

## Signalstoffe und ihre Reception im Sexualcyclus mariner Braunalgen

Von Lothar Jaenicke\* und Wilhelm Boland

*Professor Hermann Schildknecht zum 60. Geburtstag gewidmet*

Lockung und Schreck sind Antworten auf chemische Reize, die bereits von einzelligen Organismen ohne morphologisch abgegrenztes Nervensystem wahrgenommen und verarbeitet werden. Chemische Substanzen lösen Ereignisketten aus, die bei membrangebundenen Signalreceptoren beginnen und über regulierende und modulierende Glieder schließlich die Steuerung motorischer Erfolgsorgane bewirken. Untereinheiten dieser Receptoren werden durch die bindenden Signalstoffe in gegenseitiger Abhängigkeit konformativ verändert, chemisch modifiziert und in ihrer molekularen Aktivität beeinflusst. Dieses Wechselspiel führt, zusammen mit der eigentümlichen Motorik, zu einem zielgerichteten physiologischen Verhalten, durch das die begeißelten Geschlechtszellen (Gameten) mariner Braunalgen schließlich ihren Partner finden können. Die einfachen, aber jeweils hochspezifischen Systeme der Braunalgengameten wurden strukturell aufgeklärt und in ihrer biologischen Wirkung analysiert. Bei den Signalstoffen handelt es sich überwiegend um Monocyclen mit ungesättigten Seitenketten (Summenformel z. B.  $C_{11}H_{14}$ ,  $C_{11}H_{16}$ ,  $C_{11}H_{18}$ ). Diese Systeme erleichtern als Modelle das Verständnis der komplexen Ganglienschaltungen bei höheren Lebewesen, in denen die Sinnesorgane über Nervenbahnen dem Zentralnervensystem Nachrichten aus der Umwelt übermitteln, die dort verarbeitet und, über ableitende Bahnen, durch den Bewegungsapparat beantwortet werden.

### 1. Einleitung

Kommunikation durch chemische Signale ist entwicklungsgeschichtlich sehr alt. Bereits bei Bakterien sind Signalaufnahme und -verarbeitung für das Finden geeigneter Lebensräume ausgebildet und biochemisch recht eingehend untersucht<sup>[1]</sup>. Ciliaten bereiten die Kopulation durch ein chemisches Nachrichtensystem vor, dessen Bestandteile, wenn auch nicht die Wirkungsweise, bekannt sind<sup>[2]</sup>. Außerordentlich eindrucksvoll ist die Empfindlichkeit der

Pheromonsysteme von Insekten, die durch die klassischen Arbeiten von *Butenandt* et al. am Seidenspinner eingeleitet wurden und seitdem die Chemiker und Sinnesphysiologen beschäftigen<sup>[3]</sup>. An diesen Objekten sind dadurch tiefe Einblicke in die Wirkungsweise von Signalen auf dem Übermittlungswege von der Nervenzelle zum Zentralnervensystem ermöglicht worden. Die Wirbeltiere stehen in dieser Hinsicht den Insekten nicht nach. Erinnert sei an die unerhörte Empfindlichkeit der Riechorgane mancher Fische, an den Spürsinn der Hunde und anderes aus dem Repertoire von Naturbeobachtern und Jägern. Man hatte sich damit abgefunden, solche Signalketten vor allem bei sich bewegenden Organismen zu erwarten, die zur Suche von

[\*] Prof. Dr. L. Jaenicke, Dr. W. Boland  
Institut für Biochemie der Universität  
An der Bottmühle 2, D-5000 Köln 1

Nahrung oder Geschlechtspartnern, zur Brutpflege oder zum Schutz bestimmter Direktiven bedürfen. Es ist auch einzusehen, wenn Signale innerhalb eines Organismus der Regulation des Stoffwechsels oder der Organfunktionen dienen, wie sie durch Hormone der ersten oder der zweiten Art gegeben werden. Hier liegt eines der am aktivsten bearbeiteten und zukunftsreichsten Gebiete der chemischen Lebenswissenschaften.

## 2. Chemotaxis bei Pflanzen

Bei Pflanzen, die an einem Standort verwurzelt sind, waren solche Übermittlungsketten von Reizen und Nachrichten nicht ohne weiteres zu erwarten. Dennoch haben bereits Beobachtungen, die über hundert Jahre zurückliegen, sehr deutlich gemacht, daß – mindestens bei niederen Pflanzen – stoffliche Kommunikation zwischen Individuen besteht<sup>[4]</sup>. Dies verwundert eigentlich nicht, denn im Generationscyclus dieser Thallophyten treten chemotaktische Vorgänge, ja sogar bewegliche Gameten, auf. Einige Beispiele aus dem Bereich der Pilze haben das breite Spektrum solcher Signalstoffe gezeigt: *Mucorales* haben im Trisporsäuresystem, *Achlya* im Antheridol/Oogoniol-Kreis, *Allomyces* im Sirenin Kommunikationsketten entwickelt, die der Bildung und dem Finden der Geschlechtspartner dienen. Alle diese Substanzen sind Terpenoide, die *Achlya*-Stoffe sogar Steroide, so daß eine interessante Ähnlichkeit mit den Geschlechtshormonen der Säugetiere besteht<sup>[5]</sup>.

Die Braunalgen oder Seetange (Fig. 1) kommen weitverbreitet in allen Weltmeeren und im Schelfgebiet vor. Sie sind zum Teil technisch wichtig als Lieferanten von Polysacchariden (Alginsäure, Agar-Agar etc.), zum Teil dienen sie auch der menschlichen Ernährung, wie jeder Japan-Reisende erfährt. Der ölige Extrakt pazifischer Tange (*Dictyopteris*, siehe Tabelle 1) wurde auf Hawaii als Senf-Ersatz benutzt<sup>[6]</sup>. Für den Biologen sind die Formenmannigfaltigkeit und die verschiedenartigen Wege interessant, die von der Natur eingeschlagen werden, um diese Meeresflora zu erhalten und zu verbreiten. Neben schlichten vegetativen Cyclen über Schwärmsporen bildende Sporophyten gibt es mehrere Arten der geschlechtlichen Fortpflanzung, wenn ihr auch ein unterschiedliches Gewicht im Überlebenskreislauf zukommt. Einige Formen müssen regelmäßig einen Generationswechsel durchlaufen; für andere erhöhen sich durch generative Fortpflanzung lediglich die Chancen, unter Streßbedingungen auszuharren und sich zu adaptieren. In allen Fällen aber werden Geschlechtspflanzen, Gametophyten, ausgebildet, die ihrerseits die Geschlechtszellen hervorbringen. Diese sind gegensinniger Polarität. Man spricht von plus- und minus-Gameten oder von Isogamie, wenn sie sich morphologisch nicht unterscheiden; von Gyno- und Androgameten oder Anisogamie, wenn die Geschlechtszellen beider Formen beweglich sind, sich aber durch die Größe unterscheiden (wobei der größere, galanterweise, als Gynogamet, der kleinere als Androgamet bezeichnet wird); schließlich von Oogamie, wenn unbewegliche große Eizellen und bewegliche, sehr viel kleinere Spermatozoiden ausgebildet werden. In dieser Form wird die höchste Entwicklungsstufe gesehen, und bei ihr, nämlich beim Sägetang (*Fucus serratus*) und seinem nahen Ver-

