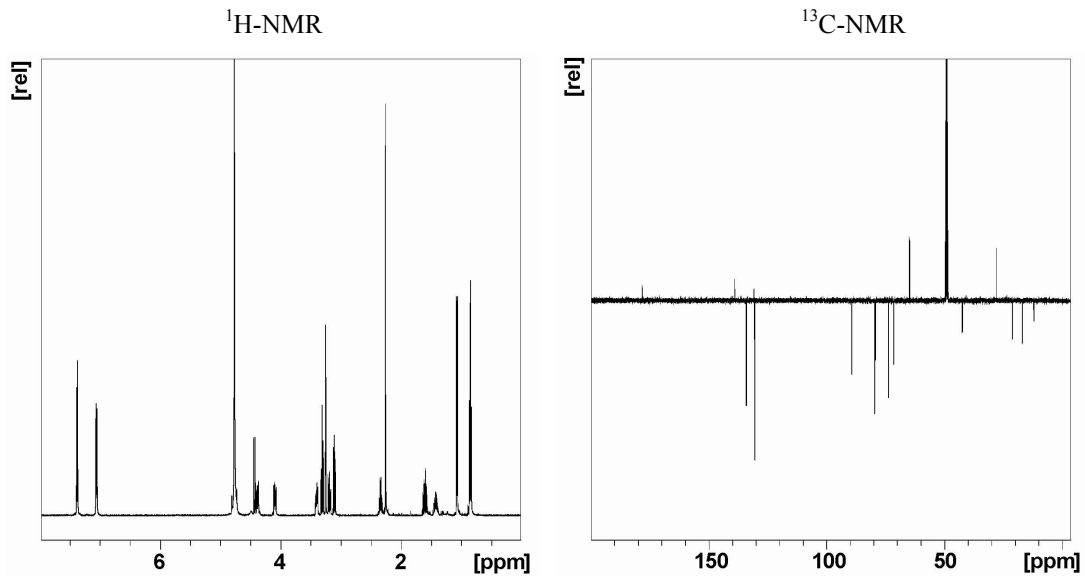


MS

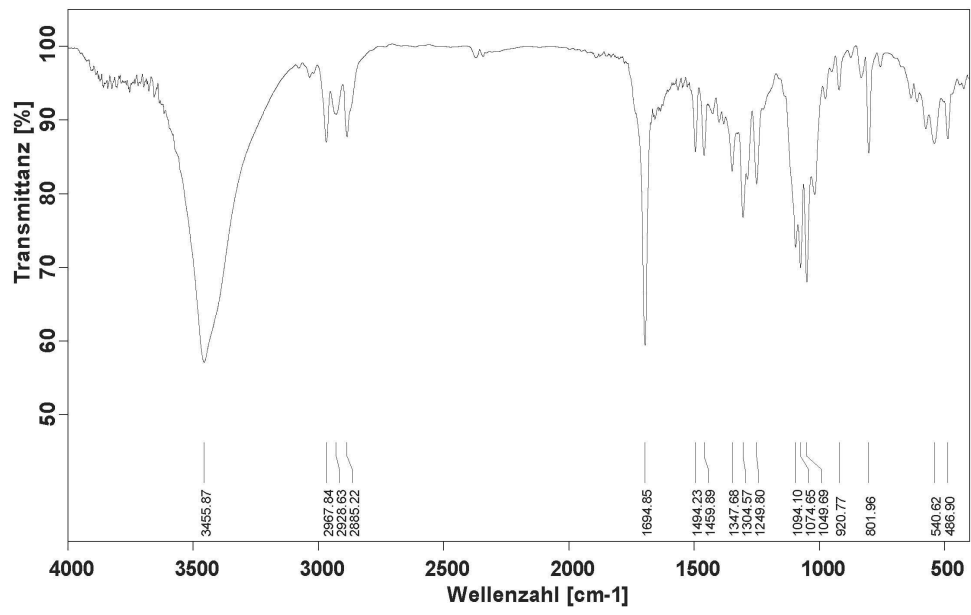


5.16.1.8 4-Tolyl-6'-O-(2-methylpropanyl)-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

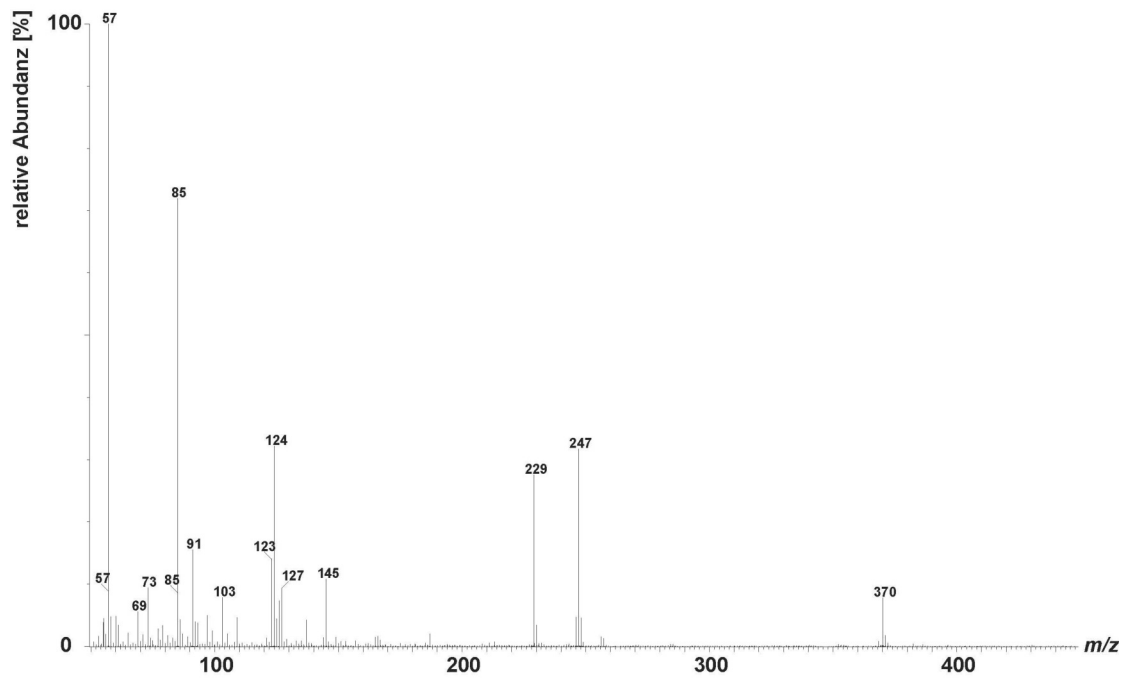
Ausbeute: 44%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.38 (d,  $J=8.0$ , 2H), 7.07 (d,  $J=7.8$ , 2H), 4.44 (d,  $J=9.9$ , 1H), 4.39 (ddd,  $J=11.7$ ,  $J=5.7$ ,  $J=2.1$ , 1H), 4.10 (ddd,  $J=11.7$ ,  $J=6.4$ ,  $J=1.8$ , 1H), 3.44-3.38 (m, 1H), 3.33 (t,  $J=8.9$ , 1H), 3.21 (dd,  $J=9.4$ ,  $J=2.8$ , 1H), 3.12 (dd,  $J=10.4$ ,  $J=8.5$ , 1H), 2.35 (sext,  $J=6.9$ , 1H), 2.27 (s, 3H), 1.61 (sext,  $J=7.1$ , 1H), 1.43 (m, 1H), 1.08 (dd,  $J=7.0$ ,  $J=1.7$ , 3H), 0.86 (t,  $J=7.6$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.2, 139.0, 134.0, 130.8, 130.5, 89.3, 79.6, 79.3, 73.7, 71.5, 64.8, 42.4, 27.8, 21.1, 16.9, 12.0. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3456, 2968, 2929, 2885, 1695, 1494, 1460, 1348, 1305, 1250, 1094, 1075, 1050, 802. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 370(7), 247(31), 229(27), 145(11), 124(32), 103(7), 91(15), 85(72), 57(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{S}$ : 370.145011; gefunden: 370.144441.

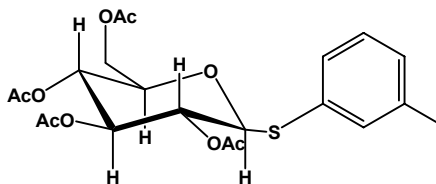


IR



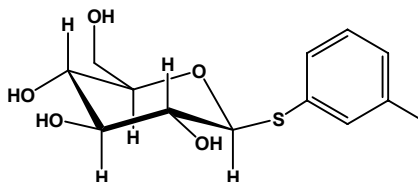
MS



5.16.1.9 3-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

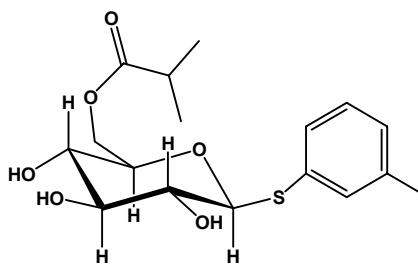
Hergestellt über Koenigs-Knorr-Kopplung aus *m*-Thiokresol.

Ausbeute: 100%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

5.16.1.10 3-Tolyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Hergestellt über Entschützung mit Natriummethanolat aus 3-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid.

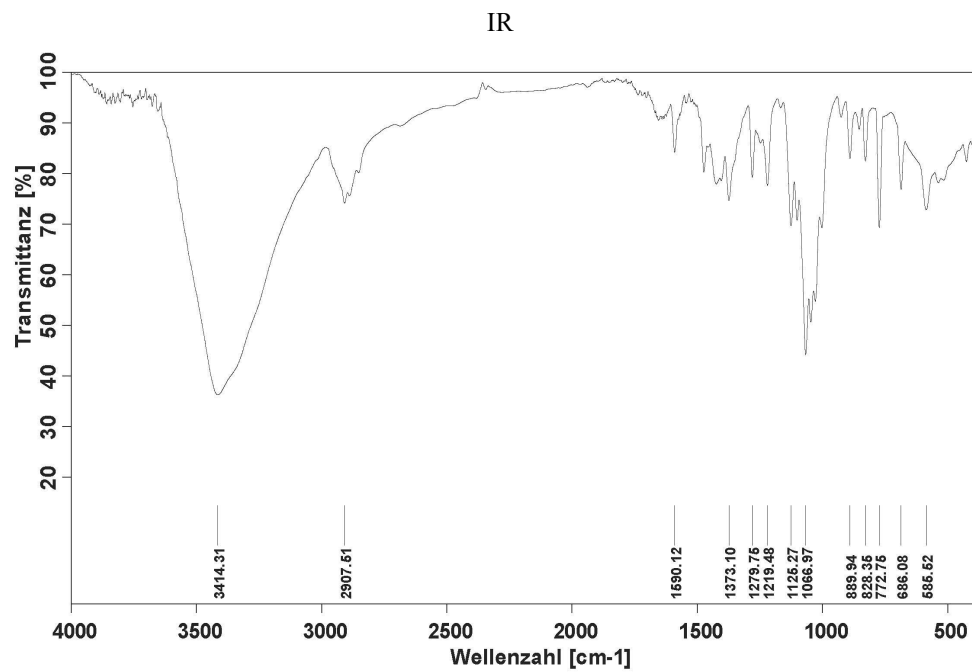
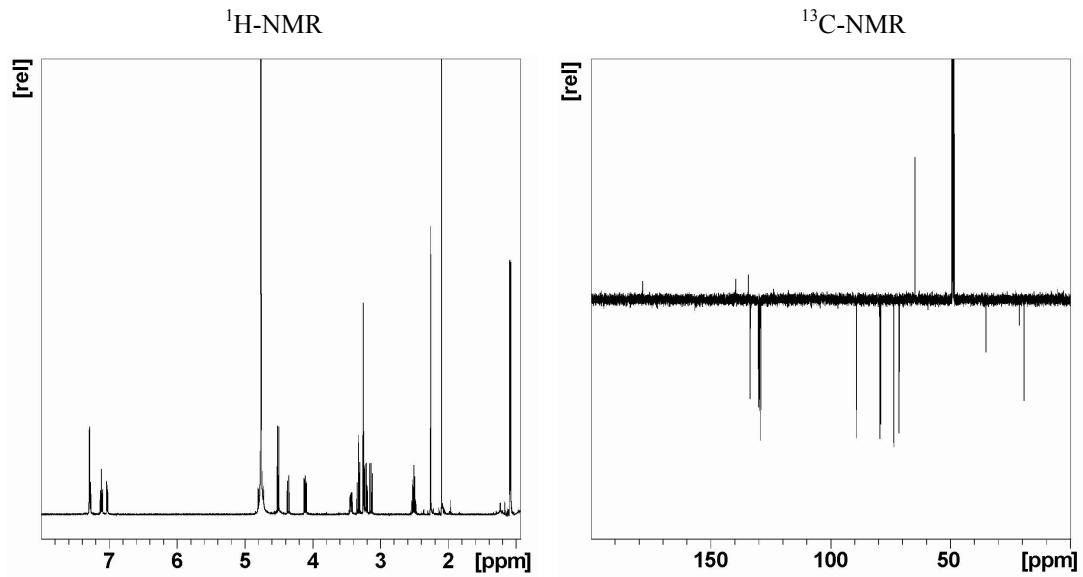
Ausbeute: 44%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

5.16.1.11 3-Tolyl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

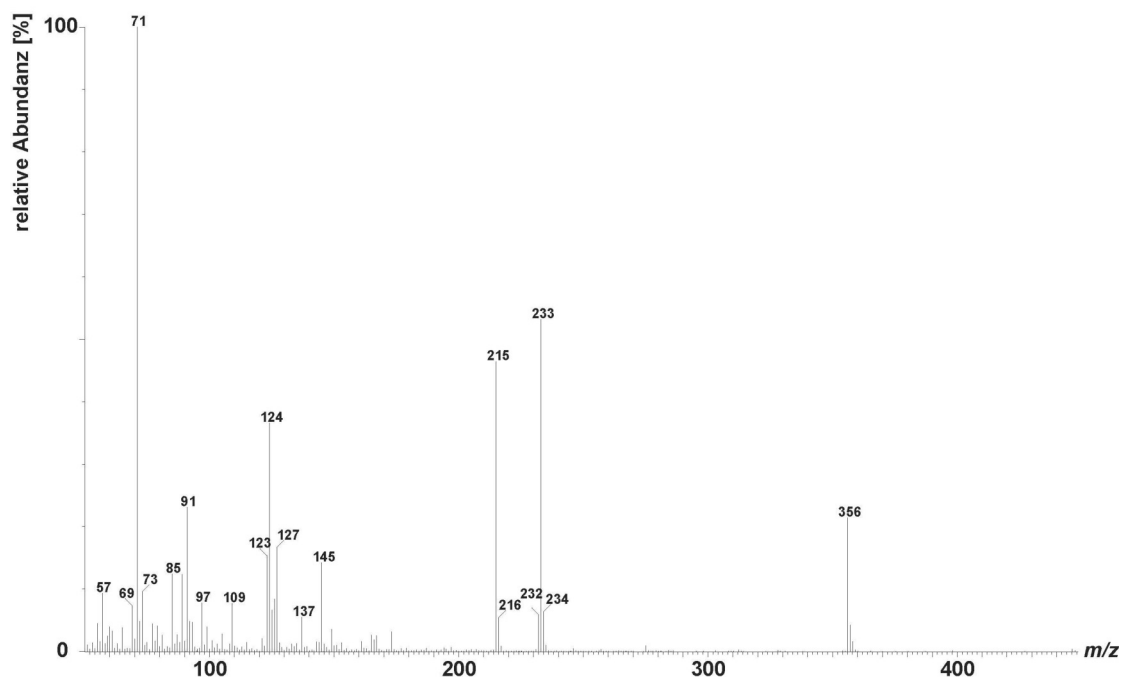
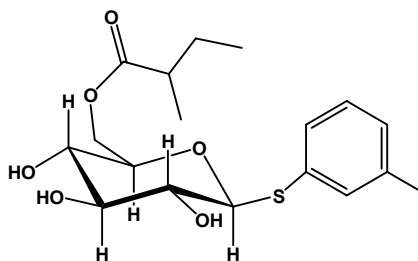
Ausbeute: 69%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.30 (d,  $J=7.8$ , 2H), 7.13 (t,  $J=7.8$ , 1H), 7.05 (d,  $J=7.3$ , 1H), 4.53 (d,  $J=9.8$ , 1H), 4.38 (dd,  $J=12.1$ ,  $J=1.6$ , 1H), 4.12 (dd,  $J=11.8$ ,  $J=6.3$ , 1H), 3.48-3.43 (m, 1H), 3.34 (t,  $J=8.6$ , 1H), 3.23 (dd,  $J=10.0$ ,  $J=9.0$ , 1H), 3.16 (dd,  $J=9.6$ ,  $J=8.8$ , 1H), 2.53 (quin,  $J=7.2$ , 1H), 2.28 (s, 3H), 2.12 (s, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.4, 139.6, 134.3, 133.6, 129.5, 129.2, 89.1, 79.4, 79.1, 73.6, 71.4, 64.8, 35.1, 21.2, 19.2. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3414, 2908, 1590, 1373, 1280, 1219, 1125,



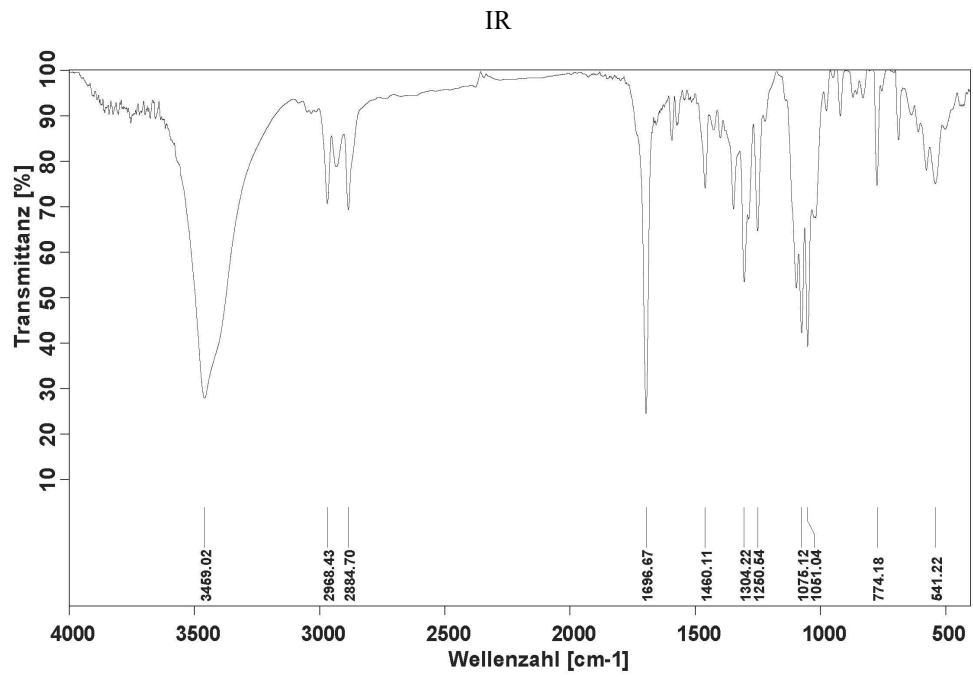
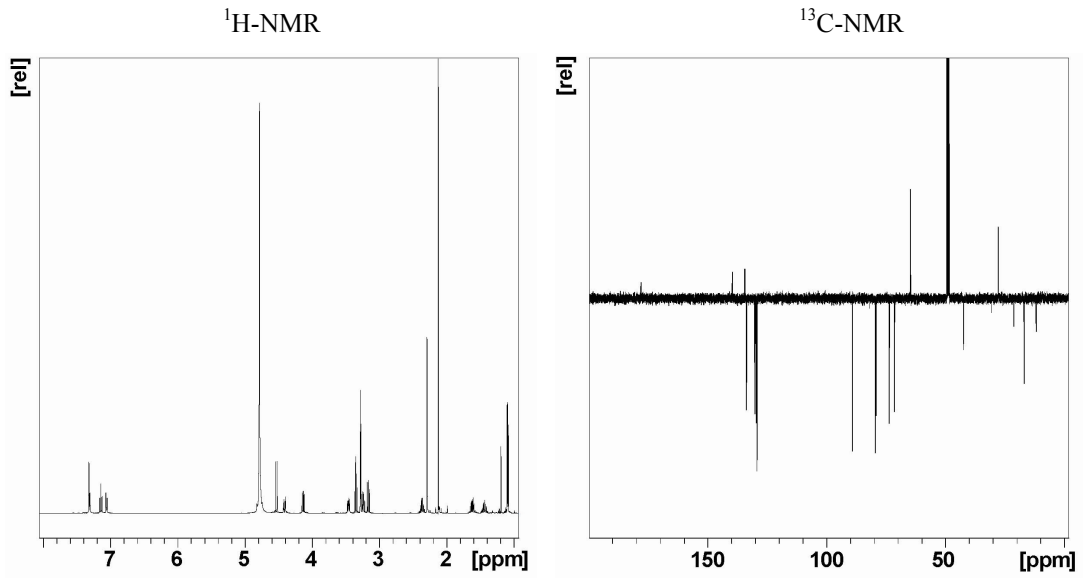
1067, 890, 828, 773. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 356(20), 233(52), 215(46), 145(14), 124(36), 91(22), 71(100). HR-MS  $m/z$  [ $M^+$ ]: berechnet für  $C_{17}H_{24}O_6S$ : 356.129361; gefunden 356.128136.