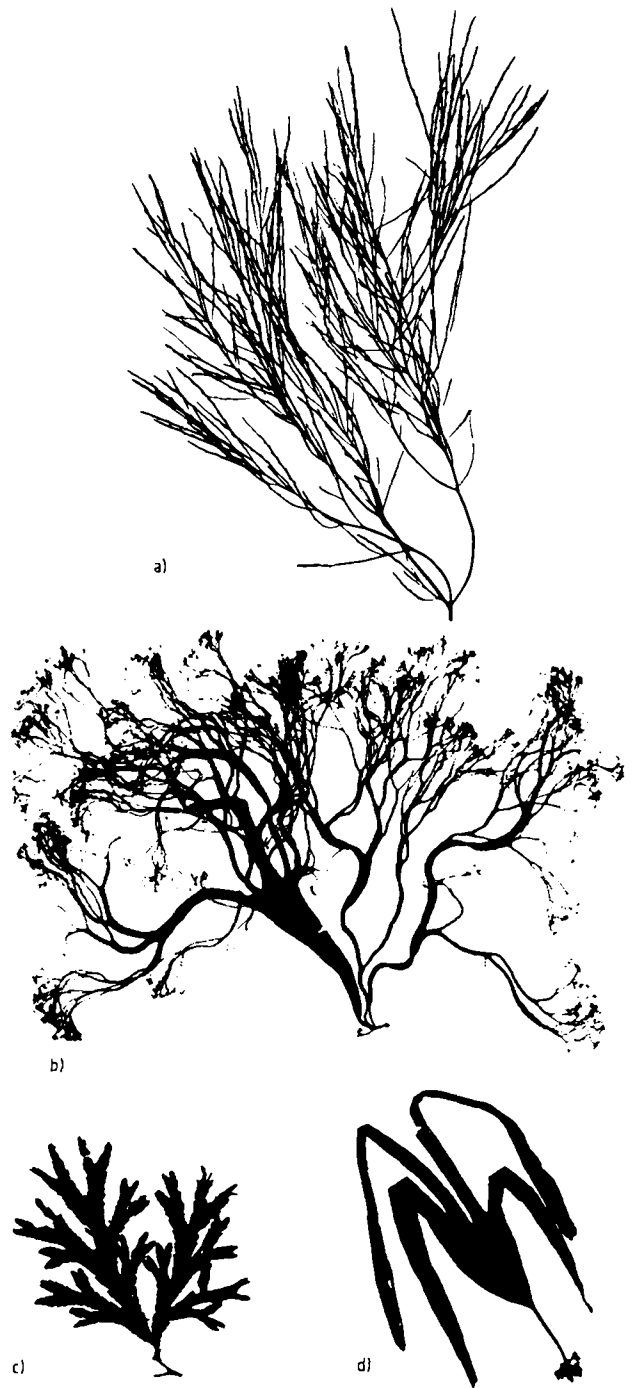


Fig. 1. „Porträts“ einiger Braunalgen: a) *Desmarestia aculeata*, b) *Cutleria multifida* (beide ca. 30% der natürlichen Größe), c) *Fucus serratus*, d) *Laminaria digitata* (beide ca. 15% der natürlichen Größe) (Aufnahme: Prof. D. G. Müller, Universität Konstanz).

wandten, dem Blasentang (*Fucus vesiculosus*), wurde zuerst der Verdacht geäußert, daß die männlichen Geschlechtszellen zu den weiblichen Eiern durch ein Signal gesteuert werden, das diffusibel ist<sup>[7]</sup>. Etwa hundert Jahre später wurde dies bestätigt<sup>[8]</sup>.

### 2.1. Laboratoriumskultur und Pheromonisolierung

Es ist einzusehen, daß sich mit den oft sehr großen Arten der Ozeane im Laboratorium nur schlecht arbeiten läßt: Der 100 m lang werdende Riesenkelp (*Macrocystis pyrifera*) oder die bis zu 5 m messenden *Laminaria*-Arten un-

serer Gewässer, ja auch noch der metergroße *Fucus* sind nur für Freilandstudien und Meeresstationen geeignete Objekte. Für Landratten annehmlicher sind die auf Laboratoriumsmaßstäbe adaptierbaren mediterranen Formen wie die Felsenfaseralge *Ectocarpus siliculosus* oder die durch einen merkwürdigen Generationswechsel ausgezeichnete *Cutleria multifida*: Das Ergebnis der Verschmelzung ihres Gynogameten mit einem Androgameten ist eine Zygote, aus der sich eine kleine, kriechende Vorform (*Aglaozonia*) entwickelt, deren Sporen erst wieder zum spanngroßen Tang auswachsen, auf dem dann wieder Sporangien oder Gametangien gebildet werden.