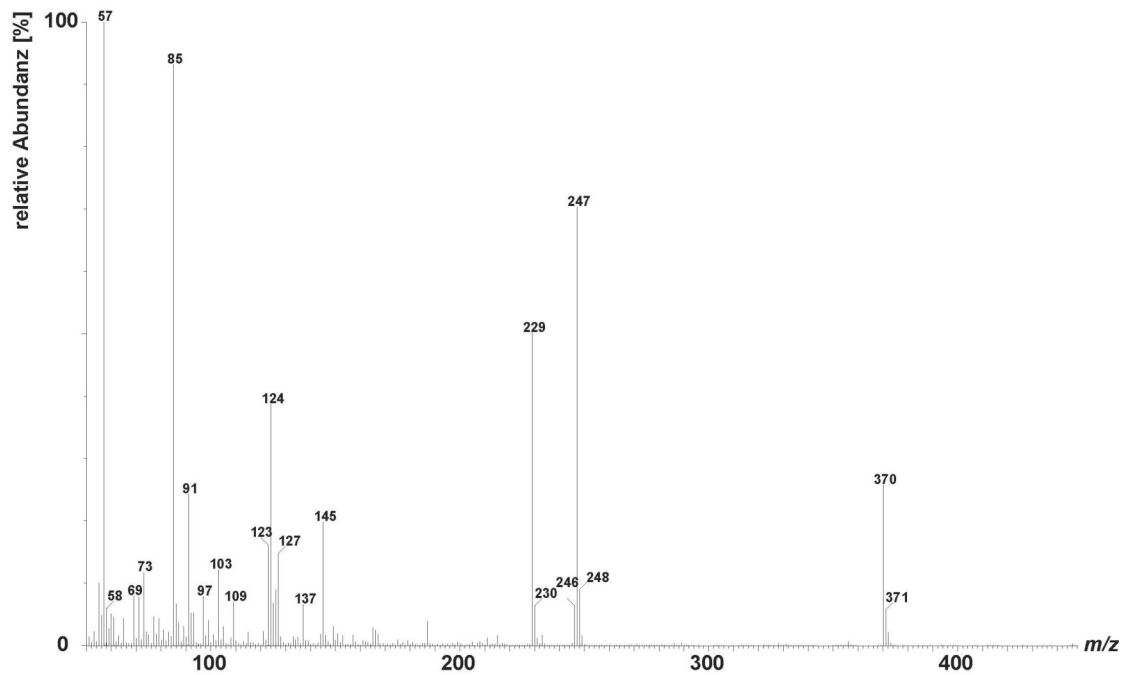
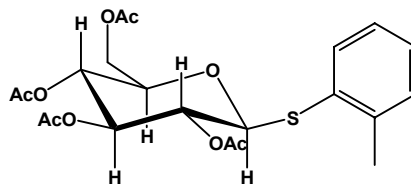
MS

5.16.1.12 3-Tolyl-6'-*O*-(2-methylpropanyl)-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Ausbeute: 30%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.30 (d,  $J=8.9$ , 2H), 7.13 (t,  $J=6.9$ , 1H), 7.05 (d,  $J=7.6$ , 1H), 4.52 (d,  $J=9.7$ , 1H), 4.40 (ddd,  $J=11.9$ ,  $J=4.3$ ,  $J=2.1$ , 1H), 4.12 (dd,  $J=11.9$ ,  $J=6.6$ , 1H), 3.48-3.43 (m, 1H), 3.35 (t,  $J=8.9$ , 1H), 3.24 (dd,  $J=9.0$ ,  $J=2.5$ , 1H), 3.16 (dd,  $J=10.0$ ,  $J=8.5$ , 1H), 2.53 (sext,  $J=7.0$ , 1H), 2.28 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.67-1.56 (m, 1H), 1.48-1.38 (m, 1H), 1.08 (dd,  $J=7.1$ ,  $J=4.1$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.2, 139.7, 134.4, 133.7, 130.3, 129.7, 129.3, 89.2, 79.5, 79.2, 73.7, 71.5, 64.8, 42.4, 27.8, 21.3, 17.0, 11.9. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3459, 2968, 2934, 2885, 1697, 1460, 1304, 1251, 1096, 1075, 1051, 774. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 370(24), 247(70), 229(50), 145(19), 124(39), 103(12), 91(24), 85(93), 57(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{S}$ : 370.145011; gefunden 370.146307.

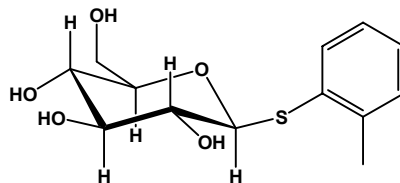


MS

5.16.1.13 2-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

Hergestellt über Koenigs-Knorr-Reaktion aus *o*-Thiokresol.

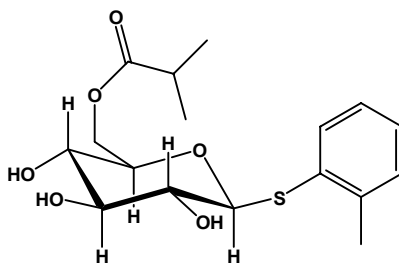
Ausbeute: 88%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

5.16.1.14 2-Tolyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

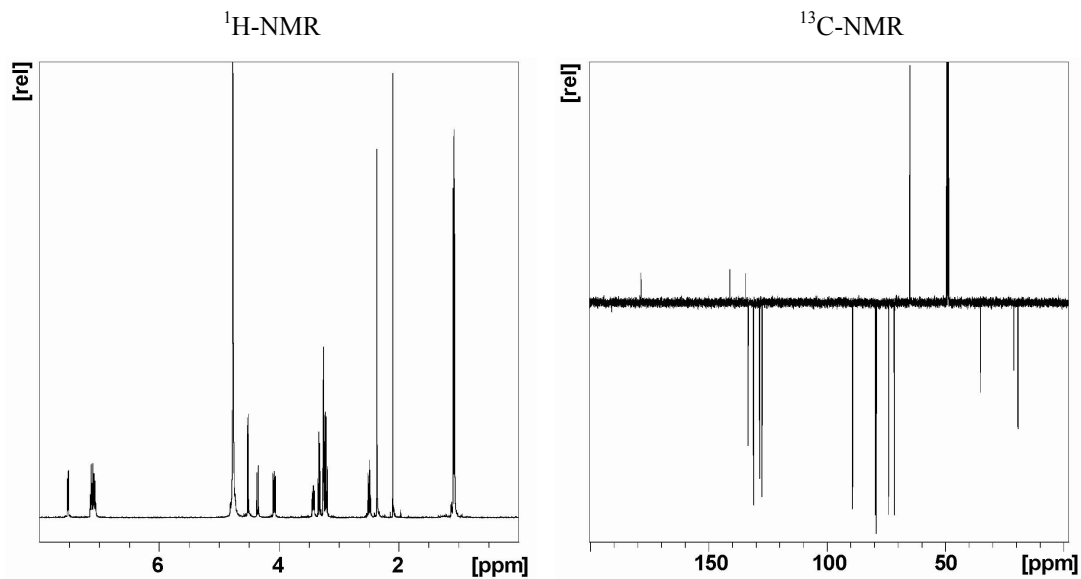
Hergestellt über Entschützung mit Natriummethanolat aus 2-Tolyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Ausbeute: 28%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

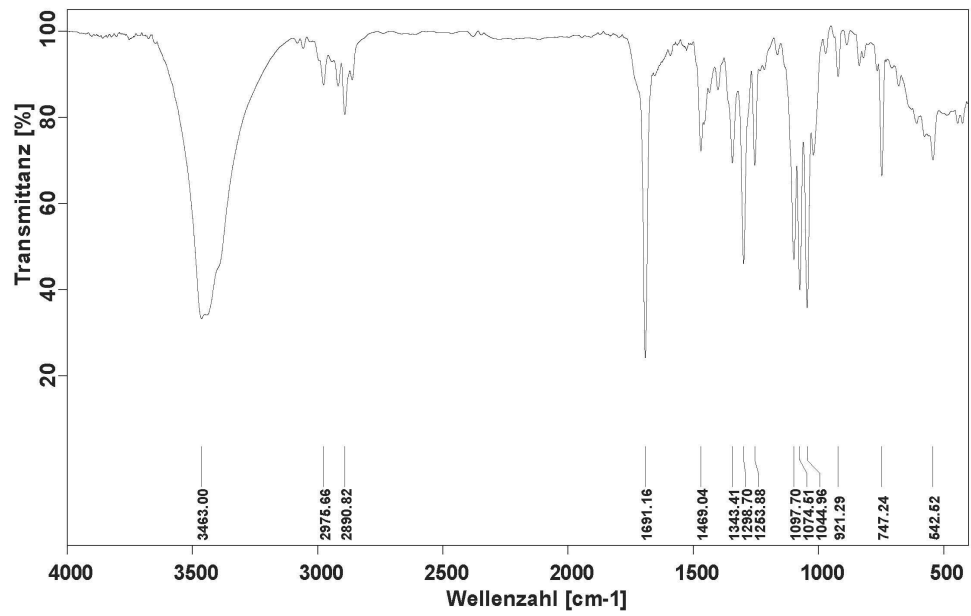
#### 5.16.1.15 2-Tolyl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid



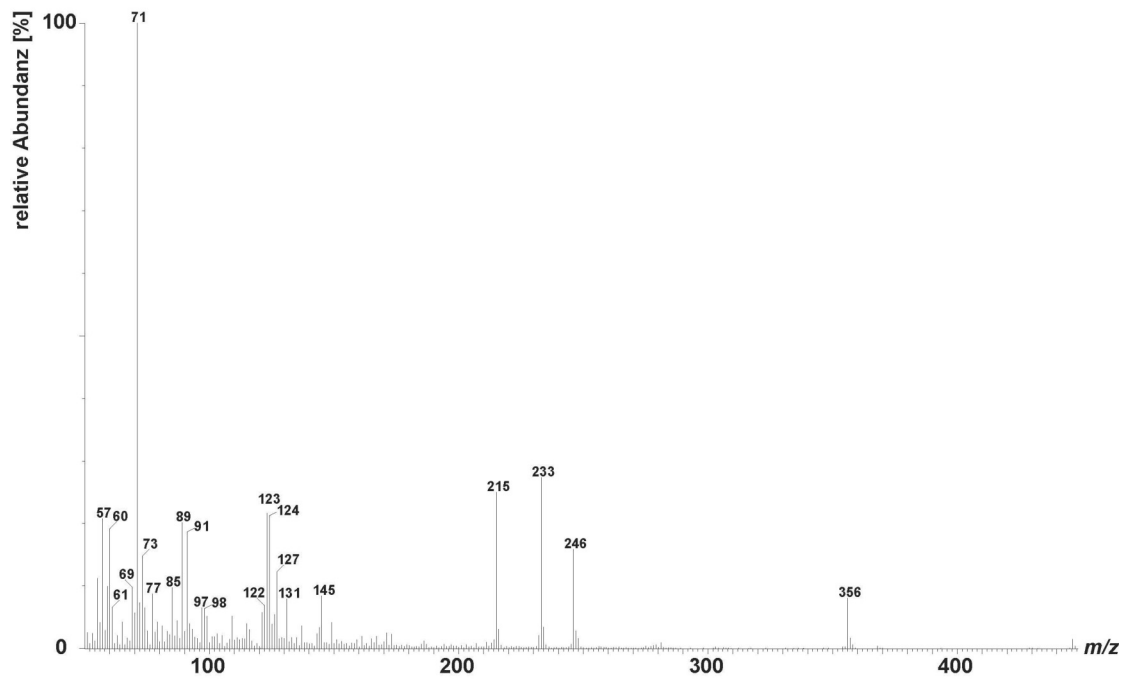
Ausbeute: 56%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.53 (dd,  $J=7.6$ ,  $J=1.6$ , 1H), 7.16-7.05 (m, 3H), 4.45 (d,  $J=9.6$ , 1H), 4.37 (dd,  $J=11.7$ ,  $J=2.1$ , 1H), 4.09 (dd,  $J=11.9$ ,  $J=6.7$ , 1H), 3.46-3.41 (m, 1H), 3.34 (t,  $J=8.8$ , 1H), 3.23 (q,  $J=8.7$ , 2H), 2.50 (quin,  $J=7.1$ , 1H), 2.38 (s, 3H), 2.11 (s, 1H), 1.09 (dd,  $J=7.0$ ,  $J=5.3$ , 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.5, 141.0, 134.3, 133.3, 131.1, 128.5, 127.4, 89.2, 79.6, 79.1, 74.0, 71.6, 65.0, 35.2, 21.1, 19.32, 19.30. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3463, 2976, 2891, 1691, 1469, 1343, 1299, 1254, 1098, 1075, 1045, 921, 747. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 356(8), 246(16), 233(27), 215(24), 145(8), 127(12), 124(21), 123(22), 91(19), 89(20), 71(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{S}$ : 356.129361; gefunden 356.127975.

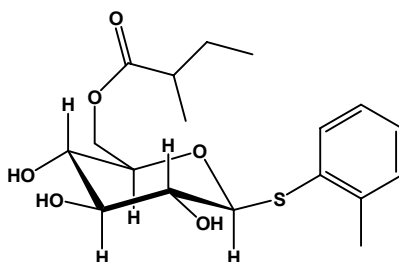


## IR

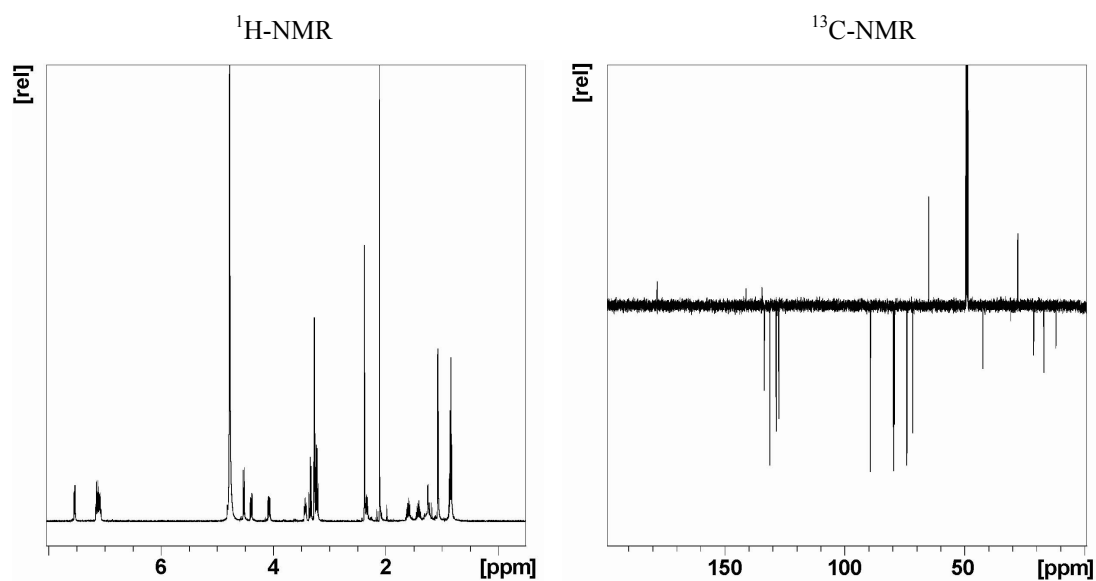


## MS

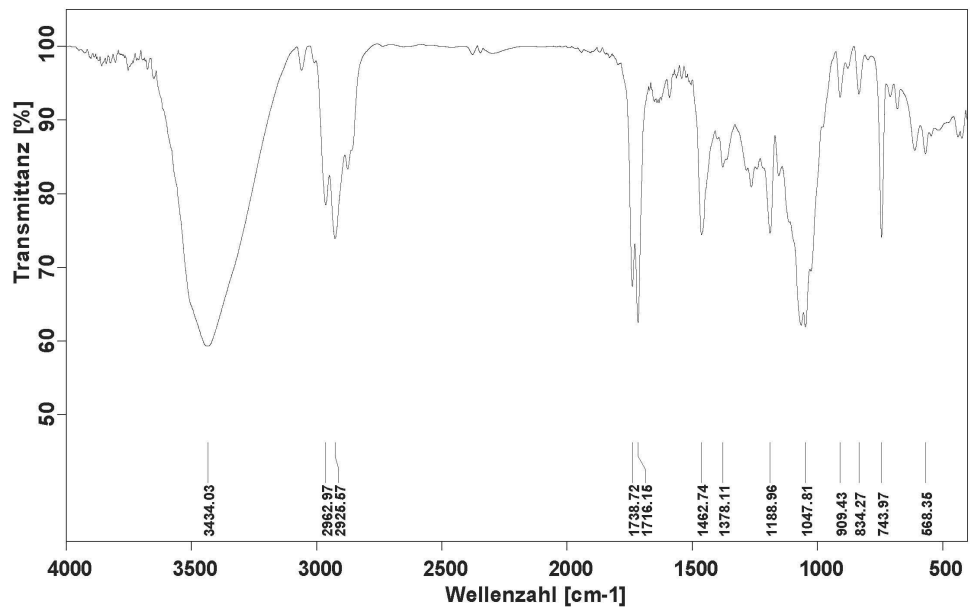


5.16.1.16 2-Tolyl-6'-*O*-(2-methylpropanyl)-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid

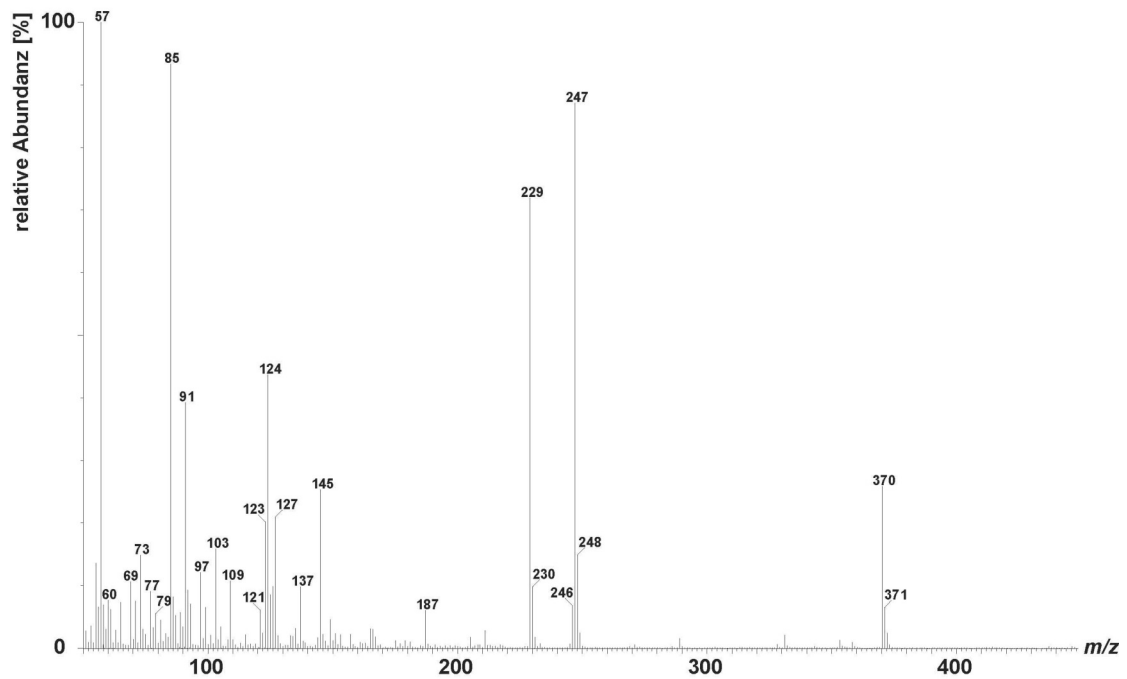
Ausbeute: 42%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 7.54 (dd,  $J=7.4$ ,  $J=1.5$ , 2H), 7.17-7.06 (m, 6H), 4.53 (dd,  $J=9.8$ ,  $J=1.5$ , 1H), 4.40 (dd,  $J=11.5$ ,  $J=1.9$ , 1H), 4.08 (dd,  $J=12.1$ ,  $J=6.8$ , 1H), 3.46-3.40 (m, 2H), 3.35 (t,  $J=8.7$ , 2H), 3.23 (q,  $J=9.6$ , 4H), 1.65-1.54 (m, 2H), 1.46-1.36 (m, 2H), 1.07 (dd,  $J=6.7$ ,  $J=5.3$ , 4H), 0.85 (q,  $J=7.4$ , 4H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.2, 133.5, 133.4, 131.1, 128.6, 127.4, 89.3, 79.7, 79.2, 74.0, 71.6, 65.0, 42.4, 27.8, 21.2, 17.0, 11.9. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3434, 2963, 2926, 1739, 1716, 1463, 1378, 1264, 1189, 1048, 909, 834, 744. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 370(26), 247(85), 229(70), 145(25), 124(44), 91(39), 85(93), 57(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{S}$ : 370.145011; gefunden: 370.143501.



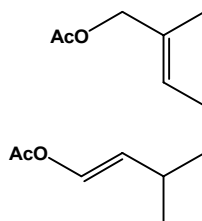
## IR



## MS



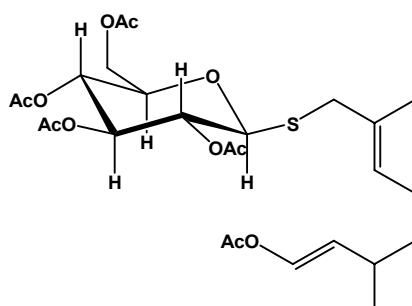


5.16.1.17 (2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,6-octadienylacetat

Hergestellt über Oxidation von Geranylacetat mit Selendioxid.

Zu einer Suspension von 3.2 mmol Selendioxid in 30 ml Dichlormethan werden 14 mmol Geranylacetat und 16.5 mmol einer 5.5 M wasserfreien Lösung von *t*-Butylhydroperoxid in Nonan gegeben. Nach zweistündigem Rühren bei 0 °C und einstündigem Rühren des Reaktionsgemisches bei RT wird abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene gelbe Öl wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Et<sub>2</sub>O/PE=1/1).

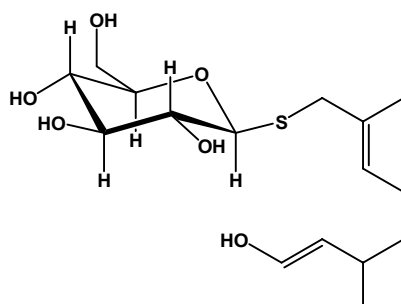
Ausbeute: 51%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm]: entspricht. <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm]: entspricht.

5.16.1.18 (2*E*,6*E*)-8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-1'-thio-β-D-glucopyranosid

Hergestellt über Mitsunobu-Kopplung aus (2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,6-octadienylacetat.

Ausbeute: 82%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm]: entspricht. <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm]: entspricht.