Im Zusammenhang mit (nicht bestätigten) Hypothesen über „relative Sexualität“<sup>[9]</sup> ist die Alge *Ectocarpus siliculosus* ein beliebtes und nicht schwer zu handhabendes Forschungsobjekt geworden. An ihr wurden auch eingehend die jahreszeitliche Rhythmik sowie die Abhängigkeit der Sexualvorgänge von Außenparametern untersucht<sup>[10]</sup>. Gametangien werden vor allem bei sich verschlechternden Umweltbedingungen angelegt; die Gametenfreisetzung hängt von der Tageszeit ab, kann aber auch durch Temperaturveränderungen induziert werden. *Ectocarpus* ist eine zweihäusige, morphologisch isogame Form, deren Gameten aber unterschiedliches Verhalten zeigen (physiologische Anisogamie). Beim Öffnen von Petrischalen, die reife +-(Gyno)gameten enthalten, beobachtet man einen feinen aromatischen Duft, den männliche Kulturen nicht abgeben. Der Duftstoff ist lipophil, in organischen Solventien löslich, kondensierbar bei niedriger Temperatur, kann an Kohle adsorbiert und durch Erhitzen desorbiert werden, d. h. er ist stabil und niedermolekular. Werden Vaseline- oder Öltröpfchen, die den Duftstoff aus der Atmosphäre über reifen Gynogametensuspensionen aufgenommen haben, suspendierten Androgameten angeboten, sammeln sie sich um diesen Köder. Dies ist die Grundlage eines brauchbaren biologischen Tests, um die Isolierung des Lockstoffs zu verfolgen. Die Eigenschaften des Duftstoffes machen die Gaschromatographie in ihren einfacheren oder verfeinerten Formen ideal für die Reinigung, während Kernresonanz- und Massenspektrometrie für die Strukturermittlung der isolierten Verbindungen und ihrer Hydrierungsprodukte herangezogen wurden. Im Lauf der etwa zehn Jahre dauernden Untersuchungen über flüchtige und ins umgebende Seewasser abgegebene Wirkstoffe von Braunalgengameten wurden die Sammel- und Aufbereitungsverfahren stets verfeinert und verbessert. Vor allem wurde anstelle des ursprünglichen Abblasens und Ausfrierens<sup>[11]</sup> die Adsorption an Aktivkohle im geschlossenen Kreislauf nach Grob und Zürcher<sup>[12]</sup> von Gassmann<sup>[13]</sup> auf die untersuchten Probleme adaptiert. Dazu muß das Verfahren wegen der sehr geringen Mengen an flüchtiger Substanz miniaturisiert werden<sup>[\*]</sup>. Die durch eine Gametensuspension perlende Luft wird durch das Kohlefilter zirkuliert, das man von Zeit zu Zeit mit Dichlormethan extrahiert. Die aufgefundenen Substanzen werden durch kombinierte GC/MS analysiert.

Als Beispiel soll hier die Aufarbeitung der Wirkstoffe von *Desmarestia* angegeben werden<sup>[15]</sup>. Diese Braunalge

bildet große vegetative Pflanzen und kleine, nur einige Zellen umfassende Gametophyten, in deren Gametangien die weiblichen Gameten ein Bouquet von drei Substanzen (1–3) abgeben. Desmaresten 1 ist nicht nur Lockstoff, sondern bewirkt zugleich durch einen noch unbekannten, vermutlich enzymaktivierenden Mechanismus, daß die Gametangienkappe quillt und sich der im Gametangium enthaltene Spermatozoid augenblicklich frei macht. Analog wirken auch die Stoffe, die von *Laminaria*<sup>[14]</sup> und *Chordatomentosa*-Gynogameten<sup>[16]</sup> abgegeben werden. Die beiden anderen Inhaltsstoffe, Viridien 3 und Ectocarpin 2, sind jeweils eine Art- und Gattungsspezifische Substanz, hier ohne biologische Aktivität. Wesentlich für eine erfolgreiche Isolierung ist, Gameten genau zum Zeitpunkt der Pheromonproduktion zu verwenden. So geben reife weibliche Gameten von *Desmarestia* das chromatographische Profil (B) mit den deutlichen Peaks der drei C<sub>11</sub>-Kohlenwasserstoffe, die im Muster der unreifen Gameten (A) nicht auftreten<sup>[15]</sup> (Fig. 2).

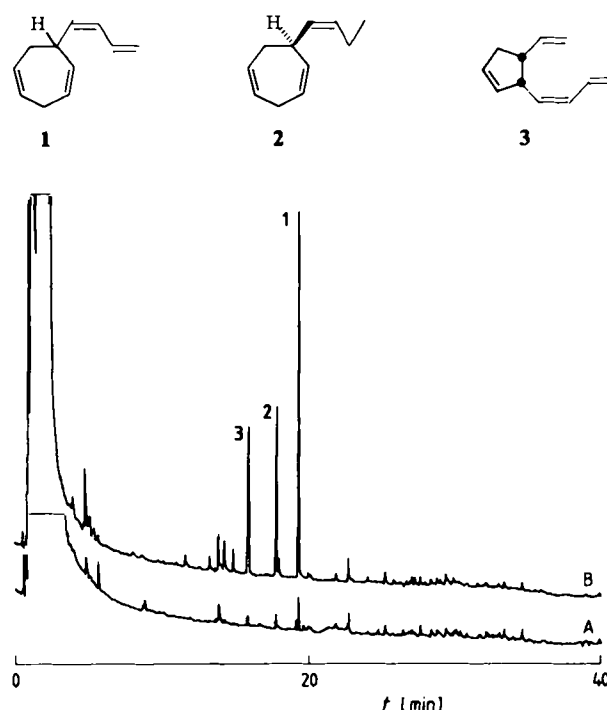


Fig. 2. Kapillar-Gaschromatogramm von *Desmarestia-viridis*-Gametophyten. Eine signifikante Pheromonproduktion ist erst nach Freisetzung der Gynogameten zu verzeichnen (B). Vor diesem Zeitpunkt ergeben Blindläufe (A) indifferente Muster ohne erkennbare Hauptprodukte. Alle Strukturen wurden jeweils durch Synthese [32], Co-Chromatographie mit authentischen Substanzen und quantitativen Bioassay bewiesen [15].

Mit diesen Methodiken wurden die „Sirenine“ von bisher acht Braunalgenspezies verschiedener entwicklungsgehistorischer Stufen isoliert und strukturell aufgeklärt. Die Bestätigung der zumeist nur auf wenigen Informationen beruhenden Strukturen erfolgte in allen Fällen durch Synthesen, deren Strategie nach Möglichkeit so angelegt war, daß sie zugleich zur Herstellung von Homologen und Analogen benutzt werden können.