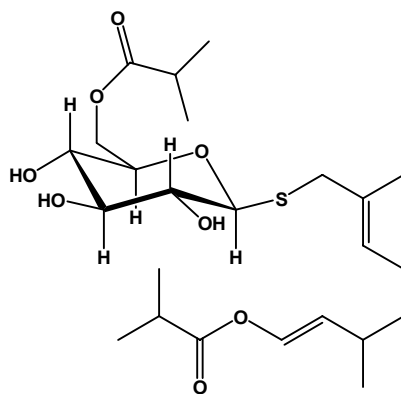
5.16.1.19 (2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid



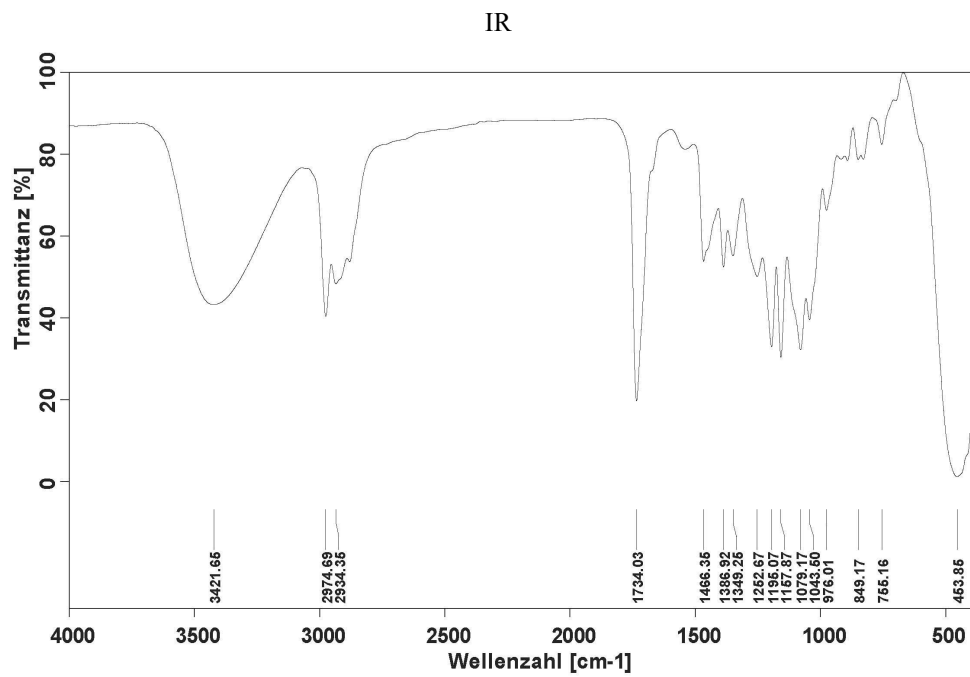
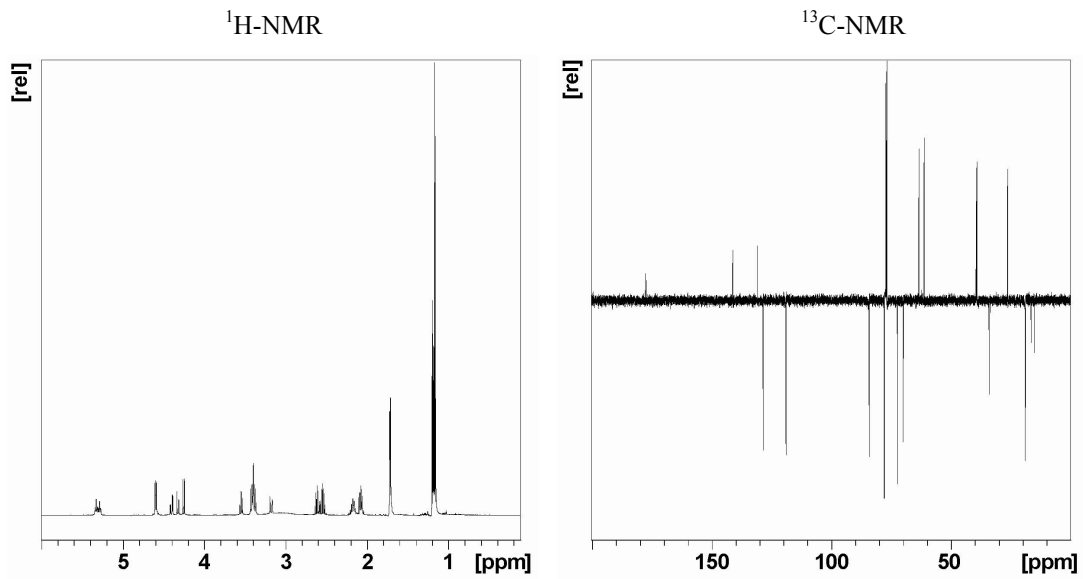
Hergestellt über Entschützung mit Natriummethanolat aus (2*E*,6*E*)-8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Ausbeute: 65%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: entspricht.

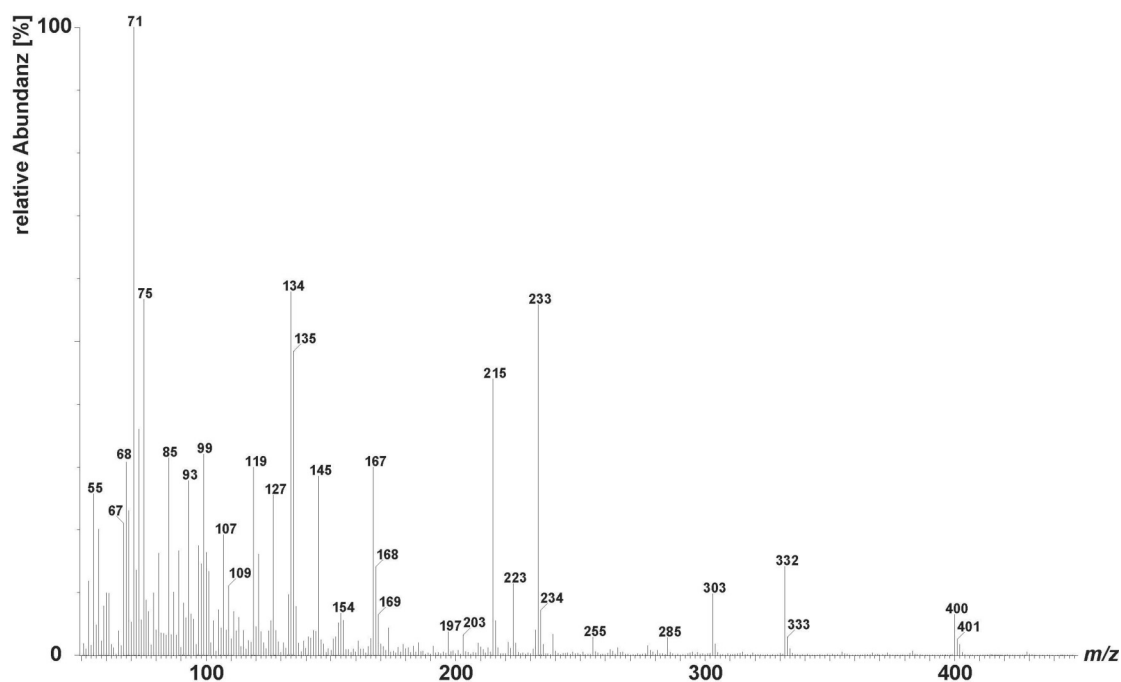
5.16.1.20 (2*E*,6*E*)-8-*O*-isobutyryl-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid



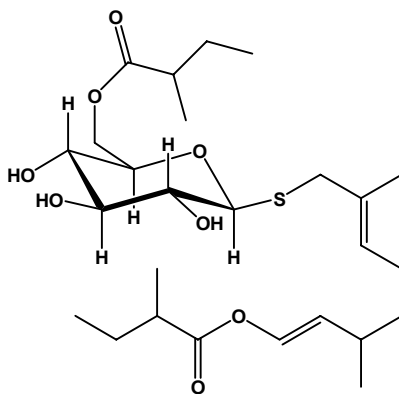
Ausbeute: 45%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 5.31 (dt,  $J=7.1$ ,  $J=1.2$ , 1H), 5.27 (t,  $J=6.8$ , 1H), 4.58 (d,  $J=7.0$ , 2H), 4.24 (d,  $J=10.0$ , 1H), 3.53 (t,  $J=8.7$ , 1H), 3.43-3.34 (m, 4H), 3.16 (d,  $J=13.3$ , 1H), 2.60 (sept,  $J=6.8$ , 1H), 2.53 (sept,  $J=7.3$ , 1H), 2.24-2.03 (m, 4H), 1.70 (d,  $J=5.6$ , 6H), 1.18 (quin,  $J=3.5$ , 7H), 1.15 (d,  $J=7.0$ , 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 177.8 (1), 177.4 (2), 141.2, 130.9, 128.5, 119.0, 84.2, 77.8 (1), 77.8 (2), 72.4, 70.0, 63.4, 61.2, 39.4, 39.1, 34.0 (1), 34.0 (2), 26.3, 18.8, 16.5, 15.0. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3422, 2975, 2934, 1734, 1466, 1387, 1349, 1193, 1253, 1195, 1158, 1079, 1044, 976. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 488(0.2), 400(6), 332(13), 303(10), 233(55), 215(44), 167(30), 145(29), 134(57), 119(30), 99(32), 71(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{S}$ : 488.241019; gefunden: 488.241713.



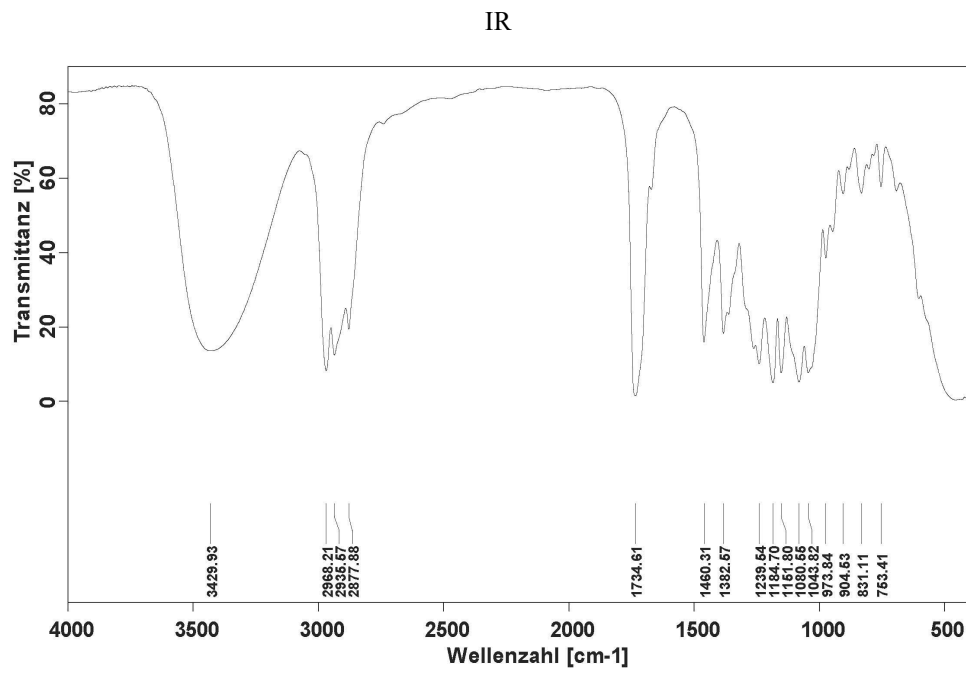
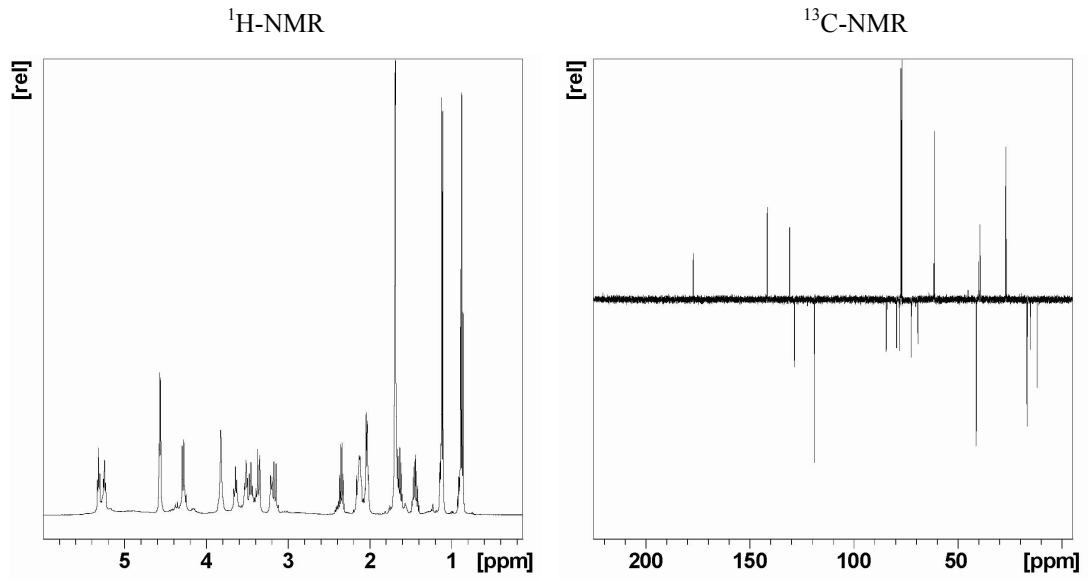
## MS



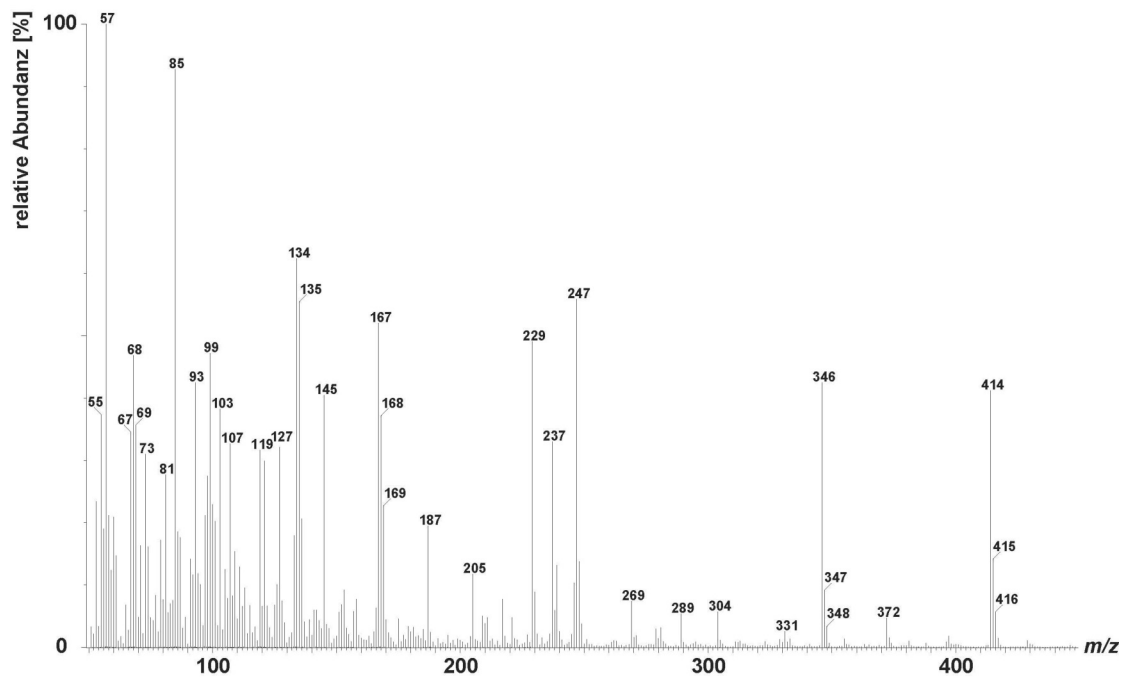
5.16.1.21 (2E,6E)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl-6'-O-(2-methylpropanyl)-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid



Ausbeute: 38%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 5.33 (t,  $J=7.0$ , 1H), 5.26 (t,  $J=6.4$ , 1H), 4.58 (d,  $J=6.8$ , 2H), 4.29 (d,  $J=9.7$ , 1H), 3.66 (t,  $J=9.3$ , 1H), 3.53 (t,  $J=8.6$ , 1H), 3.50-3.34 (m, 2H), 3.21 (d,  $J=9.6$ , 1H), 3.17 (d,  $J=12.9$ , 1H), 2.36 (sext,  $J=7.1$ , 1H), 2.19-2.10 (m, 2H), 2.08-2.01 (m, 2H), 1.73-1.60 (m, 6H), 1.46 (okt,  $J=6.9$ , 1H), 1.12 (d,  $J=7.1$ , 3H), 0.88 (t,  $J=7.6$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 177.1, 141.6, 130.9, 128.4, 118.8, 84.4, 79.4, 78.0, 72.4, 69.2, 61.5, 61.2, 41.1, 39.9, 39.2, 26.9, 26.4, 16.7, 16.6, 15.1, 11.7. IR (film)  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3430, 2968, 2936, 2878, 1735, 1460, 1383, 1240, 1185, 1152, 1081, 1044. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 414(40) [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ], 346(42), 247(54), 229(49), 167(51), 145(41), 134(63), 85(93), 57(100). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{S}$ : 432.212302; gefunden: 432.211351.

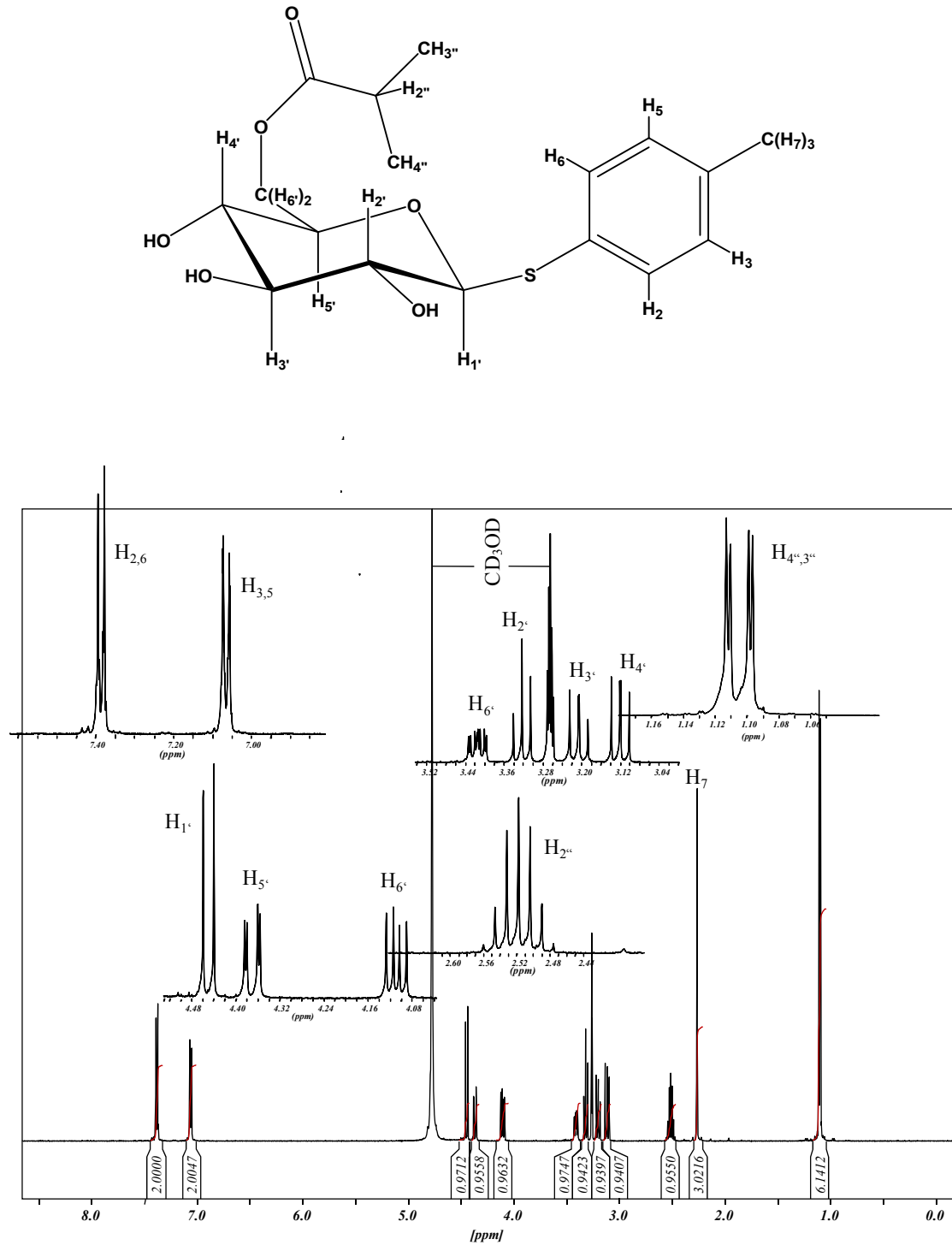


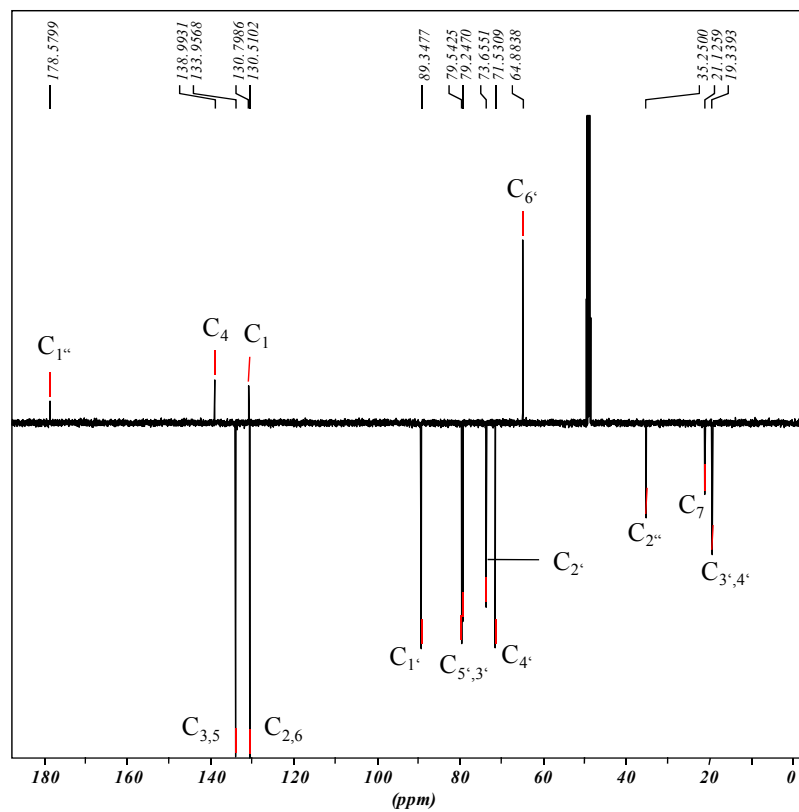
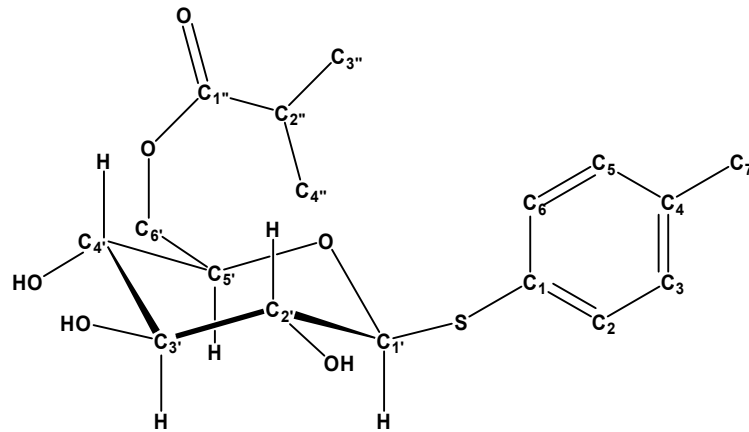
MS



Die Auswertung der Thioglucosidester-Spektren wird exemplarisch an 4-Tolyl-6'-*O*-isobutyryl-1'-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid gezeigt.