## 2.2. Algenspezies und ihre Signalstoffe

Reife Gynogameten von *Ectocarpus* aus über 1000 Kulturschalen wurden durch ihre Phototaxis erkannt und ge-

[\*] Um einen Anhaltspunkt zu geben: Ein Gynogamet von *Laminaria* produziert je min 10 000 Moleküle des spezifischen Hormons, dazu 15 000 Moleküle Ectocarpin und 30 000 Moleküle *n*-Pentadecan [14].












sammelt; von dieser Suspension konnten durch das Abblasverfahren 7 mg des Pheromons erhalten werden. Die Struktur von Ectocarpen 2 ergab sich aus massenspektroskopischen und NMR-spektroskopischen Daten als 6-(1Z-Butenyl)-1,4-cycloheptadien,  $C_{11}H_{16}$ <sup>[17]</sup>. Das Naturprodukt ist rechtsdrehend ( $[\alpha]_{578}^{22.5}$  82 (2.5%,  $CH_2Cl_2$ )); die durch Dimid-Reduktion der Seitenkette und Ozonolyse des resultierenden 6-Butyl-1,4-cycloheptadiens erhaltene (R)-2-Butyl-bernsteinsäure erweist, daß Ectocarpen (S)-(+)-6-(1Z-Butenyl)-1,4-cycloheptadien ist.

Ectocarpen ist auch das wesentliche Prinzip der dioecischen Meeresalge *Sphacelaria furcigera*<sup>[16]</sup>, während es in allen anderen iso- und anisogamen Formen der Phaeophycidae<sup>[7]</sup> als Begleitstoff innerhalb des Gesamtbouquets erscheint. Es mag sich dabei um ein entwicklungsgeschichtliches Relikt, ein chemotaxonomisches Leitmotiv oder auch – in einzelnen Fällen, in denen das Habitat gleich ist – um eine Form von chemischer Kampfstrategie um den Lebensraum und ein Abdrängen von konkurrierenden Nachbarn handeln. Dies leuchtet besonders dann ein, wenn anisogame Formen vorliegen, die naturgemäß eine geringere Zahl befruchtungsfähiger Weibchen einbringen. In diesem Fall haben die Zygoten zwar eine bessere Startausstattung, die Wahrscheinlichkeit der Befruchtung ist aber geringer. Werden nun die Chancen der isogamen Formen – etwa gleiche Anzahl von plus- und minus-Gameten – durch Weglocken eines Teiles der minus-Gameten vermindert, steigen entsprechend diejenigen der höheren Form. Diese Mimikry ist natürlich nur bei Formen vorteilhaft, die im gleichen Lebensraum siedeln; sie steht allerdings insofern auf etwas schwachen Füßen, als gerade die primitiven Spezies keineswegs auf sexuelle Fortpflanzung über Zygotenbildung angewiesen sind, sondern nur unter sich verschlechternden Milieubedingungen darauf ausweichen.

*Ectocarpus* ist eine ursprüngliche, isogame Form. *Cutleria multifida* hat bereits Anisogamie entwickelt, während die nahe verwandten Laminariales oogam sind. *Dictyota* bildet unizelluläre Oogonien, aber noch multizelluläre Antheridien, *Laminaria* Oogonien und Antheridien, die jeweils nur einen Gameten enthalten. In allen diesen Phaeophycidae wurden Pheromonmischungen nachgewiesen, die sich von  $C_{11}$ -Kohlenwasserstoffen ableiten (vgl. Tabelle 1). In *Cutleria* sind es neben Ectocarpen 2 (5%) das als Gametenlockstoff unwirksame Aucanten 6 (27%) und das biologisch aktive Multifiden 7 (68%)<sup>[19]</sup>. Auch in *Chorda-tomentosa*-Extrakten findet sich Multifiden (85%) neben Ectocarpen (8%), 6-Butyl-1,4-cycloheptadien 4 und zwei weiteren Produkten (5%) zu einem Gesamtbouquet vereinigt<sup>[16]</sup>. 4 ist auch das Hauptprodukt von *Dictyota*-Eiern und veranlaßt in höheren Konzentrationen massive Attraktion der entsprechenden Androgameten<sup>[20]</sup>. Stärker ungesättigte Derivate der genannten  $C_{11}$ -Polyene sind in Gynogameten der Gattung *Desmarestia aculeata* und *Desmarestia viridis* enthalten (vgl. Fig. 2), nämlich der Wirkstoff Desmaresten 1 (60%) und der Kohlenwasserstoff Viridien 3 (20%), daneben 20% Ectocarpen 2, wie es für diese Subklasse üblich ist<sup>[15]</sup>.

[\*] Die Klasse der Braunalgen (Phaeophyceae) wird eingeteilt in zwei Unterklassen: 1. die Ordnungs- und Arten-reichen Phaeophycidae mit typischem Generationswechsel zwischen diplonten Sporophyten und haplonten Gametophyten; 2. die Cyclosporidae, reine Diplonten ohne Generationswechsel (Ordnungen: Fucales und Durvillaeales) [18].

Tabelle 1. Inhalts- und Signalstoffe von Braunalgen. Ein Sternchen bei den Spezies bedeutet, daß die Substanzen als Androgameten-wirksamer Lockstoff erwiesen sind.

Formel	Name	Spezies
	Ectocarpen $C_{11}H_{16}$ 2	<i>Ectocarpus siliculosus</i> * [17], <i>Sphacelaria furcigera</i> [16], alle Phaeophycidae mit Ausnahme von <i>Dictyota dichotoma</i> und <i>Spermatocchnus paradoxus</i>
	Dictyopteren C' $C_{11}H_{18}$ 4	<i>Dictyota dichotoma</i> * [20], <i>Dictyopteris australis</i> und <i>Dictyopteris plagiogramma</i> [21]
	Desmaresten $C_{11}H_{14}$ 1	<i>Desmarestia aculeata</i> * und <i>Desmarestia viridis</i> * [15]
	$C_{11}H_{14}O$ 5	<i>Laminaria digitata</i> * und <i>Laminaria hyperborea</i> * [12]
	Aucanten $C_{11}H_{16}$ 6	<i>Cutleria multifida</i> [19]
	Multifiden $C_{11}H_{16}$ 7	<i>Cutleria multifida</i> * [19] <i>Chorda tomentosa</i>
	Viridien $C_{11}H_{14}$ 3	<i>Desmarestia aculeata</i> und <i>Desmarestia viridis</i> * [15]
	Dictyopteren B $C_{11}H_{16}$ 8	<i>Dictyopteris australis</i> und <i>Dictyopteris plagiogramma</i> [21]
	Dictyopteren A $C_{11}H_{18}$ 9	<i>Dictyopteris australis</i> und <i>Dictyopteris plagiogramma</i> [21]
	1, 3E, 5Z, 8Z- Undecatetraen $C_{11}H_{16}$ 10	<i>Spermatocchnus paradoxus</i> * [23], <i>Dictyopteris australis</i> und <i>Dictyopteris plagiogramma</i> [21]
	Fucoserraten $C_8H_{12}$ 11	<i>Fucus serratus</i> * [24] und <i>Fucus vesiculosus</i> * [25]

In *Laminaria digitata* und *L. hyperborea* wurde ein sich vermutlich vom Desmaresten ableitendes Ectocarpen-Derivat mit einer Sauerstoff-Funktion in der Seitenkette identifiziert, das zugleich Schlüpf- und Lockfunktion für die Androgameten hat<sup>[14]</sup>. Jedoch ist die Struktur bisher – wegen der überaus geringen Mengen, die produziert und im Laboratorium isoliert werden können – unbekannt. Die angegebene Formel 5 ist ein plausibler, durch einige Syntheseversuche gestützter Vorschlag<sup>[16]</sup>.

Nicht im Zusammenhang mit Sexualpheromonen, sondern als Inhaltsstoffe von vegetativen Teilen der pazifischen Tange *Dictyopteris australis* und *Dictyopteris plagiogramma* hat Moore<sup>[21]</sup> mehrere „Dictyoptere“ isoliert und ihre Struktur als  $C_{11}$ -Kohlenwasserstoffe aufgeklärt. Gefunden wurden Dictyopteren B 8, das leicht thermisch oder photochemisch in Ectocarpen 2 umgewandelt werden kann (sesselförmiger Diradikalübergangszustand)<sup>[22]</sup>. Auch das mit 4 isomere Dictyopteren A 9 wurde charakterisiert (vgl. Abschnitt 4). Weiter enthält *Dictyopteris* 1,3E,5Z,8Z-

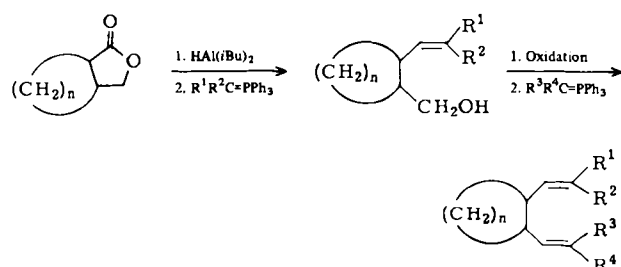
Undecatetraen **10**, ein offenkettiges Isomer von Dictyopteren **B 8**, Aucanten **6**, Multifiden **7** und Ectocarpen **2**. Der Kohlenwasserstoff **10** ist auch die geschlechtsspezifische Substanz der Meeresalge *Spermatochnus paradoxus*<sup>[23]</sup>. Niedere Homologe von **10** sind die Lockstoffe, die von Eiern der obligatorisch oogamen *Fucus*-Arten als Signalstoffe für die 20000fach kleineren Spermatozoiden ausgeschieden werden. Sowohl *Fucus serratus*<sup>[24]</sup> als auch *Fucus vesiculosus*<sup>[25]</sup> des Nordatlantiks scheiden Fucoserratene **11** als einzigen Wirkstoff aus. Seine Strukturauflklärung gelang durch UV-, Massen- und NMR-Spektroskopie am Signalstoff und seinem Hexahydroprodukt (*n*-Octan). Schließlich erwiesen Synthese und gaschromatographischer Vergleich (Kováts-Indices) sämtlicher isomerer 1,3,5- und 2,4,6-konjugierter Octatriene mit dem Naturprodukt **11** seine Identität als 1,3*E*,5*Z*-Octatrien<sup>[26]</sup>.

Obgleich also die Spermatozoiden beider *Fucus*-Formen gegenseitig gelockt werden, kommt es dennoch nicht zur Kreuzbefruchtung dieser stabilen Arten. Nach experimentellen Arbeiten von Bolwell et al.<sup>[27]</sup> müssen artspezifische immunologische Barrieren in den Oberflächen-Glykoproteinen vorhanden sein, die eine Spezies-spezifische Erkennung von Ei und Spermatozoid bewirken.

Es mag noch angeführt werden, daß generell die analytischen Muster der flüchtigen Kohlenwasserstoffe von Meeresalgen komplex sind und zahlreiche gesättigte und ungesättigte lineare sowie terpenoide Kohlenwasserstoffe enthalten<sup>[28]</sup>.

### 3. Synthese der Pheromone

Viele Pheromone sind enantiomer-einheitliche vicinal dialkylierte C<sub>11</sub>-Carbocyclen. Für ihre Synthese ist es sinnvoll, leicht zugängliche und sterisch rein *cis*- oder *trans*-disubstituierte Ausgangsverbindungen zu wählen. Geeignet sind vor allem bicyclische Lactone, da sie diese Forde-



Schema 1. Prinzip der Synthese von Braunalgen-Pheromonen des Typs 3 und 6-9.

rung erfüllen und zugleich zwei Seitenketten-Synthons mit unterschiedlichen Oxidationsstufen einbringen. Die Umwandlung der Synthons in olefinische Strukturen eindeutiger Geometrie ist ein weiterer Abschnitt in derartigen Synthese-Sequenzen.