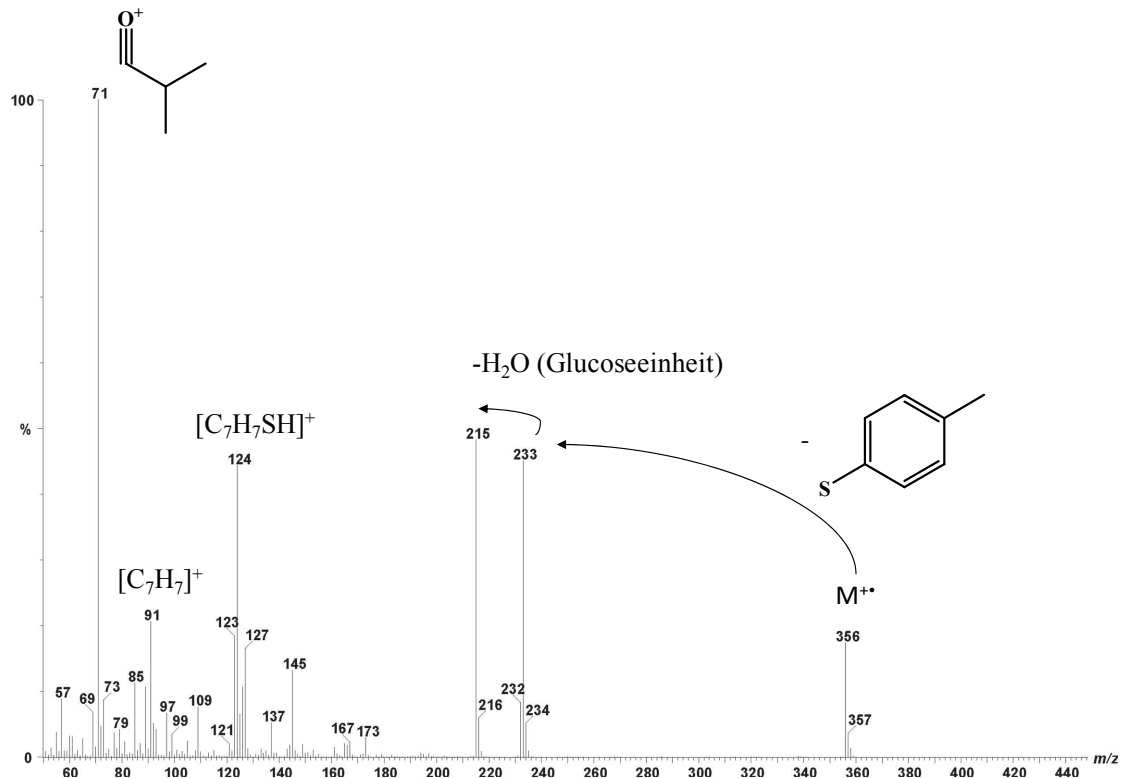
### $^1\text{H-NMR}$



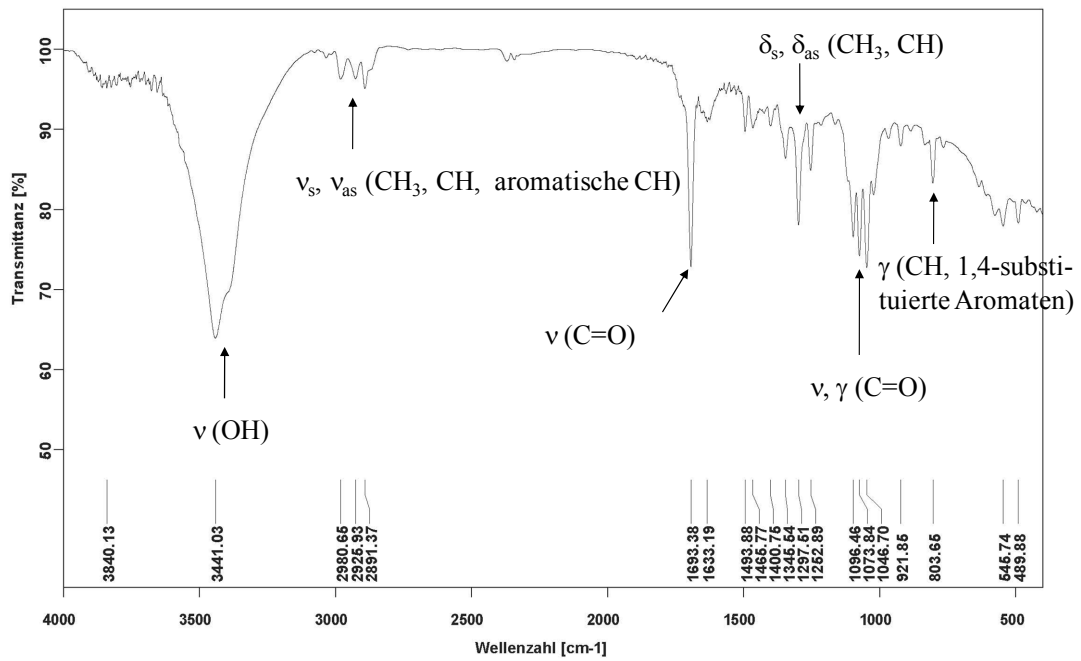
$^{13}\text{C}$ -NMR



MS



IR



mit

$\nu_{s,as}$

symmetrische und asymmetrische Streckschwingung

$\delta_{s,as}$

symmetrische und asymmetrische Deformationsschwingung

$\gamma$

Schaukelschwingung

### 5.16.2 1-Acylglucosen und –galactosen

Die Synthesen wurden nach einer Vorschrift von Bols und Hansen<sup>[15]</sup> durchgeführt (Abb.: 5-2).

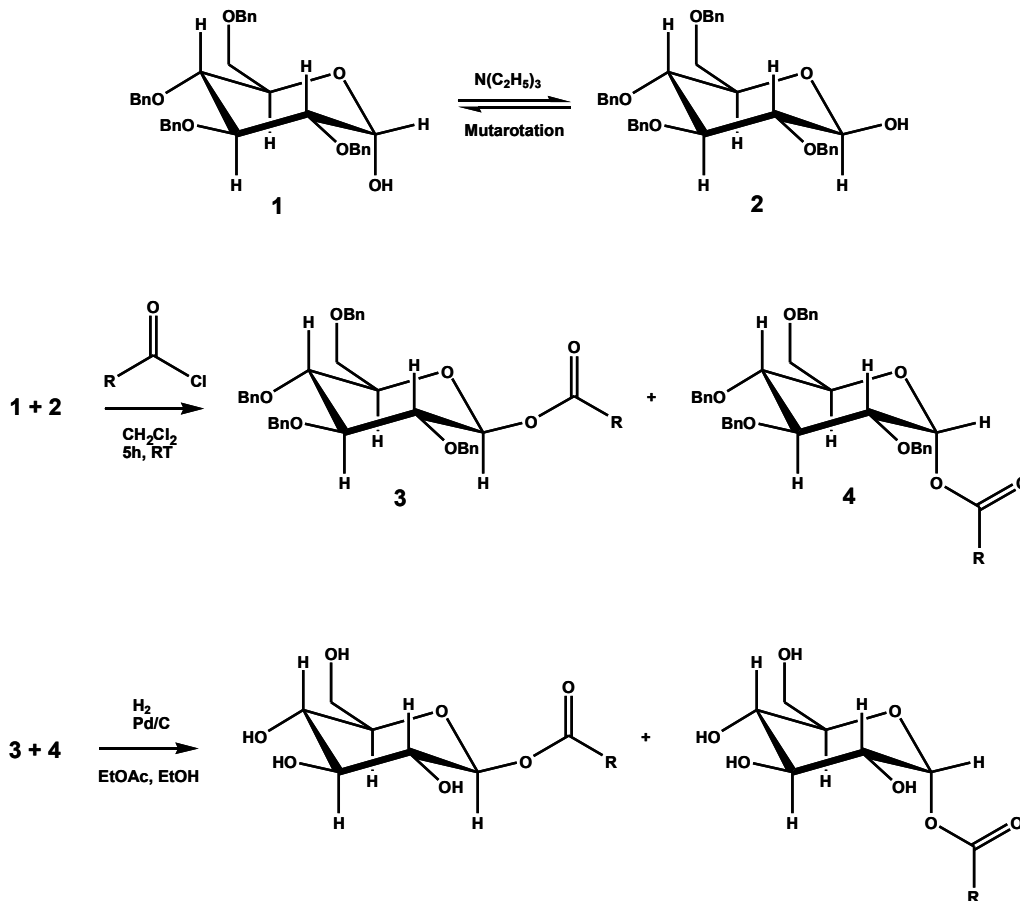


Abbildung 5-2: Synthese von 1-O-Acylglucosen und –galactosen, modifiziert nach Bols und Hansen<sup>[15]</sup>.

9.25 mmol 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranose wurden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 62 mmol  $\text{Et}_3\text{N}$  gelöst. Nach 10 min Rühren bei RT wurden über einen Zeitraum von 3 h 80 ml einer Lösung von 18.5 mmol Acylchlorid in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugegeben. Die Lösung wurde anschließend 2 h bei 25 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nacheinander mit 120 ml 1 M HCl, 120 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 120 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und anschließend eingengt. Das Produkt wurde bei -20 °C mit  $\text{Et}_2\text{O}$ /pentane (1/1) aus dem öligen Rohprodukt rekristallisiert.

Die Entschützung wurde durch Hydrogenierung erreicht ( $p=101$  kPa). 3 mmol Produkt wurden in 40 ml EtOAc und 20 ml EtOH gelöst. 0.4 g Pd-C (10%) wurden unter Argonatmosphäre zugegeben, das verschlossene Reaktionsgefäß wurde mit Wasserstoff gespült und mit einem Wasserstoffreservoir versehen. Nach 24 h wurde die Suspension filtriert und eingengt.

Die Stereochemie am anomeren Zentrum konnte mit Hilfe der NMR bestimmt werden. Zur Auswertung wurde die Karplus-Gleichung herangezogen, welche den mathematischen Zusammenhang zwischen Diederwinkel und Kopplungskonstante beschreibt. Das  $\beta$ -Anomer sollte somit eine Kopplungskonstante des Dubletts, welches das Proton am anomeren Kohlenstoffatom charakterisiert, von  $J=8-14$  Hz ( $\phi_{H-1,H-2}=180^\circ$ ) aufweisen (Abb.: 5-3). Das ist in jeder der synthetisierten 1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucosen der Fall.

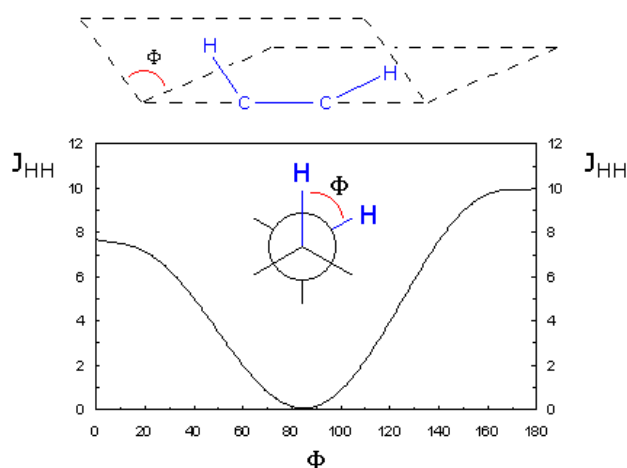
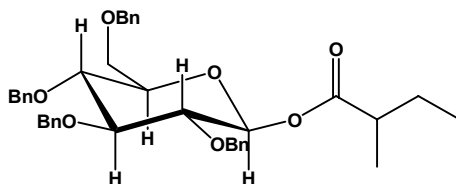


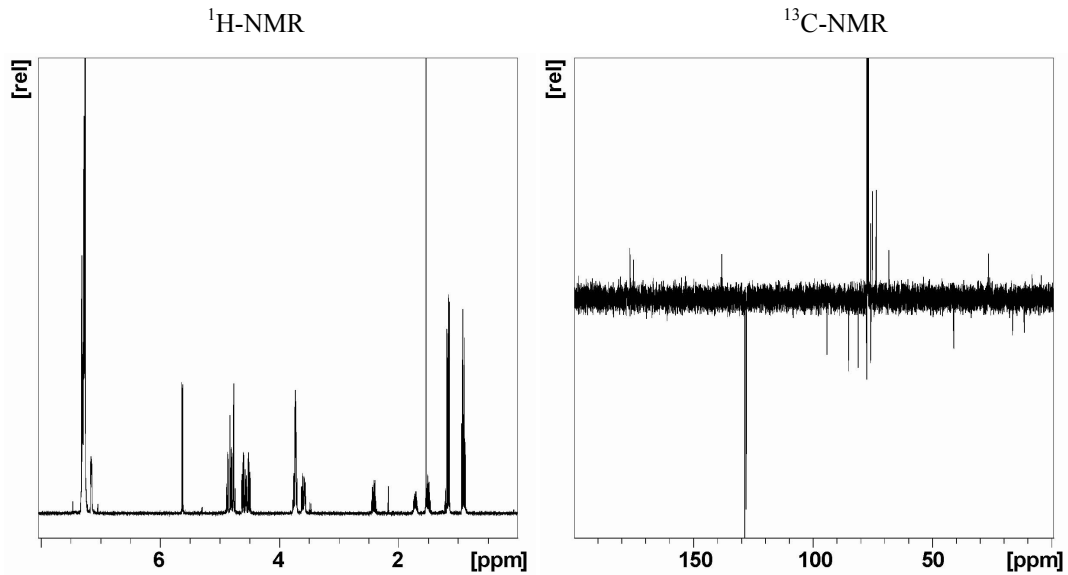
Abbildung 5-3: Graphische Darstellung der Karplus-Gleichung (<http://users.unimi.it> (29.05.2009)).

#### 5.16.2.1 1-*O*-(2-CH<sub>3</sub>-butanoyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranose

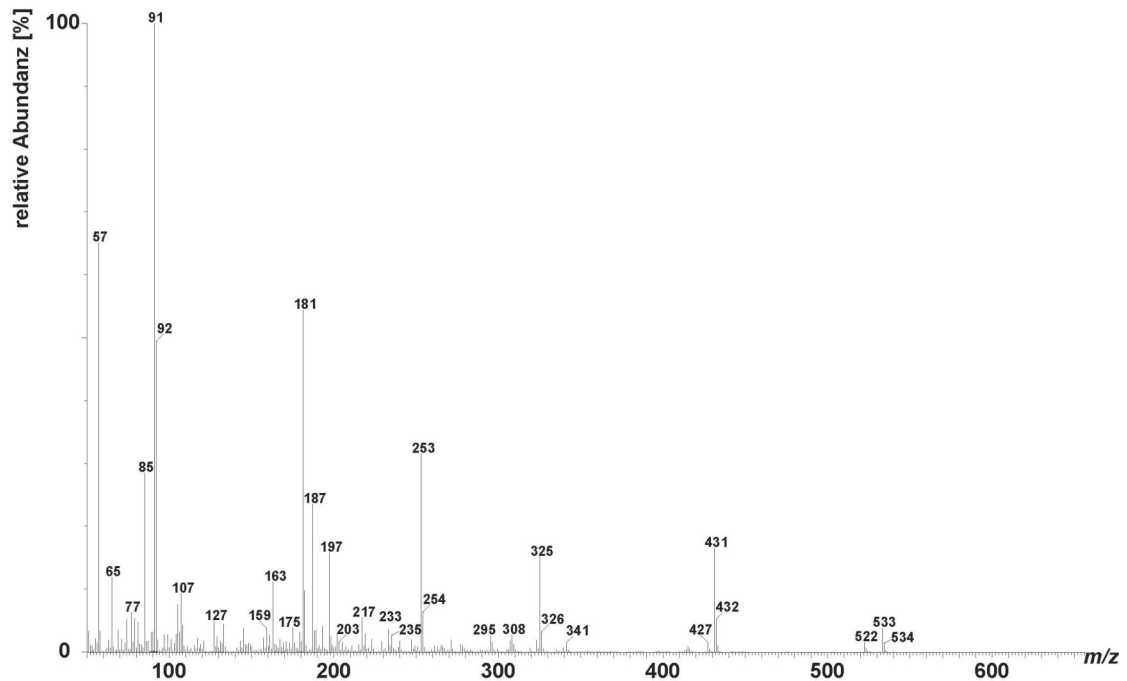


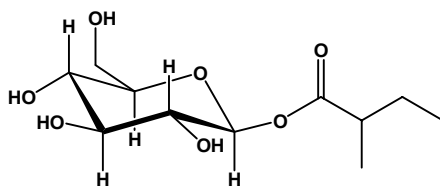
Ausbeute: 17%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 7.33-7.23 (m, 20H), 5.63d,  $J=8.02$ , 1H), 4.90-4.73 (m, 5H), 4.62 (dd,  $J=12.3$ ,  $J=4.4$ , 1H), 4.56 (dd,  $J=10.8$ ,  $J=3.9$ , 1H), 4.50 (dd,  $J=12.1$ ,  $J=2.7$ , 1H), 3.78-3.69

(m, 4H), 3.64-3.55 (m, 2H), 2.41 (sext,  $J=7.1$ , 1H), 1.56-1.46 (m, 2H), 1.17 (dd,  $J=11.8$ ,  $J=6.9$ , 3H), 0.91 (dt,  $J=13.97$ ,  $J=7.56$ , 3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 176.5, 138.1 (4C, ipso-Ph), 128.4-127.7 (20C, Ph), 94.0-84.9-81.0-77.4-75.6-74.9 (C1-C6), 75.7-74.9-73.5-68.1 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 40.9, 26.5, 16.2, 11.4. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 533 (4), 431 (17), 325 (15), 253 (31), 197 (16), 187 (23), 181 (54), 163 (11), 91 (100), 85 (28), 57 (66). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{O}_7$  (-Bz): 533.253929; gefunden: 533.255066.

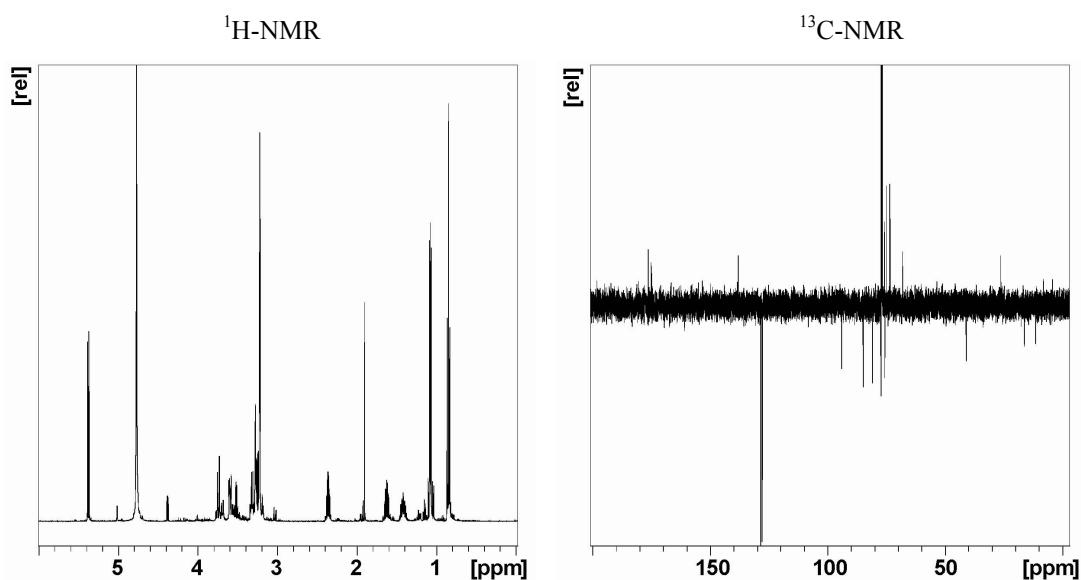


MS

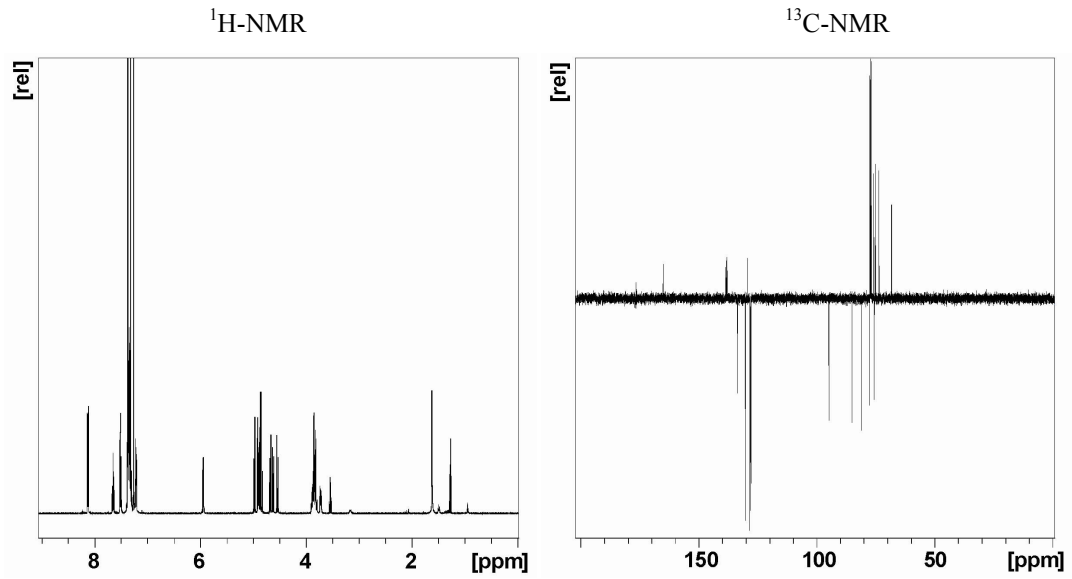


5.16.2.2 1-*O*-(2-CH<sub>3</sub>-butanoyl)- $\beta$ -D-glucopyranose

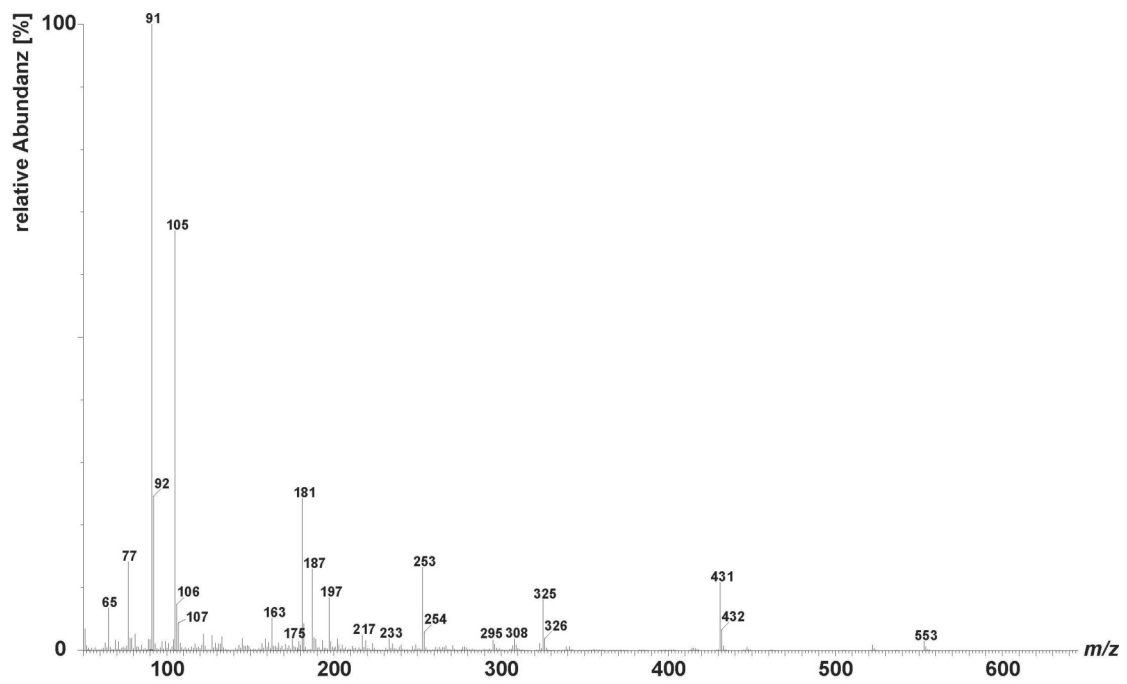
Ausbeute: 88%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 5.40 (d,  $J=8.25$ , 1H), 3.76 (d,  $J=12.6$ , 1H), 3.62 (dq,  $J=12.26$ ,  $J=2.75$ , 1H), 3.37-3.25 (m, 4H), 2.38 (sext,  $J=7.11$ , 1H), 1.64 (sept,  $J=6.19$ , 1H), 1.49-1.39 (m, 1H), 1.10 (dd,  $J=6.99$ ,  $J=2.97$ , 3H), 0.87 (t,  $J=7.56$ , 3H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 177.0, 95.7-78.9-78.1-74.0-71.1-62.4 (C1-C6), 42.2, 27.6, 16.7, 11.8. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 215 (4), 157 (8), 145 (9), 103(26), 85 (78), 73 (91), 57 (100). HR-ESI-MS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>: berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>: 265.128730; gefunden: 265.12933.

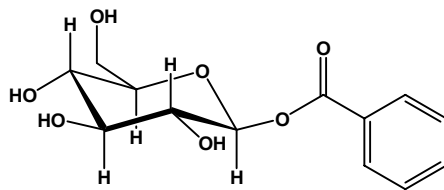




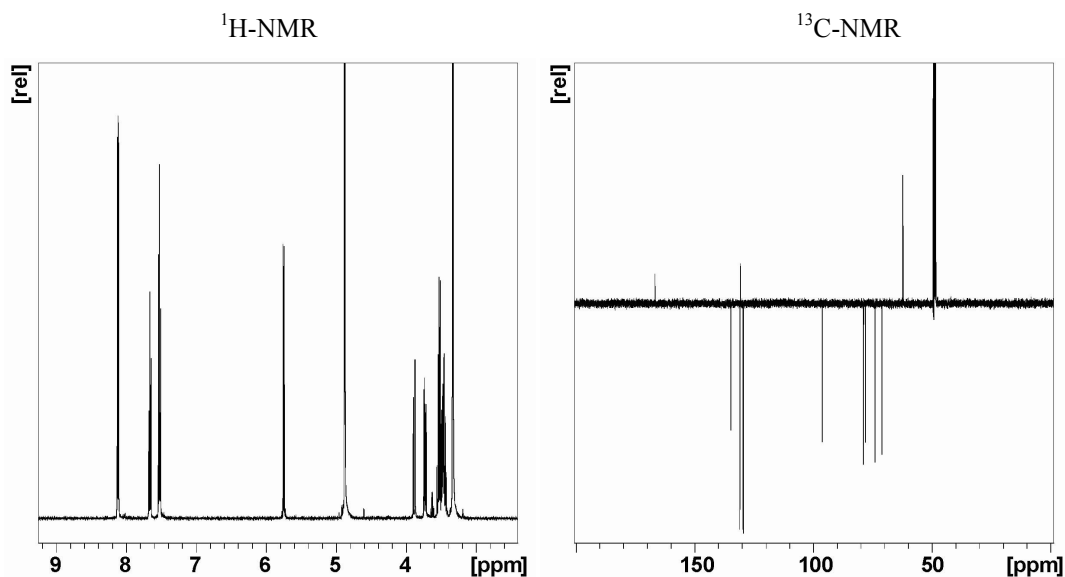


MS



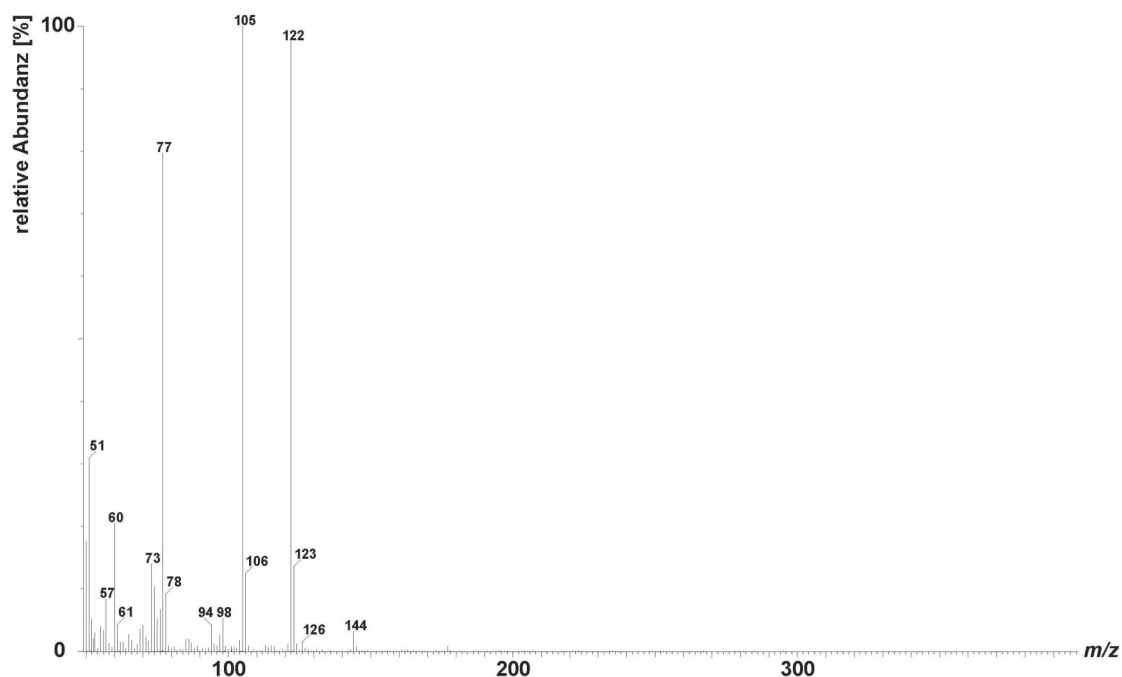
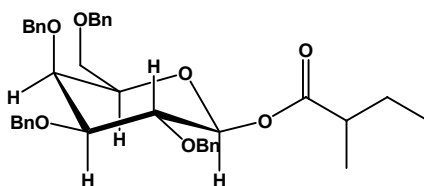
5.16.2.4 1-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranose

Ausbeute: 88%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 8.03 (dd,  $J=8.36$ ,  $J=1.37$ , 2H), 7.56 (tt,  $J=7.33$ ,  $J=1.38$ , 1H), 7.42 (t,  $J=8.25$ , 2H), 5.66 (d,  $J=8.02$ , 1H), 3.79 (dd,  $J=12.14$ ,  $J=2.06$ , 1H), 3.63 (dd,  $J=12.15$ ,  $J=4.81$ , 1H), 3.46-3.32 (m, 4H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 166.8, 134.7-130.94-130.87-129.6 (Benzoyl), 96.3-79.0-78.1-74.1-71.1-62.3 (C1-C6). MS (70 eV)  $m/z$  (%): 144(4), 122(97), 105 (100), 77 (80), 60(20), 51(31). HR-ESI-MS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_7$ : 285.097430; gefunden: 285.09706.

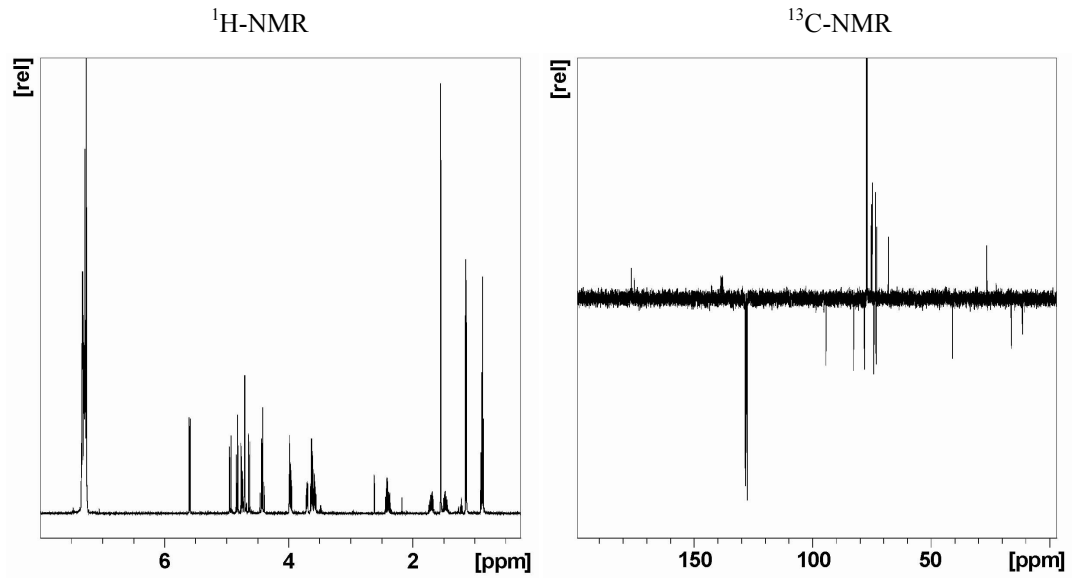




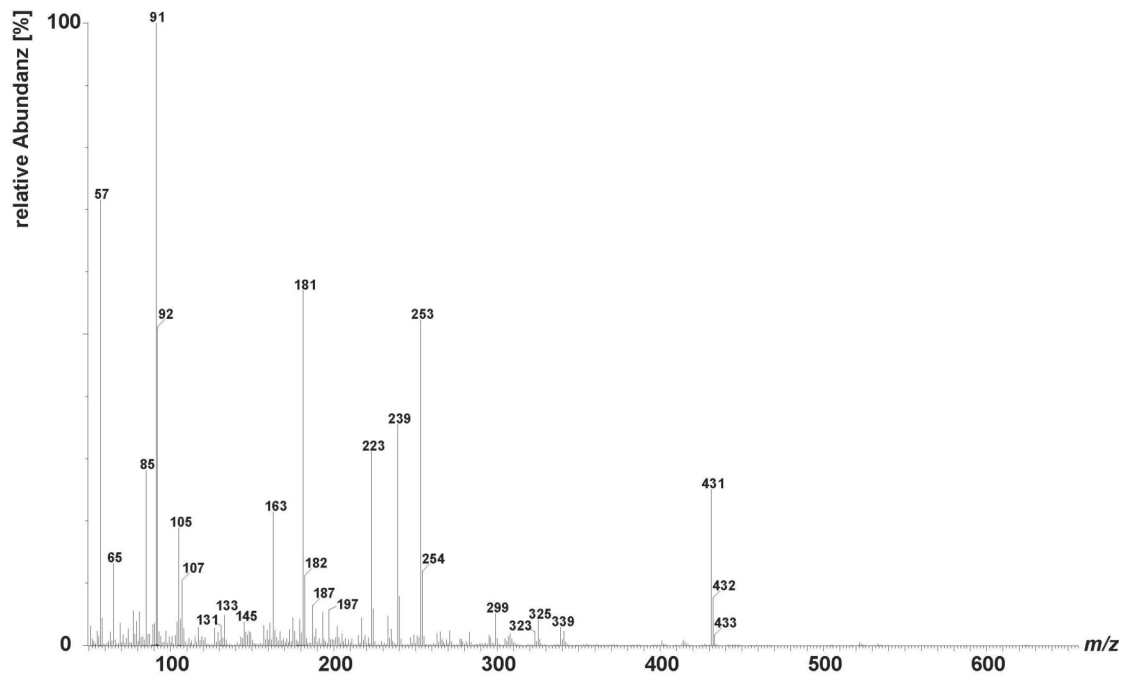
MS

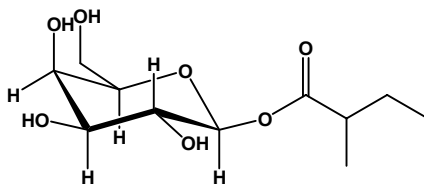
5.16.2.5 1-*O*-(2-CH<sub>3</sub>-butanoyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranose

Ausbeute: 15%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 7.35-7.26 (m, 20H), 5.60 (d,  $J$ =8.25, 1H), 4.94 (d,  $J$ =11.46, 1H), 4.83 (d,  $J$ =11.00, 1H), 4.75 (d,  $J$ =10.99, 1H), 4.70 (d,  $J$ =2.52, 2H), 4.63 (d,  $J$ =11.69, 1H), 4.43 (q,  $J$ =8.25, 2H), 4.00-3.94 (m, 2H), 3.72-3.68 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 2.44-2.35 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.55 (s, 2H), 1.52-1.41 (m, 1H), 1.14 (dd,  $J$ =6.99,  $J$ =1.37, 3H), 0.88 (q,  $J$ =7.57, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 176.5, 138.6-137.9 (4C, ipso-Ph), 128.4-127.6 (20C, Ph), 94.2-82.6-78.0-74.1-73.2-72.9 (C1-C6), 75.2-74.7-73.5-68.0 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 40.9, 26.5, 16.1, 11.5. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 431(26), 253(52), 239(35), 223(30), 181(57), 105(19), 91(100), 85(28), 57(72). HR-MS  $m/z$  [ $M^+$ ]: berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>: 624.306793; gefunden: 624.308704.

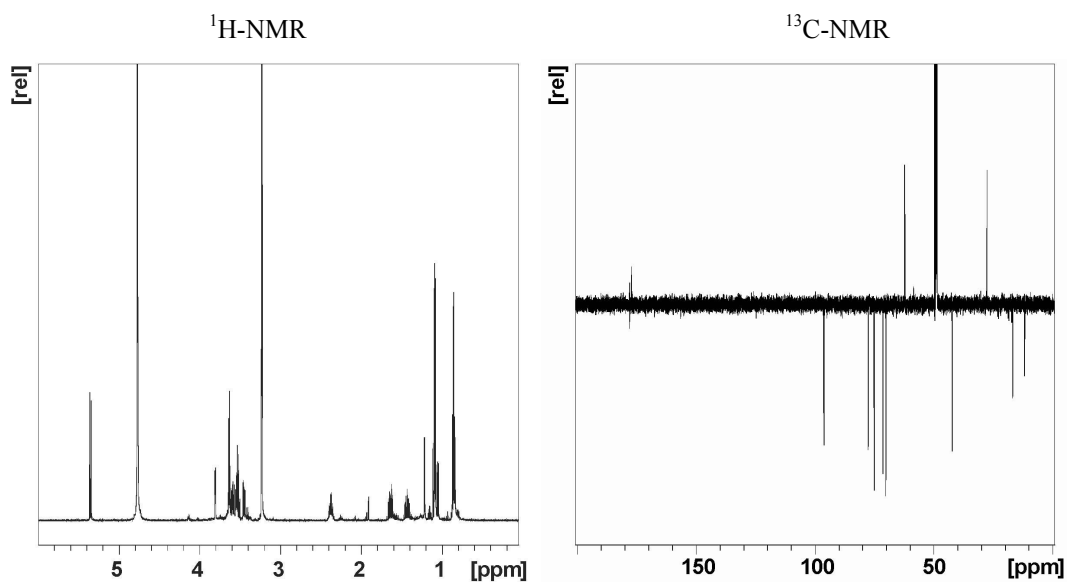


MS

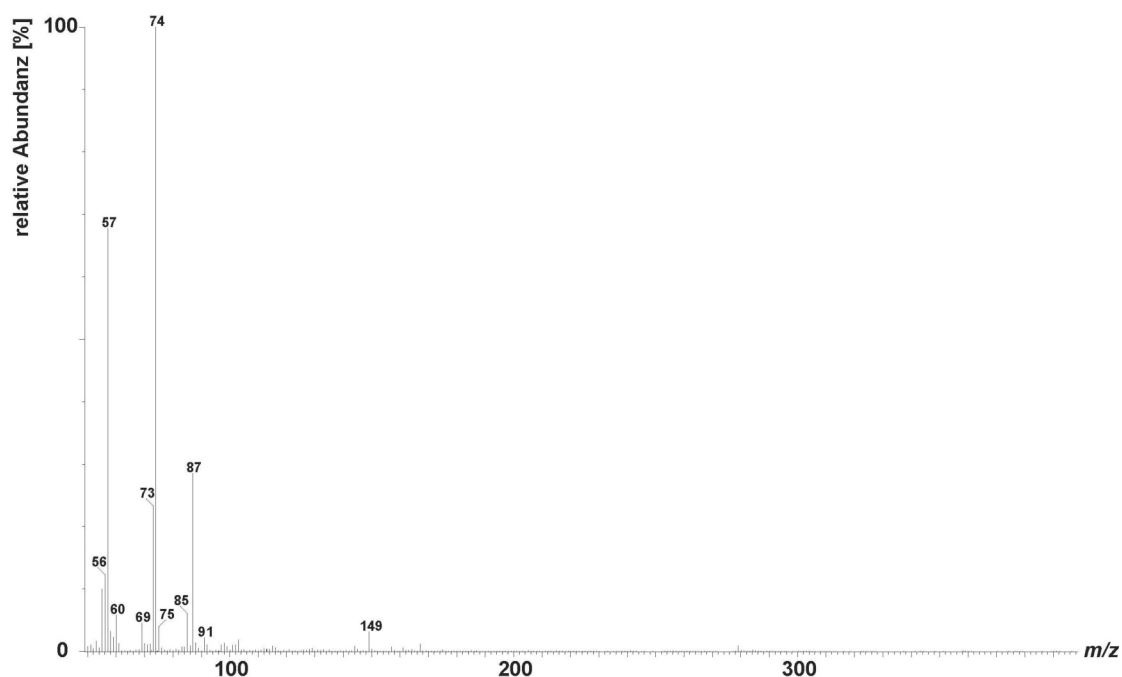
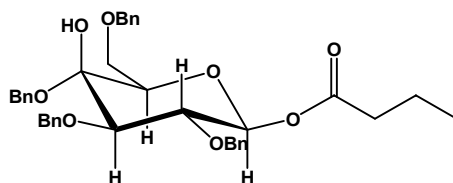


5.16.2.6 1-*O*-(2-CH<sub>3</sub>-butanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranose

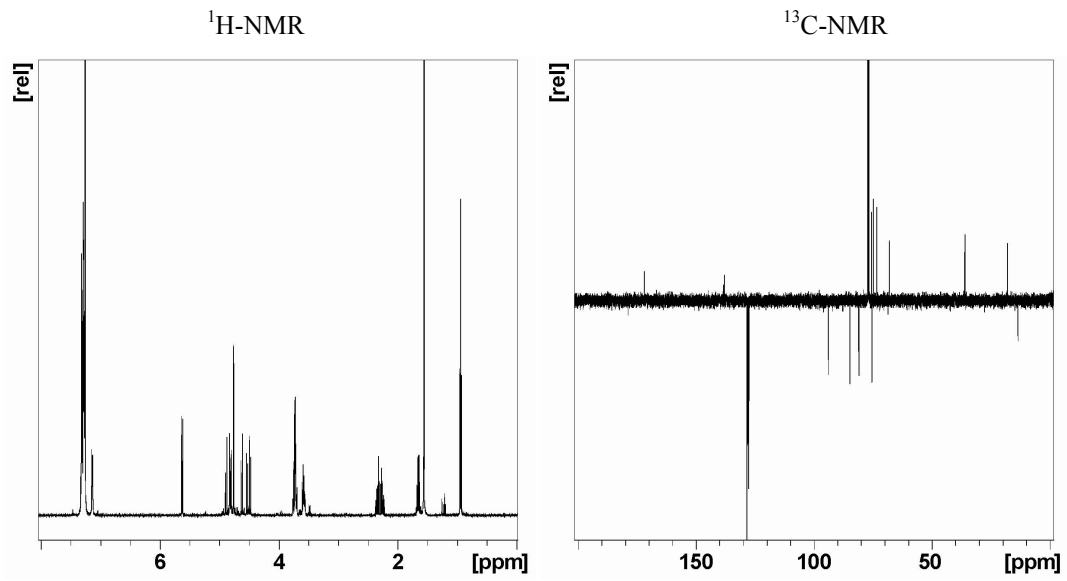
Ausbeute: 86%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 5.36 (d,  $J$ =8.02, 1H), 3.81 (d,  $J$ =3.44, 1H), 3.64 (d,  $J$ =6.19, 2H), 3.62-3.53 (m, 2H), 3.45 (dd,  $J$ =9.74,  $J$ =2.75, 1H), 2.43-2.34 (m, 1H), 1.64 (sext,  $J$ =7.34, 1H), 1.44 (sept,  $J$ =7.1, 1H), 1.09 (dd,  $J$ =7.1,  $J$ =1.15, 3H), 0.86 (dt,  $J$ =7.45,  $J$ =1.37, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]: 177.1, 96.2-77.5-75.0-71.3-70.1-62.2 (C1-C6), 42.2, 27.6, 16.7, 11.8. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 149(3), 87(28), 85(6), 74(100), 57(67), HR-ESI-MS  $m/z$  [M-H]<sup>+</sup>: berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>: 263.11308; gefunden: 263.11362.