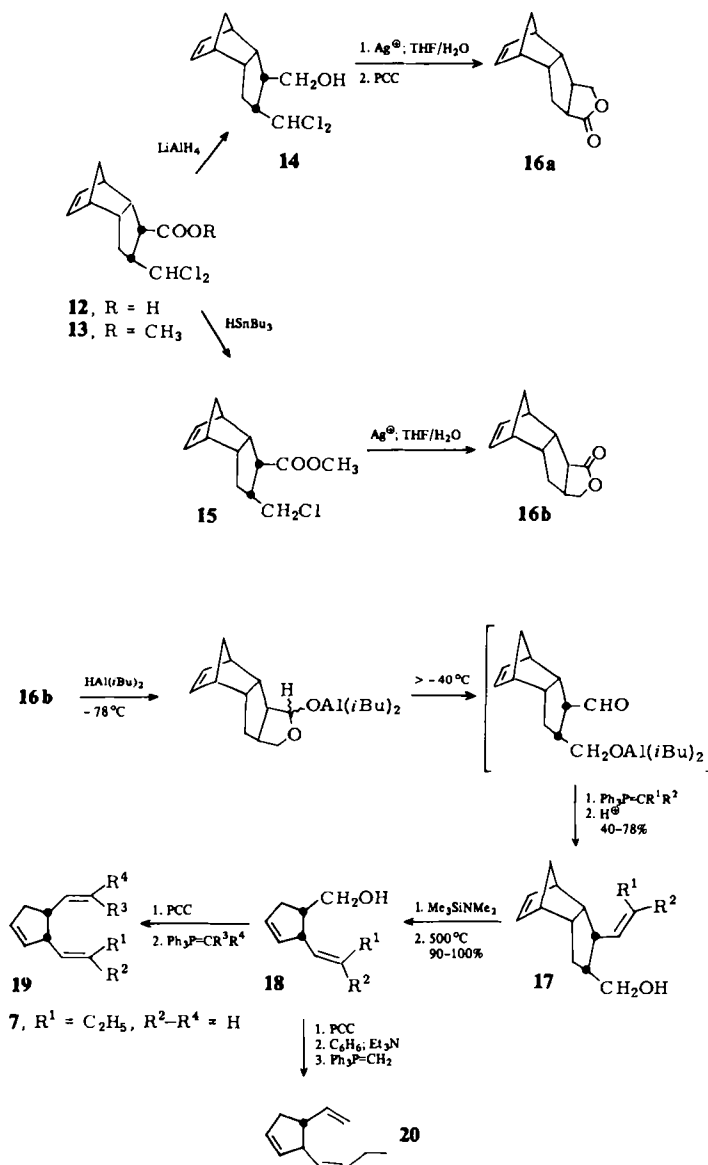
Eine vielseitig nutzbare Lacton→Olefin-Transformation ist die „reduktive Olefinierung“<sup>[29]</sup>, wobei Lactone mit Diisobutylaluminiumhydrid zu Tieftemperatur-stabilen (–70 °C) Organoaluminium-substituierten Halbacetalen umgesetzt werden (Ester reagieren analog), die mit Phosphoranen bei 0 °C zu olefinischen Alkoholen reagieren. Die zweite Seitenkette kann daraufhin mit dem üblichen Repertoire (Oxidation, Wittig-Reaktion) vervollständigt

werden (Schema 1). Wird sie jedoch zuvor mit optisch aktiven Hilfsreagentien derivatisiert, läßt sich unter günstigen Voraussetzungen eine chromatographische Antipodentrennung vorschalten, die *beide* enantiomere Lockstoffmoleküle zugänglich macht. Das Prinzip kann auf alle bisher isolierten carbocyclischen Pheromonstrukturen übertragen werden und soll am Beispiel der Synthese von Multifiden **7** illustriert werden (Abschnitt 3.1).

#### 3.1. Synthese von Multifiden<sup>[31]</sup>

Mit dem Ziel breit angelegter Receptor-Studien mußten an die Synthese von Multifiden **7** (Schema 2) besondere Ansprüche bezüglich Stereo(spezifität)selektivität und Variationsbreite gestellt werden. Die Synthese sollte die Forderung nach variablen Kettenlängen und -verzweigungen ebenso erfüllen wie nach einheitlichen Geometrien und Chiralitäten. Auch Heteroatome sollten ohne grundlegende Änderungen des Konzepts eingeführt werden können<sup>[30-33]</sup>.

Als gut geeignete Ausgangsverbindung erwies sich die α-(Dichlormethyl)carbonsäure **12**, die in nur wenigen Schrit-



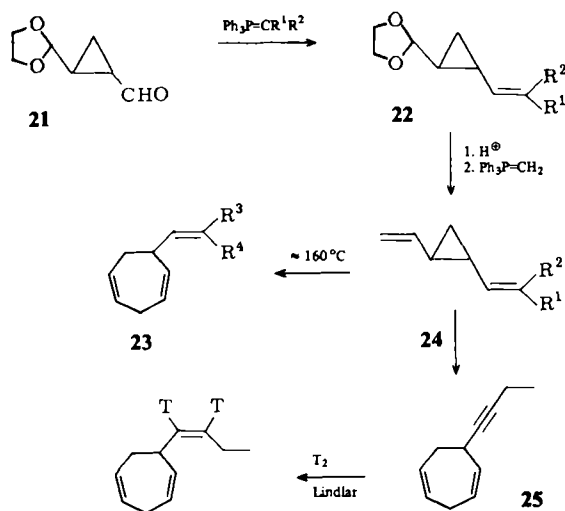
Schema 2. Synthese von Multifiden **7**. THF = Tetrahydrofuran, PCC = Pyridiniumchlorochromat.

ten und guter Ausbeute aus Dicyclopentadien und Dichlorketen hergestellt werden kann<sup>[34]</sup>. Nach Veresterung mit  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$  zu **13** entscheidet die Reduktion einer der beiden Seitenketten über die Stereochemie der Lactone **16a** oder **16b**. So führt selektive Enthaloxygenierung von **13** mit Tri-*n*-butylzinnhydrid über den Monochlor-ester **15** und anschließende Cyclisierung zur Schlüsselverbindung **16b**. Seitenketten mit beliebigen Resten ( $\text{R}^1$ ;  $\text{R}^2$ ) lassen sich in **16a** oder **16b** durch „reduktive Olefinierung“<sup>[29]</sup> glatt und sterisch einheitlich einführen, wobei olefinische Alkohole vom Typ **17** erhalten werden. Blitzpyrolyse entfernt die Cyclopentadienyl-Schutzgruppe schonend und ohne Veränderung der eingebrachten Geometrien; somit stehen die monomeren Alkohole **18** als vielseitig verwend- und abwandelbare Zwischenprodukte zur Verfügung.