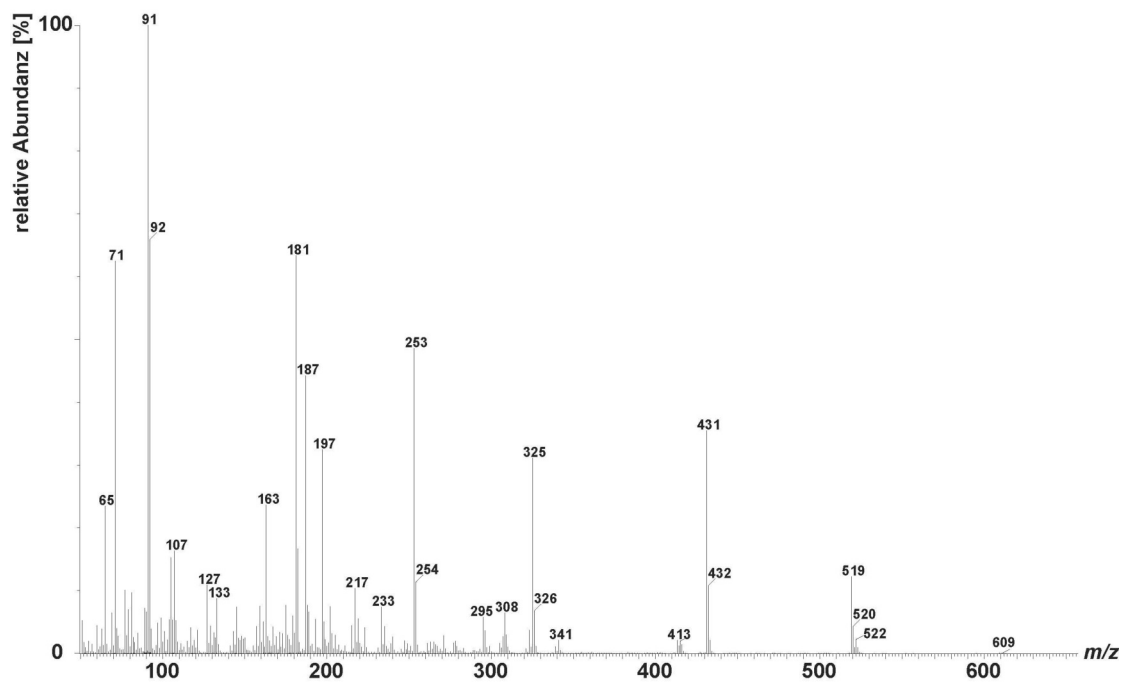
MS

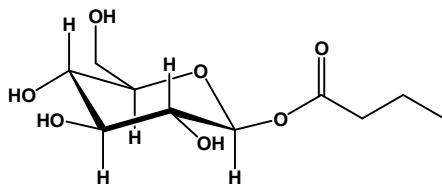
5.16.2.7 1-*O*-*n*-butanoyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranose

Ausbeute: 28%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 7.35-7.26 (m, 20H), 5.63 (d,  $J=8.02$ , 1H), 4.90-4.79 (m, 3H), 4.76 (s, 2H), 4.63 (d,  $J=12.14$ , 1H), 4.54 (d,  $J=10.54$ , 1H), 4.49 (d,  $J=12.14$ , 2H), 3.78-3.69 (m, 4H), 3.62-3.55 (m, 2H), 2.38-2.22 (m, 2H), 1.65 (sext,  $J=6.87$ , 2H), 0.94 (t,  $J=7.56$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 176.5, 138.4-138.0 (4C, ipso-Ph), 128.4-127.7 (20C, Ph), 94.0-84.8-81.1-77.3-75.5-? (C1-C6), 75.7-75.0-73.5-68.1 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 36.1, 18.0, 13.6. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 609(0.1), 519(12), 431(35), 325(31), 253(49), 197(32), 187(44), 181(64), 163(24), 107(17), 91(100), 71(62). HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_7$ : 610.293054; gefunden: 610.294146.

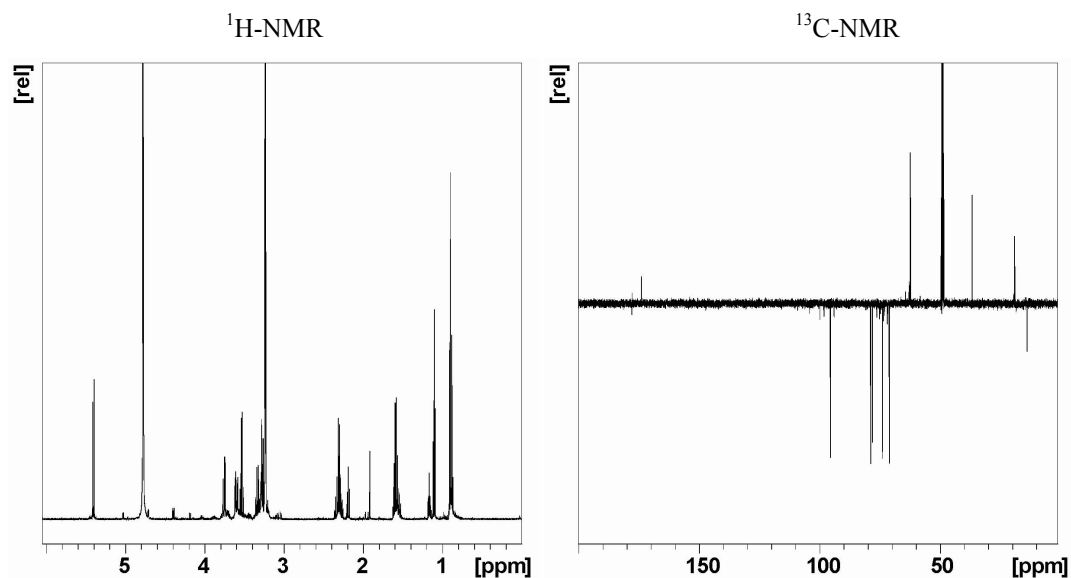


MS

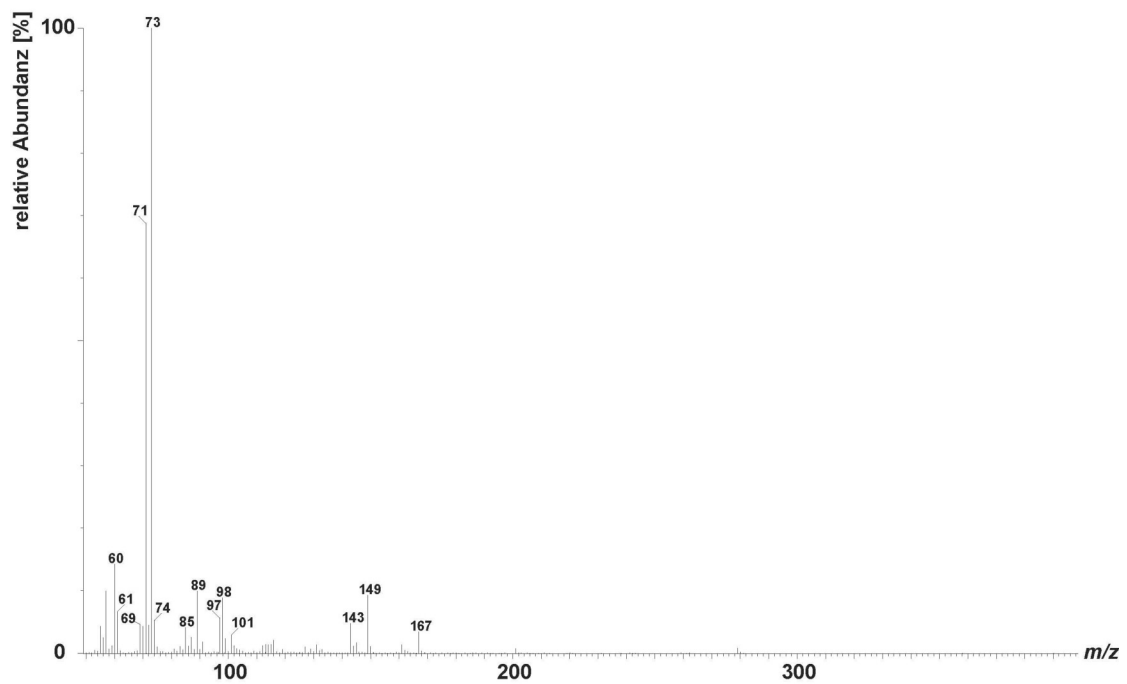


5.16.2.8 1-*O*-*n*-butanoyl- $\beta$ -D-glucopyranose

Ausbeute: 81%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 5.41 (d,  $J=8.25$ , 1H), 3.77 (dd,  $J=11.11$ ,  $J=2.06$ , 1H), 3.61 (dd,  $J=12.14$ ,  $J=4.81$ , 1H), 3.54 (q,  $J=7.1$ , 1H), 3.37-3.26 (m, 3H), 2.32 (sext,  $J=8.02$ , 2H), 1.60 (sext,  $J=7.56$ , 2H), 0.91 (t,  $J=7.56$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 174.0, 95.6-78.8-78.1-74.0-71.1-62.4 (C1-C6), 36.8, 19.1, 13.9. MS (70 eV)  $m/z$  (%): 167(4), 149(9), 143(5), 98(9), 89(10), 73(100), 71(68), 60(14). HR-ESI-MS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ]: berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$ : 273.095024; gefunden 273.09475.



MS

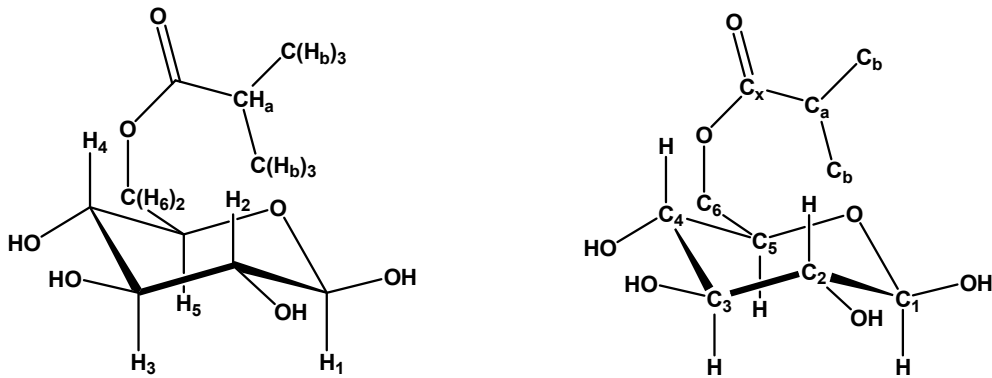


### 5.16.3 Sonstige

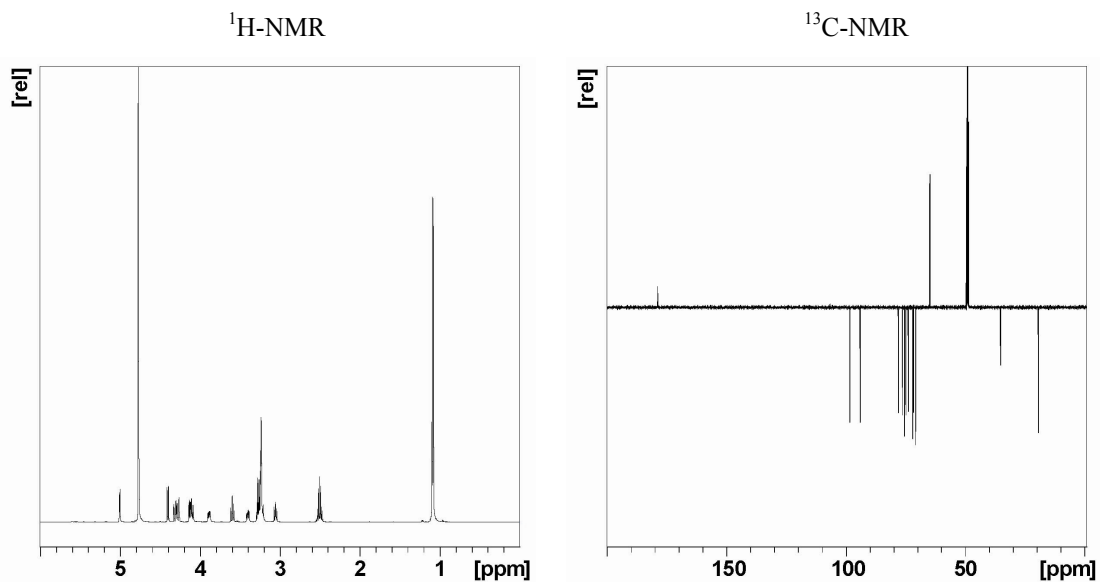
Die Acylierung von Kohlenhydraten und Alkoholen wurde analog zu Kapitel 5.16.1 durchgeführt.

Die 6-*O*- $\alpha/\beta$ -D-Acylglucosen wurden in Analogie zu Ghangas und Steffens<sup>[41, 42]</sup> durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=75/22/3).

Da die synthetisierten 6-*O*-D-Acylglucosen als Anomerengemisch vorliegen, wurden in den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren multiple Signale beobachtet. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit den 2D-NMR-Experimenten HSQC und HMBC (nicht dargestellt).

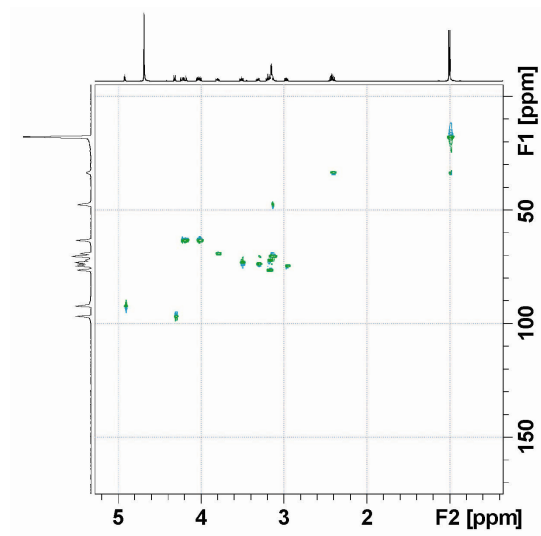
5.16.3.1 6-*O*-isobutyryl- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosid

Ausbeute: 39%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 5.01 (d,  $J=3.67$ ,  $0.5\text{H}_{(1)}$ ), 4.41 (d,  $J=7.74$ ,  $0.5\text{H}_{(1)}$ ), 4.30 (ddd,  $J=19.13$ ,  $J=11.88$ ,  $J=2.15$ ,  $1\text{H}_{(6)}$ ), 4.15-4.08 (m,  $1\text{H}_{(6)}$ ), 3.89 (ddd,  $J=10.17$ ,  $J=5.48$ ,  $J=2.17$ ,  $0.5\text{H}_{(2)}$ ), 3.60 (t,  $J=9.29$ ,  $0.5\text{H}_{(3)}$ ), 3.43-3.38 (m,  $1\text{H}_{(2)}$ ), 3.30-3.20 (m, überlagert vom  $\text{MeOD}_4$ -Quintett,  $1\text{H}_{(5)}$ ), 3.17 (verdeckt durch  $\text{MeOD}_4$ -Signal,  $1\text{H}_{(4)}$ ), 3.08-3.04 (t,  $J=8.69$ ,  $0.5\text{H}_{(3)}$ ), 2.51 (sept,  $J=7.00$ ,  $1\text{H}_{(a)}$ ), 1.10 (d,  $J=7.01$ ,  $6\text{H}_{(b)}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.8/178.7 ( $\text{C}_x$ ), 98.3/94.0 ( $\text{C}_1$ ), 78.0/73.8 ( $\text{C}_5$ ), 76.2/74.8 ( $\text{C}_3$ ), 75.4/70.8 ( $\text{C}_2$ ), 72.0/71.7 ( $\text{C}_4$ ), 64.9/64.8 ( $\text{C}_6$ ), 35.2/35.2 ( $\text{C}_a$ ), 19.4/19.3 ( $\text{C}_b$ ). MS (70 eV)  $m/z$  (%): 233(0.5), 219(3), 203(3), 173(5), 161(5), 143(5), 131(18), 103(17), 89(28), 71(100), 60(19), 43(97). ESI-HR-MS  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ : berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_7$ : 251.25366; gefunden: 251.11276.

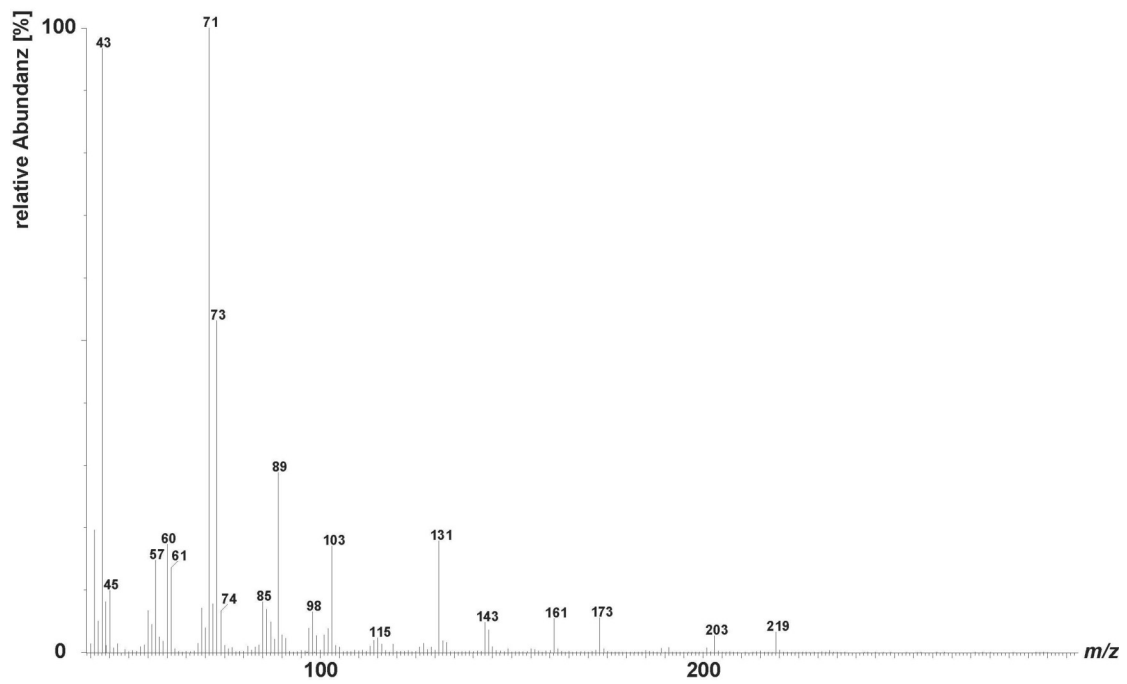


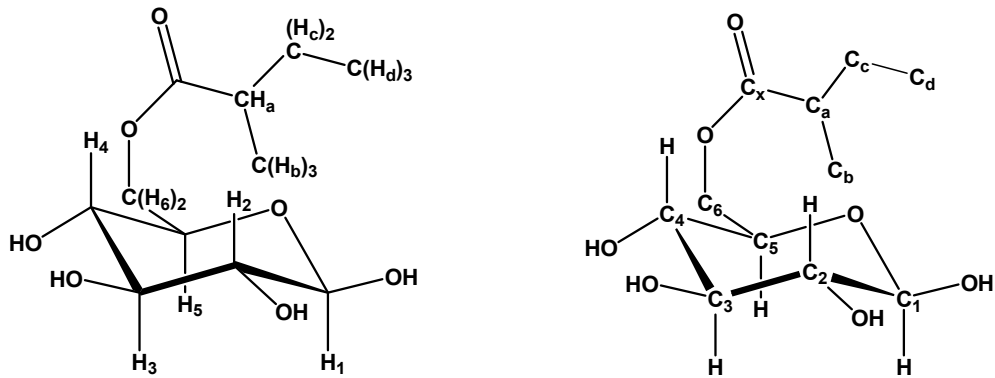


HSQC

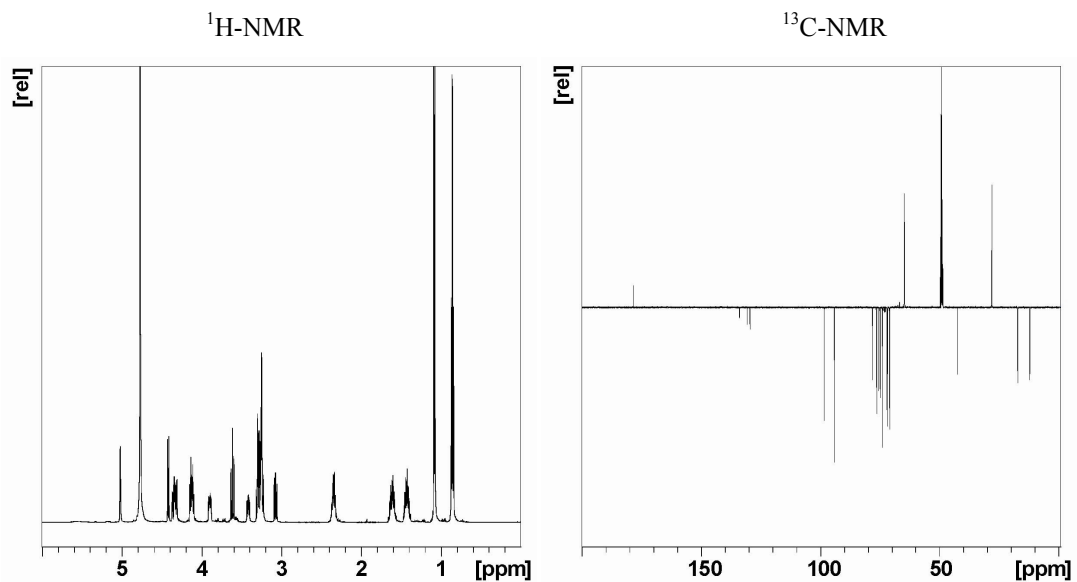


MS

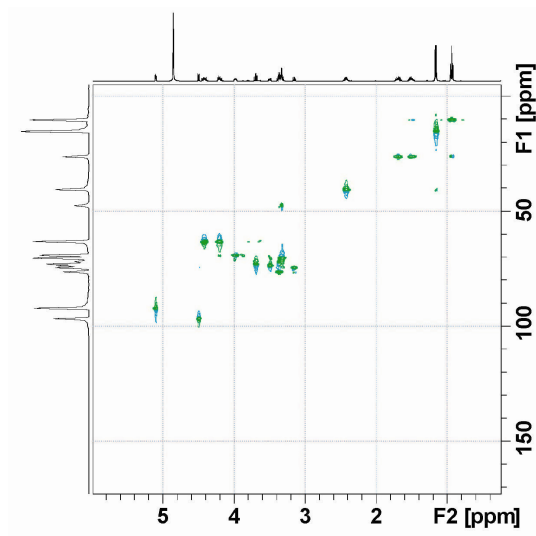


5.16.3.2 6-*O*-(2-methylpropanyl)- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosid

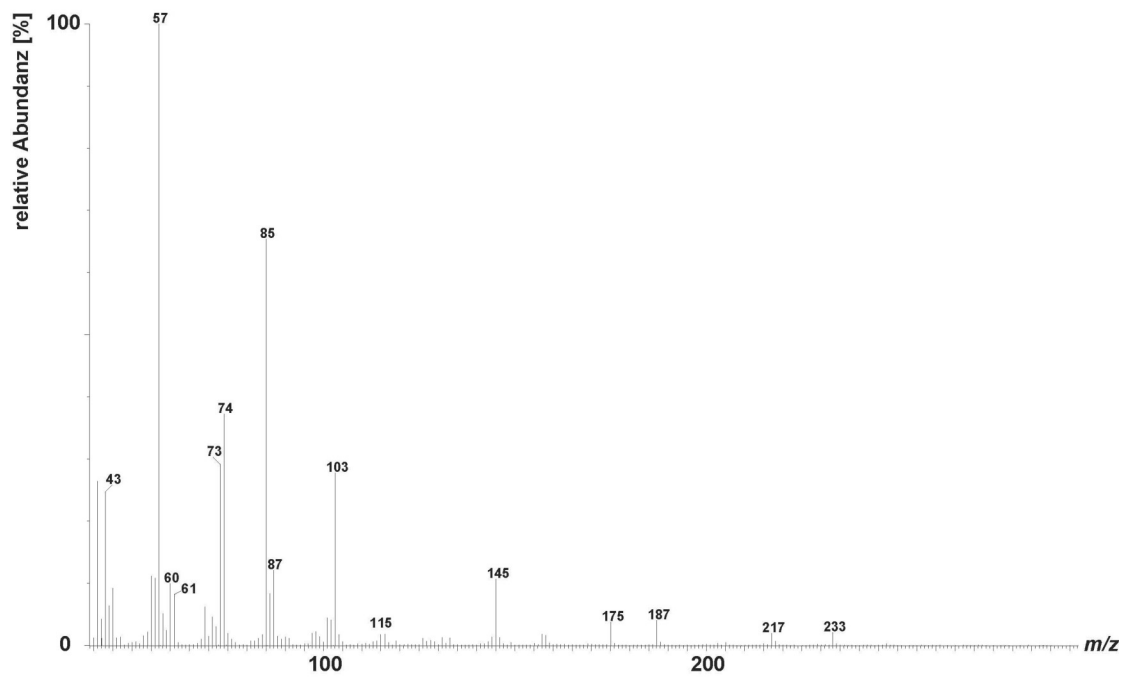
Ausbeute: 46%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ ) [ppm]: 5.03 (d,  $J=3.53$ ,  $0.5\text{H}_{(1)}$ ), 4.42 (d,  $J=7.83$ ,  $0.5\text{H}_{(1)}$ ), 4.38-4.30 (m,  $1\text{H}_{(6)}$ ), 4.16-4.09 (m,  $0.5\text{H}_{(6)}$ ), 3.90 (dd,  $J=10.04$ ,  $J=5.02$ ,  $0.5\text{H}_{(2)}$ ), 3.62 (t,  $J=9.42$ ,  $0.5\text{H}_{(3)}$ ), 3.44-3.39 (m,  $0.5\text{H}_{(2)}$ ), 3.32-3.26 (m,  $1\text{H}_{(5)}$ ), 3.24 (verdeckt durch  $\text{MeOD}_4$ -Signal,  $1\text{H}_{(4)}$ ), 3.08 (dd,  $J=9.62$ ,  $J=7.90$ ,  $0.5\text{H}_{(3)}$ ), 2.40-2.30 (m,  $1\text{H}_{(a)}$ ), 1.67-1.56 (m,  $1\text{H}_{(c)}$ ), 1.48-1.38 (m,  $1\text{H}_{(c)}$ ), 1.09 (td,  $J=6.91$ ,  $J=0.92$ ,  $3\text{H}_{(b)}$ ), 0.86 (dt,  $J=7.47$ ,  $J=1.03$ ,  $3\text{H}_{(c)}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{MeOD}_4$ )  $\delta$  [ppm]: 178.4/178.3 ( $\text{C}_x$ ), 98.2/94.0 ( $\text{C}_1$ ), 78.0/73.8 ( $\text{C}_5$ ), 76.2/74.8 ( $\text{C}_3$ ), 75.5/70.8 ( $\text{C}_2$ ), 72.0/71.8 ( $\text{C}_4$ ), 64.8/64.7 ( $\text{C}_6$ ), 42.5/42.3 ( $\text{C}_a$ ), 28.0/27.9 ( $\text{C}_c$ ), 17.1/17.0 ( $\text{C}_b$ ), 12.0/11.9 ( $\text{C}_d$ ). MS (70 eV)  $m/z$  (%): 233(2), 217(2), 187(4), 175(4), 145(10), 103(27), 85(66), 74(37), 57(100). ESI-HR-MS  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{Na}$ : 287.26207; gefunden 287.11025.



HSQC



MS



## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Alibert, G. und R. Ranjeva, *Research on Enzymes Catalyzing Biosynthesis of Phenol Acids in Quercus-Pedunculata (Ehrh) .I. Formation of Primary Terms in Cinnamic and Benzoic Series*. Febs Letters, 1971. **19**(1): p. 11-&.
2. Anderson, E.M., M. Karin und O. Kirk, *One biocatalyst - Many applications: The use of Candida antarctica B-lipase in organic synthesis*. Biocatalysis and Biotransformation, 1998. **16**(3): p. 181-204.
3. Arnett, R.H., Jr. und R.H. Arnett, Jr., *The beetles of the United States. (A manual for identification). 2nd. Edition*. 1968: p. i-xii, 1-1112.
4. Attygalle, A.B., J. Meinwald und T. Eisner, *Biosynthesis of methacrylic acid and isobutyric acids in a carabid beetle, Scarites subterraneus*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(37): p. 4805, 4849-4852.
5. Barbosa, P., D.K. Letourneau, P. Barbosa und D.K. Letourneau, *Novel aspects of insect-plant interactions*. Novel aspects of insect-plant interactions., 1988: p. 1-362.
6. Bartram, S., A. Jux, G. Gleixner und W. Boland, *Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves*. Phytochemistry, 2006. **67**(15): p. 1661-1672.
7. Baxter, R.L., E.M. Abbot, S.L. Greenwood und I.J. McFarlane, *Conservation of the Carbon Nitrogen Bond of Aspartic-Acid in the Biosynthesis of 3-Nitropropanoic Acid*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1985(9): p. 564-566.
8. Bellizzi, J.J., J. Widom, C. Kemp, J.Y. Lu, A.K. Das, S.L. Hofmann und J. Clardy, *The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(9): p. 4573-4578.
9. Benn, M.H., A. Lencucha, S. Maxie und S.A. Telang, *Pygidial Defensive Secretion of Carabus-Taedatus*. Journal of Insect Physiology, 1973. **19**(11): p. 2173-2176.
10. Bleton, J., P. Mejanelle, J. Sansoulet, S. Goursaud und A. Tchaplal, *Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums*. Journal of Chromatography A, 1996. **720**(1-2): p. 27-49.
11. Blum, M.S., *Chemical Defenses of Arthropods*. Blum, M. S. Chemical Defenses of Arthropods. Academic Press, Inc.: New York, N.Y., USA: London, England. Illus, 1981.
12. Blum, M.S., *Biosynthesis of arthropod exocrine compounds*. Annual Review of Entomology, 1987. **32**: p. 381-413.
13. Blum, M.S., *Antipredator devices in larvae of the Chrysomelidae: a unified synthesis for defensive eclecticism*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 277-288.

14. Blum, M.S., J.M. Brand, J.B. Wallace und H.M. Fales, *Chemical Characterization of Defensive Secretion of a Chrysomelid Larva*. Life Sciences Pt-2 Biochemistry General and Molecular Biology, 1972. **11**(10): p. 525-&.
15. Bols, M. und H.C. Hansen, *Simple Synthesis of Beta-D-Glucosyl Esters*. Acta Chemica Scandinavica, 1993. **47**(8): p. 818-822.
16. Bols, M., H.C. Hansen und B.I. Smith, *Beta-Selectivity of Sterically Hindered Acyl Chlorides in the Acylation of 2,3,4,6-Tetra-O-Benzyl-Alpha-D-Glucopyranose*. Acta Chemica Scandinavica, 1993. **47**(5): p. 532-534.
17. Bonsall, R.W. und R.P. Michael, *The Externalization of Vaginal Fatty-Acids by the Female Rhesus-Monkey*. Journal of Chemical Ecology, 1980. **6**(2): p. 499-509.
18. Bourne, P.C., M.N. Isupov und J.A. Littlechild, *The atomic-resolution structure of a novel bacterial esterase*. Structure with Folding & Design, 2000. **8**(2): p. 143-151.
19. Bowers, M.D., B.D. Roitberg und M.B. Isman, *The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects*. Insect chemical ecology: an evolutionary approach., 1992: p. 216-244.
20. Brueckmann, M., A. Termonia, J.M. Pasteels und T. Hartmann, *Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretions of Chrysomela populi and Phratora vitellinae (Chrysomelina)*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **32**(11): p. 1517-1523.
21. Brundin, A., G. Andersson, K. Andersson, T. Mossing und L. Kallquist, *Short-Chain Aliphatic-Acids in Interdigital Gland Secretion of Reindeer (Rangifer-Tarandus L), and Their Discrimination by Reindeer*. Journal of Chemical Ecology, 1978. **4**(5): p. 613-622.
22. Burse, A., A. Schmidt, S. Frick, J. Kuhn, J. Gershenzon und W. Boland, *Iridoid biosynthesis in Chrysomelina larvae: Fat body produces early terpenoid precursors*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007. **37**(3): p. 255-265.
23. Clarkson, J.M. und A.K. Charnley, *New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects*. Trends in Microbiology, 1996. **4**(5): p. 197-203.
24. Crowson, R.A. und R.A. Crowson, *The biology of the Coleoptera*. Academic Press (London, New York), 1981: p. i-xii, 1-802.
25. Curtis, R.F., Ballanti.Ja, E.B. Keverne, R.W. Bonsall und R.P. Michael, *Identification of Primate Sexual Pheromones and Properties of Synthetic Attractants*. Nature, 1971. **232**(5310): p. 396-&.
26. Dalozé, D. und J.M. Pasteels, *Production of Cardiac-Glycosides by Chrysomelid Beetles and Larvae*. Journal of Chemical Ecology, 1979. **5**(1): p. 63-77.
27. Dettner, K. und G. Schwinger, *Chemical Defense in the Larvae of the Leaf Beetle Goniocтена-Viminalis L (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Experientia, 1987. **43**(4): p. 458-460.

28. Devedjiev, Y., Z. Dauter, S.R. Kuznetsov, T.L.Z. Jones und Z.S. Derewenda, *Crystal structure of the human acyl protein thioesterase I from a single X-ray data set to 1.5 angstrom*. Structure, 2000. **8**(11): p. 1137-1146.
29. Ehrlich, P.R. und P.H. Raven, *Butterflies and plants - a study in coevolution*. Evolution, 1964. **18**(4): p. 586-608.
30. Ehrlich, P.R. und P.H. Raven, *Butterflies and plants*. Scientific American, 1967. **216**(6): p. 105-&.
31. Eisner, T., Vantasse.E und J.E. Carrel, *Defensive Use of a Fecal Shield by a Beetle Larva*. Science, 1967. **158**(3807): p. 1471-&.
32. Elbasyouni, S.Z., D. Chen, R.K. Ibrahim, A.C. Neish und G.H.N. Towers, *The Biosynthesis of Hydroxybenzoic Acids in Higher Plants*. Phytochemistry, 1964. **3**(4): p. 485-&.
33. Engler-Chaouat, H.S. und L.E. Gilbert, *De novo synthesis vs. sequestration: Negatively correlated metabolic traits and the evolution of host plant specialization in cyanogenic butterflies*. Journal of Chemical Ecology, 2007. **33**(1): p. 25-42.
34. Fatouros, N.E., M. Hilker und J. Gross, *Reproductive isolation between populations from Northern and Central Europe of the leaf beetle Chrysomela lapponica L.* Chemoecology, 2006. **16**(4): p. 241-251.
35. Feld, B.K., *Evolution der Wehrchemie von Blattkäferlarven: Glucosid-Analoga zur Aufklärung von Transportmechanismen*. Dissertation, 2001.
36. Feld, B.K., J.M. Pasteels und W. Boland, *Phaedon cochleariae and Gastrophysa viridula (Coleoptera : Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes de novo and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors*. Chemoecology, 2001. **11**(4): p. 191-198.
37. Ferguson, J.E. und R.L. Metcalf, *Cucurbitacins - Plant-Derived Defense Compounds for Diabroticites (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1985. **11**(3): p. 311-318.
38. Fulop, V., Z. Bocskei und L. Polgar, *Prolyl oligopeptidase: An unusual beta-propeller domain regulates proteolysis*. Cell, 1998. **94**(2): p. 161-170.
39. Fusetani, N. und K. Hashimoto, *Prostaglandin E-2 a Candidate for Causative Agent of Ogonori Poisoning*. Nippon Suisan Gakkaishi, 1984. **50**(3): p. 465-470.
40. Garb, G., *The eversible glands of a chrysomelid larva, Melasoma lapponica*. Journal of Entomology and Zoology, 1915. **7**: p. 87-97.
41. Ghangas, G.S. und J.C. Steffens, *Udp glucose-Fatty Acid Transglucosylation and Transacylation in Triacylglycerol Biosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(21): p. 9911-9915.
42. Ghangas, G.S. und J.C. Steffens, *1-O-Acyl-Beta-D-Glucoses as Fatty-Acid Donors in Transacylation Reactions*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995. **316**(1): p. 370-377.

43. Gillespie, J.P., A.M. Bailey, B. Cobb und A. Vilcinskas, *Fungi as elicitors of insect immune responses*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2000. **44**(2): p. 49-68.
44. Goffreda, J.C., M.A. Mutschler, D.A. Ave, W.M. Tingey und J.C. Steffens, *Aphid Deterrence by Glucose Esters in Glandular Trichome Exudate of the Wild Tomato, Lycopersicon-Pennellii*. Journal of Chemical Ecology, 1989. **15**(7): p. 2135-2147.
45. Gross, J., *Speciation in the leaf beetle Chrysomela lapponica L.: comparative studies in chemoeology, ethology and morphology of different stages of two allopatric populations*. Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin N F, 1997. **36**: p. 125-142.
46. Gross, J., N.E. Fatouros, S. Neuvonen und M. Hilker, *The role of competitors for Chrysomela lapponica, a north Eurasian willow pest, in pioneering a new host plant*. Journal of Pest Science, 2007. **80**(3): p. 139-143.
47. Gross, J. und M. Hilker, *Chemoeological studies of the exocrine glandular larval secretions of two chrysomelid species (Coleoptera): Phaedon cochleariae and Chrysomela lapponica*. Chemoecology, 1994. **5-6**(3-4): p. 185-189.
48. Gross, J. und M. Hilker, *Chemoeological studies of the exocrine glandular larval secretions of two chrysomelid species (Coleoptera): Phaedon cochleariae and Chrysomela lapponica*. Chemoecology, 1995. **5/6**(3/4): p. 185-189.
49. Gross, J., L. Podsiadlowski und M. Hilker, *Antimicrobial activity of exocrine glandular secretion of Chrysomela larvae*. Journal of Chemical Ecology, 2002. **28**(2): p. 317-331.
50. Gross, J., K. Schumacher, H. Schmidtberg und A. Vilcinskas, *Protected by fumigants: Beetle perfumes in antimicrobial defense*. Journal of Chemical Ecology, 2008. **34**(2): p. 179-188.
51. Guthke, R., J. Nuske, R. Schorcht, W. Fritsche und W.A. Knorre, *Dynamic-Model of Discontinuous and Continuous Phaseolotoxin Production of Pseudomonas-Syringae Pv Phaseolicola*. Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie, 1984. **24**(7): p. 427-435.
52. Hefetz, A. und M.S. Blum, *Biosynthesis of Formic-Acid by Poison Glands of Formicine Ants*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1978. **543**(4): p. 484-496.
53. Hertweck, C., A.P. Jarvis, L.K. Xiang, B.S. Moore und N.J. Oldham, *A mechanism of benzoic acid biosynthesis in plants and bacteria that mirrors fatty acid beta-oxidation*. Chembiochem, 2001. **2**(10): p. 784-786.
54. Hilker, M., *Egg deposition and protection of eggs in Chrysomelidae*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 263-276.
55. Hilker, M., D. Dalozze und J.M. Pasteels, *Cardenolide Glycosides from the Adults and Eggs of Chrysolina-Fuliginosa (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Experientia, 1992. **48**(10): p. 1023-1027.
56. Hilker, M., U. Eschbach und K. Dettner, *Occurrence of Anthraquinones in Eggs and Larvae of Several Galerucinae (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Naturwissenschaften, 1992. **79**(6): p. 271-274.

57. Hilker, M. und S. Schulz, *Anthraquinones in Different Developmental Stages of Galeruca-Tanaceti (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1991. **17**(11): p. 2323-2332.
58. Hilker, M. und S. Schulz, *Composition of Larval Secretion of Chrysomela-Lapponica (Coleoptera, Chrysomelidae) and Its Dependence on Host-Plant*. Journal of Chemical Ecology, 1994. **20**(5): p. 1075-1093.
59. Hinton, H.E., *On a little-known protective device of some Chrysomelid pupae (Coleoptera)*. Proceedings of the Royal Entomological Society of London (A), 1951. **26**: p. pp. 67-73.
60. Hinton, H.E. und H.E. Hinton, *Biology of insect eggs. 2<sup>nd</sup> Volume*, Pergamon Press (Oxford [Eng.], New York), 1981: p. i-xviii,475-778.
61. Holland, D.L., J. East, K.H. Gibson, E. Clayton und A. Oldfield, *Identification of the Hatching Factor of the Barnacle Balanus-Balanoides as the Novel Eicosanoid 10,11,12-Trihydroxy-5,8,14,17-Eicosatetraenoic Acid*. Prostaglandins, 1985. **29**(6): p. 1021-1029.
62. Hollande, A.C., *Contribution a l'etude du sang des Coleopteres*. Arch. zool. Paris ser. 5, 1909. **2**: p. (271-294).
63. Howard, D.F., M.S. Blum, T.H. Jones und D.W. Phillips, *Defensive Adaptations of Eggs and Adults of Gastrophysa-Cyanea (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1982. **8**(2): p. 453-462.
64. Ikawa, M., *Toxic and ecological effects of fatty acids on animals and microorganisms*. Pharmacological Effect of Lipids 3, 1989: p. 39-45.
65. Jolivet, P., *Une strategie originale: la defense en cercle des larves d'insectes*. Recherche (Paris), 1989. **20**: p. 804-806.
66. Jolivet, P., *Physiological colour changes in tortoise beetles*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 331-335.
67. Jolivet, P., J.A. Santiago-Blay, M. Schmitt, P. Jolivet, J.A. Santiago-Blay und M. Schmitt, *New developments in the biology of Chrysomelidae*. New developments in the biology of Chrysomelidae., 2004: p. i-xx, 1-804.
68. Jolivet, P., J. Vasconcellos-Neto und P. Weinstein, *Cycloalexyl: a new concept in the larval defense of insects*. Insecta Mundi, 1990. **4**(1-4): p. 133-142.
69. Kehl, T., *Sequenzierung und Klonierung von 1,2,3,6-Tetra-O-Galloylglucose-4-O-Galloyltransferase, des Schlüsselenzyms in der Biosynthese hydrolysierbarer Tannine*. Dissertation, Universität Ulm, 2007.
70. Koch, K., *Die Käfer Mitteleuropas: Ökologie. Band 3*. Spektrum Akademischer Verlag, 1992: p. 1-389.
71. Krebs, H.A., D. Wiggins, M. Stubbs, A. Sols und F. Bedoya, *Studies on the Mechanism of the Anti-Fungal Action of Benzoate*. Biochemical Journal, 1983. **214**(3): p. 657-663.



72. Kuai, J.P., G.S. Ghangas und J.C. Steffens, *Regulation of triacylglycerol fatty acid composition - Uridine diphosphate glucose fatty acid glucosyltransferases with overlapping chain-length specificity*. *Plant Physiology*, 1997. **115**(4): p. 1581-1587.
73. Kuhn, J., *Diversität der Wehrchemie von Blattkäferlarven: Sequestrierung und de novo Synthese als Aspekte der Evolution von Chrysomeliden*. Dissertation, Universität Jena, 2005.
74. Kuhn, J., E.M. Pettersson, B.K. Feld, A. Burse, A. Termonia, J.M. Pasteels und W. Boland, *Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(38): p. 13808-13813.
75. Kuhn, J., E.M. Pettersson, B.K. Feld, L.H. Nie, K. Tolzin-Banasch, S.M. M'Rabet, J. Pasteels und W. Boland, *Sequestration of plant-derived phenolglucosides by larvae of the leaf beetle Chrysomela lapponica: Thioglucosides as mechanistic probes*. *Journal of Chemical Ecology*, 2007. **33**(1): p. 5-24.
76. Kunert, M., A. Soe, S. Bartram, S. Discher, K. Tolzin-Banasch, L. Nie, A. David, J. Pasteels und W. Boland, *De novo biosynthesis versus sequestration: A network of transport systems supports in iridoid producing leaf beetle larvae both modes of defense*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008. **38**(10): p. 895-904.
77. Lambein, F., Y.H. Kuo und R. Vanparijs, *Isoxazolin-5-Ones Chemistry and Biology of a New Class of Plant Products*. *Heterocycles*, 1976. **4**(3): p. 567-593.
78. Lang, D.A., M.L.M. Mannesse, G.H. De Haas, H.M. Verheij und B.W. Dijkstra, *Structural basis of the chiral selectivity of Pseudomonas cepacia lipase*. *European Journal of Biochemistry*, 1998. **254**(2): p. 333-340.
79. Lauble, H., B. Miehlich, S. Forster, H. Wajant und F. Effenberger, *Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta in complex with acetone cyanohydrin*. *Protein Science*, 2001. **10**(5): p. 1015-1022.
80. Lawson, D.M., U. Derewenda, L. Serre, S. Ferri, R. Szittner, Y. Wei, E.A. Meighen und Z.S. Derewenda, *Structure of a Myristoyl-Acp-Specific Thioesterase from Vibrio Harveyi*. *Biochemistry*, 1994. **33**(32): p. 9382-9388.
81. Lee, H.I., J. Leon und I. Raskin, *Biosynthesis and Metabolism of Salicylic-Acid*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(10): p. 4076-4079.
82. Lengerken, H.v., *Die Brutfursorge-und Brutpflegeinstinkte der Kafer. 2nd edition*, Geest & Portig, 1954: p. 383 pp.
83. Leznicki, A.J. und R.S. Bandurski, *Enzymic-Synthesis of Indole-3-Acetyl-1-O-Beta-D-Glucose .I. Partial-Purification and Characterization of the Enzyme from Zea-Mays*. *Plant Physiology*, 1988. **88**(4): p. 1474-1480.
84. Li, A.X. und J.C. Steffens, *An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(12): p. 6902-6907.

85. Li, J., U. Derewenda, Z. Dauter, S. Smith und Z.S. Derewenda, *Crystal structure of the Escherichia coli thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme*. Nature Structural Biology, 2000. **7**(7): p. 555-559.
86. Liao, D.I. und S.J. Remington, *Structure of Wheat Serine Carboxypeptidase-Ii at 3.5-Å Resolution - a New Class of Serine Proteinase*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(12): p. 6528-6531.
87. Lorenz, M., W. Boland und K. Dettner, *Biosynthesis of Iridodials in the Defense Glands of Beetle Larvae (Chrysomelinae)*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1993. **32**(6): p. 912-914.
88. Machkour-M'Rabet, S., P. Mardulyn und J.M. Pasteels, *Genetic differentiation among European samples of the arctic-alpine leaf beetle, Chrysomela lapponica*. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 2008. **129**(2): p. 181-188.
89. Maklin, W., *Coleoptera insamlade under den Nordenskiöld'ska Expeditionen 1875 på nagra öar vid Norges Nordvestkust, på Novaja Semiya och on Waigatsch samt vid Jennissej i Sibirien*. Sv. Ak. Handl. (2), 1881. **xviii**(4): p. pp. 48.
90. Metcalf, R.L., *Chemical ecology of Diabroticites*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 153-169.
91. Michael, R.P., E.B. Keverne und R.W. Bonsall, *Pheromones - Isolation of Male Sex Attractants from a Female Primate*. Science, 1971. **172**(3986): p. 964-&.
92. Michalski, C., H. Mohagheghi, M. Nimtz, J. Pasteels und D. Ober, *Salicyl alcohol oxidase of the chemical defense secretion of two chrysomelid leaf beetles. Molecular and functional characterization of two new members of the glucose-methanol-choline oxidoreductase gene family*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19219-28.
93. Milkowski, C. und D. Strack, *Serine carboxypeptidase-like acyltransferases*. Phytochemistry, 2004. **65**(5): p. 517-524.
94. Mock, H.P. und D. Strack, *Energetics of the Uridine 5'-Diphosphoglucose - Hydroxy-Cinnamic Acid Acyl-Glucosyltransferase Reaction*. Phytochemistry, 1993. **32**(3): p. 575-579.
95. Murakoshi, I., F. Ikegami, F. Kato, J. Haginiwa, F. Lambein, L. Vanrompuy und R. Vanparijs, *Enzymatic-Synthesis of Isoxazolinone Glucoside by Extracts from Pisum and Lathyrus Seedlings*. Phytochemistry, 1975. **14**(5-6): p. 1269-1270.
96. Nardini, M., D.A. Lang, K. Liebeton, K.E. Jaeger und B.M. Dijkstra, *Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation - The prototype for family I.1 of bacterial lipases*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(40): p. 31219-31225.
97. Neal, J.J., W.M. Tingey und J.C. Steffens, *Sucrose Esters of Carboxylic-Acids in Glandular Trichomes of Solanum-Berthaultii Deter Settling and Probing by Green Peach Aphid*. Journal of Chemical Ecology, 1990. **16**(2): p. 487-497.
98. Oldham, N.J., M. Veith, W. Boland und K. Dettner, *Iridoid monoterpene biosynthesis in insects: Evidence for a de novo pathway occurring in the defensive glands of Phaeton armoraciae (Chrysomelidae) leaf beetle larvae*. Naturwissenschaften, 1996. **83**(10): p. 470-473.

99. Olmstead, K.L., *Waste products as chrysomelid defenses*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 311-318.
100. Parmentier, M., T. Inagami, R. Pochet, J.C. Desclin und J.L. Pasteels, *Presence of a Renin-Like Enzyme in Rat and Mouse Leydig-Cells*. Archives of Biology, 1985. **96**(2): p. 209-228.
101. Pasteels, J.M., J.C. Braekman und D. Daloze, *Chemical defense in the Chrysomelidae*. Series Entomologica (Dordrecht), 1988. **42**: p. 233-252.
102. Pasteels, J.M., J.C. Braekman, D. Daloze und R. Ottinger, *Chemical Defense in Chrysomelid Larvae and Adults*. Tetrahedron, 1982. **38**(13): p. 1891-1897.
103. Pasteels, J.M. und D. Daloze, *Cardiac-Glycosides in Defensive Secretion of Chrysomelid Beetles - Evidence for Their Production by Insects*. Science, 1977. **197**(4298): p. 70-72.
104. Pasteels, J.M., D. Daloze und M. Rowellrahier, *Chemical Defense in Chrysomelid Eggs and Neonate Larvae*. Physiological Entomology, 1986. **11**(1): p. 29-37.
105. Pasteels, J.M., S. Dobler, M. Rowellrahier, A. Ehmke und T. Hartmann, *Distribution of Autogenous and Host-Derived Chemical Defenses in Oreina Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1995. **21**(8): p. 1163-1179.
106. Pasteels, J.M., S. Duffey und M. Rowellrahier, *Toxins in Chrysomelid Beetles - Possible Evolutionary Sequence from Denovo Synthesis to Derivation from Food-Plant Chemicals*. Journal of Chemical Ecology, 1990. **16**(1): p. 211-222.
107. Pasteels, J.M., J.C. Gregoire und M. Rowell-Rahier, *The Chemical Ecology of Defense in Arthropods*. Mittler, T. E. (Ed.). Annual Review of Entomology, Vol. 28. Ix+520p. Annual Reviews, Inc.: Palo Alto, Calif., USA. Illus, 1983: p. P263-290.
108. Pasteels, J.M., J.C. Gregoire und M. Rowellrahier, *The Chemical Ecology of Defense in Arthropods*. Annual Review of Entomology, 1983. **28**: p. 263-289.
109. Pasteels, J.M., T. Hartmann, P. Jolivet, J.A. Santiago-Blay und M. Schmitt, *Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in Oreina and Platyphora leaf beetles: physiological, ecological and evolutionary aspects*. New developments in the biology of Chrysomelidae., 2004: p. 677-691.
110. Pasteels, J.M., M. Rowell-Rahier, J.-C. Braekman und D. Daloze, *Chemical defence of adult leaf beetles updated*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 289-301.
111. Pasteels, J.M., M. Rowellrahier, J.C. Braekman und D. Daloze, *Chemical Defenses in Leaf Beetles and Their Larvae - the Ecological, Evolutionary and Taxonomic Significance*. Biochemical Systematics and Ecology, 1984. **12**(4): p. 395-406.
112. Pasteels, J.M., M. Rowellrahier, J.C. Braekman und A. Dupont, *Salicin from Host Plant as Precursor of Salicylaldehyde in Defensive Secretion of Chrysomeline Larvae*. Physiological Entomology, 1983. **8**(3): p. 307-314.
113. Polis, G.A., *The Evolution and Dynamics of Intraspecific Predation*. Annual Review of Ecology and Systematics, 1981. **12**: p. 225-251.

114. Randoux, T., J.C. Braekman, D. Daloz und J.M. Pasteels, *Denovo Biosynthesis of Delta-3-Isoxazolin-5-One and 3-Nitropropanoic Acid-Derivatives in Chrysomela-Tremulae*. *Naturwissenschaften*, 1991. **78**(7): p. 313-314.
115. Ribnicky, D.M., V. Shulaev, M. Seskar und I. Raskin, *Benzaldehyde as an intermediate in salicylic acid biosynthesis in tobacco*. *Plant Physiology* (Rockville), 1997. **114**(3): p. 226.
116. Robinson, W.G., B.K. Bachhawat und M.J. Coon, *Tiglyl Coenzyme-a and Alpha-Methylacetoacetyl Coenzyme-a, Intermediates in the Enzymatic Degradation of Isoleucine*. *Journal of Biological Chemistry*, 1956. **218**(1): p. 391-407.
117. Rowellrahier, M. und J.M. Pasteels, *Economics of Chemical Defense in Chrysomelinae*. *Journal of Chemical Ecology*, 1986. **12**(5): p. 1189-1203.
118. Salkowski, E., *Berl Klin Wochenschr*, 1875. **12**: p. 197-298.
119. Schmid, H., *Biosynthesis of iridoids*. *Chimia*, 1968. **22**(7): p. 312-&.
120. Schulz, S., *Insect-plant interactions - Metabolism of plant compounds to pheromones and allomones by lepidoptera and leaf beetles*. *European Journal of Organic Chemistry*, 1998(1): p. 13-20.
121. Schulz, S., J. Gross und M. Hilker, *Origin of the defensive secretion of the leaf beetle Chrysomela lapponica*. *Tetrahedron*, 1997. **53**(27): p. 9203-9212.
122. Seligman, I.M. und F.A. Doy, *Beta Hydroxy Butyric-Acid in Defensive Secretion of Papilio-Aegeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1972. **42**(2B): p. 341-&.
123. Seligman, I.M. und F.A. Doy, *Biosynthesis of Defensive Secretions in Papilio-Aegeus*. *Insect Biochemistry*, 1973. **3**(10): p. 205-215.
124. Shepard, H.H., *The chemistry and action of insecticides*. New York-London: McGraw-Hill, 1951.
125. Silfverberg, H., *Chrysomelidae in the Arctic*. *Series Entomologica* (Dordrecht), 1994. **50**: p. 503-510.
126. Soe, A.R.B., S. Bartram, N. Gatto und W. Boland, *Are iridoids in leaf beetle larvae synthesized de novo or derived from plant precursors? A methodological approach*. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 2004. **40**(3): p. 175-180.
127. Stehle, F., W. Brandt, C. Milkowski und D. Strack, *Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism*. *Febs Letters*, 2006. **580**(27): p. 6366-6374.
128. Stehle, F., W. Brandt, J. Schmidt, C. Milkowski und D. Strack, *Activities of Arabidopsis sinapoylglucose : malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like acyltransferases*. *Phytochemistry*, 2008. **69**(9): p. 1826-1831.
129. Stehle, F., M.T. Stubbs, D. Strack und C. Milkowski, *Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism*. *Febs Journal*, 2008. **275**(4): p. 775-787.

130. Streefke, D.G., M.J.A. Bie und J.F. Vliegert, *Conformational Studies on Pertrimethyl-Silyl Derivatives of Some Monosaccharides and Disaccharides by 220 Mhz Pmr Spectroscopy*. Tetrahedron, 1973. **29**(6): p. 833-844.
131. Tabor, H., A.H. Mehler, O. Hayaishi und J. White, *Urocanic Acid as in Intermediate in the Enzymatic Conversion of Histidine to Glutamic and Formic Acids*. Federation Proceedings, 1952. **11**(1): p. 395-396.
132. Termonia, A., T.H. Hsiao, J.M. Pasteels und M.C. Milinkovitch, *Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(7): p. 3909-3914.
133. Vasconcellos-Neto, J. und P. Jolivet, *Une nouvelle strategie de defense: la strategie de defense annulaire (cycloalexie) chez quelques larves de chrysomelides bresiliens (Col.)*. Bulletin de la Societe Entomologique de France, 1988. **92**(9-10): p. 291-299.
134. Vasconcellos-Neto, J. und P. Jolivet, *Cycloalexia among chrysomelid larvae*. Series Entomologica (Dordrecht), 1994. **50**: p. 303-309.
135. Veith, M., M. Lorenz, W. Boland, H. Simon und K. Dettner, *Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects: defensive secretions from larvae of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Tetrahedron, 1994. **50**(23): p. 6859-6874.
136. Veith, M., N.J. Oldham, K. Dettner, J.M. Pasteels und W. Boland, *Biosynthesis of defensive allomones in leaf beetle larvae: Stereochemistry of salicylalcohol oxidation in Phratora vitellinae and comparison of enzyme substrate and stereospecificity with alcohol oxidases from several iridoid producing leaf beetles*. Journal of Chemical Ecology, 1997. **23**(2): p. 429-443.
137. Vencl, F.V., N.E. Gomez, K. Ploss und W. Boland, *The chlorophyll catabolite, pheophorbide a, confers predation resistance in a larval tortoise beetle shield defense*. Journal of Chemical Ecology, 2009. **35**(3): p. 281-8.
138. von Meyer, E. und H. Kolbe, *Ueber die antiseptischen Wirkungen der Salicylsäure und Benzoessäure in Bierwürze und Harn*. Journal für Praktische Chemie, 1875. **12**: p. 178-203.
139. Wajant, H., K.W. Mundry und K. Pfizenmaier, *Molecular-Cloning of Hydroxynitrile Lyase from Sorghum-Bicolor (L) - Homologies to Serine Carboxypeptidases*. Plant Molecular Biology, 1994. **26**(2): p. 735-746.
140. Wallace, J.B. und M.S. Blum, *Refined Defensive Mechanisms in Chrysomela Scripta*. Annals of the Entomological Society of America, 1969. **62**(3): p. 503-&.
141. Walters, D.S. und J.C. Steffens, *Branched-Chain Amino-Acid-Metabolism in the Biosynthesis of Lycopersicon-Pennellii Glucose Esters*. Plant Physiology, 1990. **93**(4): p. 1544-1551.
142. Warth, A.D., *Mechanism of Resistance of Saccharomyces-Bailii to Benzoic, Sorbic and Other Weak Acids Used as Food Preservatives*. Journal of Applied Bacteriology, 1977. **43**(2): p. 215-230.

143. Warth, A.D. und K.W. Nickerson, *Effect of Benzoic-Acid on Glycolytic Metabolite Levels and Intracellular Ph in Saccharomyces-Cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**(12): p. 3415-3417.
144. Willinger, G. und S. Dobler, *Selective sequestration of iridoid glycosides from their host plants in Longitarsus flea beetles*. Biochemical Systematics and Ecology, 2001. **29**(4): p. 335-346.
145. Winkler, F.K., A. Darcy und W. Hunziker, *Structure of Human Pancreatic Lipase*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 771-774.
146. Woudenbergvannoosterom, M., C. Vitry, J.M.A. Baas, F. Vanrantwijk und R.A. Sheldon, *The Regioselectivity of the Lipase-Catalyzed Acylation of 1,6-Anhydro-Beta-D-Glycopyranoses*. Journal of Carbohydrate Chemistry, 1995. **14**(2): p. 237-246.
147. Zvereva, E.L. und N.E. Rank, *Fly parasitoid Megaselia opacicornis uses defensive secretions of the leaf beetle Chrysomela lapponica to locate its host*. Oecologia, 2004. **140**(3): p. 516-522.



## 7 Anhang

---

### 7.1 Veröffentlichungen

#### Artikel in Fachzeitschriften:

Discher S; Burse A, Tolzin-Banasch K, Heinemann SH, Pasteels JM, Boland W (2009): **A versatile transport network for sequestering and excreting plant glycosides in leaf beetles provides an evolutionary flexible defense strategy.** ChemBioChem, provisionally accepted

Kunert M; Söe ARB; Bartram S; Pasteels JM; Discher S; Tolzin-Banasch K; Nie L; David A; Boland W (2008): **De novo biosynthesis versus sequestration: a network of transport systems in leaf beetle larvae supports both modes for the production of iridoid defenses.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 38, 895-904

Kuhn J; Pettersson EM; Feld B; Nie L; Tolzin-Banasch K; M'Rabet SM; Pasteels JM; Boland W (2007): **Sequestration of plant-derived phenolglucosides by larvae of the leaf beetle *Chrysomela lapponica*: Thioglucosides as mechanistic probes.** Journal of Chemical Ecology 33, 5-24

#### Artikel in Vorbereitung:

Tolzin-Banasch K; Kirsch R; Pasteels JM; Boland W: 1-O-Acyl- $\beta$ -D-glucoses as acyl donors in transacylation reactions of *Chrysomela lapponica* larvae

Tolzin-Banasch K; Boland W: Identification and quantification of defensive substances in the secretion of *Chrysomela lapponica*

Tolzin-Banasch K; Boland W: Distribution of glucose and glucose esters among chrysomeline larval secretions

Tolzin-Banasch K; Boland W: Synthesis of thioglucoside esters

Ausgewählte Vorträge und Poster:

- 25.09.2008            Institutssymposium, MPI für chemische Ökologie, Jena, Deutschland (Vortrag)  
“1-*O*- $\beta$ -D-Acylglucoses as acyl donors for acyltransferases in larvae of *Chrysomela lapponica*”  
K. Tolzin-Banasch, R. Kirsch, W. Boland
- 23.01.2008            Scientific advisory board meeting 2008, MPI für chemische Ökologie, Jena, Deutschland (Poster)  
“Acylation of plant-derived alcohols in the defensive system of *Chrysomela lapponica*”  
K. Tolzin-Banasch, R. Kirsch, W. Boland
- 24.07.2007            23. Symposium der International Society of Chemical Ecology, Jena, Deutschland (Poster)  
“Autogenous synthesis of defensive compounds in *Chrysomela lapponica* from Kazakhstan”  
K. Tolzin-Banasch, S. Bartram Stefan, W. Boland
- 20.04.2007            Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie, Leipzig, Deutschland (Vortrag)  
“Chemical defense in the leaf beetle *Chrysomela lapponica* – a unique biosynthetic pathway”  
K. Tolzin-Banasch, R. Kirsch, W. Boland
- 23.02.2006            18. Irseer Naturstofftage, Kaufbeuren, Deutschland (Vortrag und Poster)  
“Localization of Iridoid Biosynthesis in *Chrysomelina* Larvae”  
K. Tolzin, A. Burse, S. Frick, A. Schmidt, W. Boland



## 7.2 Daten

Die Daten zu den Fütterungsexperimenten, den Aminosäuremessungen in den Wirtspflanzen, den Wirtspflanzenwechselstudien und den Fütterungsstudien mit isotopenmarkierten Aminosäuren finden sich auf der beigefügten CD. Sie können mit Microsoft Excel 2003 oder höher betrachtet werden.

### 7.3 Danksagung

Prof. Dr. Wilhelm Boland hat es mir ermöglicht, am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie mit seinen ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten promovieren zu dürfen. Nicht nur deshalb, sondern auch für sein stetes Interesse an Blattkäfern, an neuen Ergebnissen und seiner Expertise bei experimentellen Problemen möchte ich mich von ganzem Herzen bei ihm bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rainer Beckert möchte ich ganz besonders dafür danken, dass er die Betreuung dieser Arbeit übernahm und mir somit die Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena ermöglichte.

Prof. Dr. Jacques M. Pasteels gebührt mein aufrichtiger Dank, da ihm kein Weg zu weit war, auch die seltensten Käfer an den entlegensten Orten dieser Welt ausfindig zu machen. Zudem beleuchtete er stets die Ergebnisse dieser Arbeit aus der Sicht eines Biologen, was zu außerordentlich interessanten und fruchtbaren Diskussionen führte.

Dr. Stefan Bartram, Dr. Michael Reichelt, Anja David und Ulrike Sammer danke ich für die Hilfe bei den GC-C-IRMS-Messungen, der Aminosäureanalytik, den Synthesen der 6-*O*-Acylzucker und den mikrobiologischen Tests.

Prof. Dr. Wilhelm Boland, Prof. Dr. Jacques M. Pasteels, Kerstin Ploss, Dr. Maritta Kunert, Roy Kirsch, Dr. Antje Burse und Dr. Jiri Svoboda danke ich für die angenehme Gesellschaft und den unermüdlichen Einsatz bei den beiden Kasachstan-Reisen 2006 und 2008 und sonstigen Expeditionen nach Tschechien und Südfrankreich.

Angelika Berg gebührt mein Dank, weil sie sich immer hingebungsvoll um Käfer und Larven gekümmert hat.

Sybille Lorenz, Dr. Aleš Svatoš und Dr. Renate Ellinger möchte ich für die Hilfe bei den NMR-Messungen sowie den HRMS-Messungen danken.

Mit Sabrina Discher, Sindy Frick, Dr. Matthias Funke, Dr. Mareike Richter, Kerstin Ploss, Dr. Antje Burse, Magdalena Stock, Yamuna Sahadevan und Dr. Jiri Svoboda waren die Tage im Büro und im Labor stets unterhaltsam, produktiv und auch die sportliche Komponente hat nicht gefehlt.

Dr. Jiri Svoboda, Dr. Axel Mithöfer, Dr. Antje Burse, Dr. Maritta Kunert, Ulrike Sammer und Michael Banasch möchte ich meinen Dank aussprechen, da sie wertvolle Tipps zum Anfertigen und der Korrektur dieser Arbeit gegeben haben.

Der gesamten Bioorganik-Abteilung sei für das freundliche Arbeitsklima und viele hilfreiche wissenschaftliche Tipps und Anregungen gedankt.

Meiner Familie und besonders Michael Banasch und Julian möchte ich für den Rückhalt und viele bereichernde Momente danken.

## 7.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt und eine Leerseite eingefügt.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt und eine Leerseite eingefügt.

### **7.5 Selbständigkeitserklärung**

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

Jena, den 08.06.2009

.....

Karla Tolzin-Banasch