Nach Oxidation zum Aldehyd kann wiederum der ganze Spielraum an Wittig-Reaktionen zur Variation der zweiten Seitenkette ( $\text{R}^3$ ;  $\text{R}^4$ ) in **19** ausgenutzt werden. Umsetzung von **18** mit optisch aktivem Phenylethylisocyanat führt zu diastereomeren Carbamaten, die durch einfache Chromatographie an Silicagel in ihre Antipoden spaltbar sind<sup>[35]</sup> (>97% e.e.). Aus ihnen sind in wenigen Schritten die chiralen Lockstoffe in hoher optischer Reinheit zugänglich. *trans*-Disubstituierte „Multifidene“ **20** lassen sich nach baseinduzierter Umlagerung des intermediären Aldehyds herstellen und runden die Synthese auch in dieser Richtung ab. Zur Einführung von Heteroatomen (z. B. einer homologen Reihe von Halogenen) sind ebenfalls die Alkohole **18** gut geeignet, so daß hier eine Serie molekularer „Sonden“ von gleicher Gestalt und Raumerfüllung zur Verfügung steht<sup>[36]</sup>.

### 3.2. Synthese von Ectocarpenen und Dictyopterinen<sup>[37]</sup>

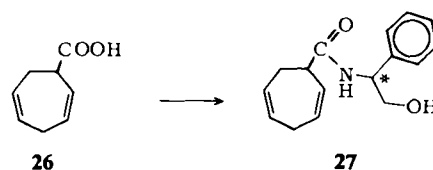
Für die Synthese von Ectocarpenen und Dictyopterinen kann als vielfältig nutzbare Ausgangsverbindung das Monoacetal **21** des *trans*-Cyclopropan-dicarbaldehyds mit beliebigen Wittig-Reagentien ( $\text{R}^1$ ;  $\text{R}^2$ ) zum gewünschten Alkenyl-cyclopropyl-carbaldehydacetal **22** umgesetzt werden (Schema 3).



Schema 3. Synthese von Ectocarpenen (**23**,  $\text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^4 = \text{C}_2\text{H}_5$ , = Ectocarpen **2**) sowie Dictyopterinen (**24**,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{Z-C}_2\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}$ , = Dictyopteren **B 8**; **24**,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{C}_6\text{H}_9$ , = Dictyopteren **A 9**), schematisch.

Eine zweite Wittig-Reaktion – im Prinzip erneut frei wählbar, für diese Naturstoffklasse jedoch auf Methylphosphorane beschränkt – vervollständigt das  $\text{C}_{11}$ -Grundgerüst und macht die Dictyopterene (Typ **24**) in nur wenigen Schritten zugänglich. Anschließend Cope-Umlagerung bei ca.  $160^\circ\text{C}$  (sesselförmiger diradikalischer Übergangszustand) führt zu den Ectocarpenen (Typ **23**), die auf diese Weise gleichfalls mit beliebigen Seitenketten erhalten werden ( $\text{R}^3$ ;  $\text{R}^4$ ). Da auch acetylenische Cyclopropan-Derivate die Bedingungen der Cope-Umlagerung unbeschadet überstehen, ergibt sich hier ein besonders einfacher Zugang zu radioaktiv markiertem Ectocarpin durch Tritierung von Butinylcycloheptadien **25**<sup>[38]</sup>.

Zur Gewinnung optisch aktiver Ectocarpene eignen sich die Brucin- oder Strychninsalze der 2,5-Cycloheptadien-1-carbonsäure **26** nur wenig (<30% e.e.)<sup>[39]</sup>; deshalb wurde ein Weg, analog den flüssig-chromatographischen Trennverfahren diastereomerer  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäureamide<sup>[40]</sup>, beschritten (Schema 4).



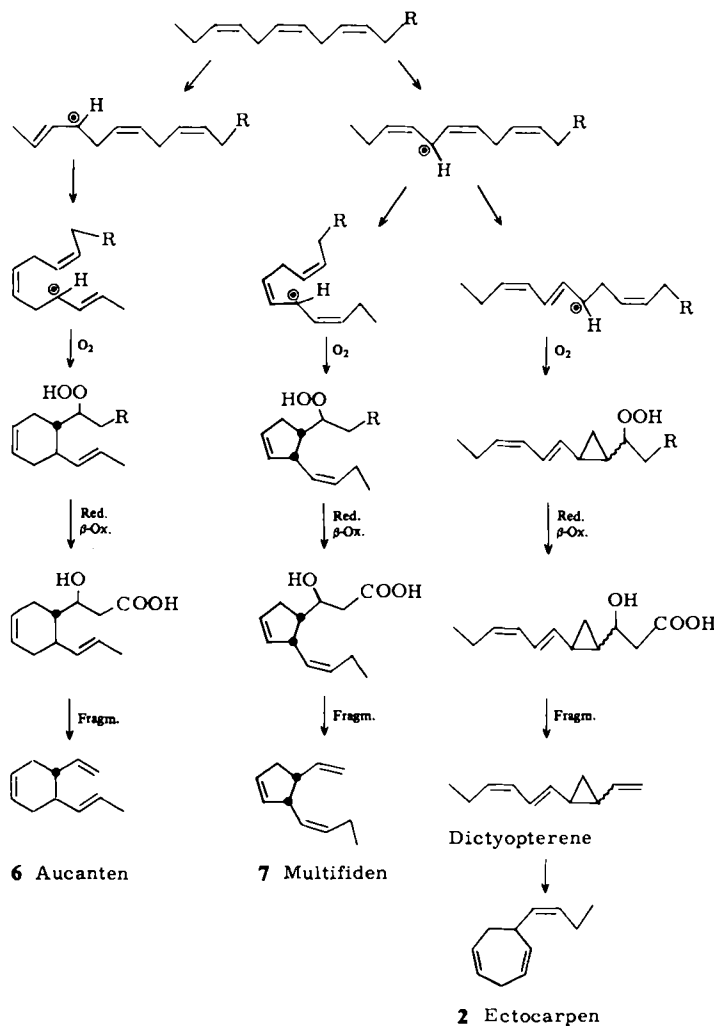
Schema 4. Herstellung diastereomerer Amide **27** aus der Säure **26** mit 1.  $N,N'$ -Carbonyldiimidazol und 2. 2-Amino-2-phenylethanol.

**26**<sup>[37]</sup> wird mit  $N,N'$ -Carbonyldiimidazol zum reaktiven Imidazolid umgesetzt und dieses mit optisch reinem 2-Amino-2-phenylethanol („Phenylglycinol“) in das Diastereomerenpaar **27** umgewandelt. **27** kann an Silicagelsäulen (Nucleosil 50-5) mit einem Faktor  $\alpha = 1.2$  aussichtsreich in die beiden Antipoden aufgetrennt werden<sup>[41]</sup>. Einen originellen Weg beschritten *Kajiwar* et al.<sup>[42]</sup>, indem sie 2,5-Cycloheptadien-1-carbonsäureethylester mit *Rhodotorula*-Spezies enantioselektiv verseiften. Die erhaltenen optischen Ausbeuten liegen bei 78 bzw. 95% e.e.; diesen Autoren gelang auch die chemische Trennung der diastereomeren Chinin-Salze (95% e.e.).

### 4. Biogenetische Verwandtschaft der $\text{C}_{11}$ -Kohlenwasserstoffe

Die Strukturähnlichkeit der bisher isolierten und in Tabelle 1 zusammengestellten geschlechtsspezifischen Pheromone der Braunalgenspezies ist auffallend. Allen gemeinsam ist eine Vinyl- oder eine Cycloheptadienylgruppe sowie, je nach Vorgeschichte, eine *Z*-Butenyl-, *E*-Propenyl- oder *E*-Hexenylgruppe (in manchen Fällen auch hydriert oder dehydriert). Einige zeigen noch den homokonjugierten 1,4-Rhythmus, der für polyungesättigte Fettsäuren charakteristisch ist. Wir haben weiter gesehen, daß die  $\text{C}_{11}$ -Polyene verschieden große Ringe enthalten können: Cyclopropane, Cyclopentene, Cyclohexene sowie 1,4-Cycloheptadiene kommen vor. Bei den  $\text{C}_8$ -Verbindungen fehlt zwar die Ringstruktur, aber Vinyl- und *Z*-Butenylterminus sind ebenfalls vorhanden. Noch offensichtlicher werden Fettsäuren als biogenetische Quelle in 1,3*E*,5*Z*,8*Z*-Undecatrienen, das den aliphatischen Fettsäureterminus nahezu un-

verändert enthält. Dieser Vergleich läßt biogenetische Zusammenhänge vermuten, wobei als Ausgangsmaterial Linolensäure dienen kann, die nicht nur in Meeresalgen vorkommt (und von dort in die Leberöl der Fische übergeht), sondern auch die terminale Z-Butenylgruppe aufweist. Auch niedrigere Homologe ließen sich als Startstufen diskutieren, z. B. Dodecatriensäure, die durch dreifache  $\beta$ -Oxidation aus Linolensäure entstehen könnte. Durch Zusammenwirken von radikalischer Cyclisierung und anschließender heterolytischer Fragmentierung läßt sich für die Naturprodukte plausibel machen, wie sie in Membranfraktionen der Gynogameten aus Polyenfettsäuren gebildet werden könnten.



Schema 5. Modellvorstellung zur Biogenese der  $C_{11}$ -Polyene aus ungesättigten Fettsäuren. Red. = Reduktion von Hydroperoxiden,  $\beta$ -Ox. =  $\beta$ -Oxidation, Fragm. = heterolytische Fragmentierung.

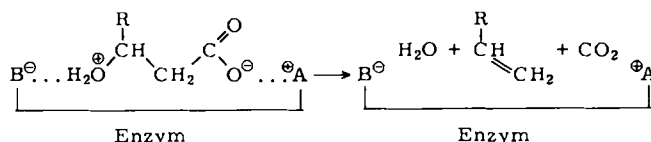
Die in Schema 5 postulierten Reaktionsabläufe gründen sich auf folgende Überlegungen:

- Ähnlich dem Primärschritt Lipoxigenase-katalysierter Reaktionen wird eine der olefinisch flankierten  $CH_2$ -Gruppen als Radikal aktiviert. Anders als bei kationischen Strukturen bleibt bei Radikalen die volle Flexibilität der Lipidkette erhalten.
- Die reaktive Spezies kann unmittelbar (Multifiden) oder nach Umlagerung (Dictyopterene) zum konjugierten Pentadienyl-Radikal cyclisieren, wobei Auflagerungsprozesse am aktiven Zentrum des entsprechenden En-

zyms maßgeblich Ringgröße und Substitutionsmuster bestimmen (man beachte die Analogie der konjugierten  $C_{11}$ -Kohlenwasserstoffe - E,Z-Geometrie - mit Produkten von Lipoxigenase-Reaktionen).

- Nach Ringschluß oder Umlagerung beendet die Reaktion mit Sauerstoff (Grundzustand) den radikalischen Prozeß und führt zu Hydroperoxysäuren ( $\Delta^9$  bei Linolensäure,  $\Delta^3$  bei Dodecatriensäure als Startmolekül).
- Durch Reduktion der Hydroperoxide und dreifache  $\beta$ -Oxidation (nur bei Linolensäure) entstehen 3-Hydroxysäuren. Sie dienen als Substrate einer heterolytischen Fragmentierung, durch die alle vorhandenen funktionellen Gruppen als  $CO_2$  oder  $H_2O$  entfernt werden.

Der Mechanismus dieser Fragmentierung kann durch allgemeine Säure/Base-Katalyse gedeutet werden (Schema 6).



Schema 6. Fragmentierung durch allgemeine Säure/Base-Katalyse.

Mögliche Edukte sind auch längerkettige oder höher ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, die durch eine Phospholipase aus Membran-Phospholipiden freigesetzt werden könnte.

Ähnliche Lipid-aktivierende und Sauerstoff-nutzende Enzyme könnten an der Genese der  $C_8$ -Verbindungen (z. B. Fucoserraten 8) beteiligt sein. Aus 1,5Z,8Z-Undecatrien-3-ol, dessen Existenz Yamada et al. in *Dictyopteris*-Arten sicherstellten<sup>[43]</sup>, würde dabei eine Diol-Zwischenstufe gewonnen, deren Fragmentierung unter Erhaltung der 5Z-Geometrie zum Fucoserraten 8 führte. Die Erhaltung der 5Z-Geometrie ließ sich durch biomimetische Modellreaktionen experimentell bestätigen<sup>[44]</sup>.

Als wertvoll für derartige biogenetische Experimente erweist sich eine südafrikanische Composite (*Senecio isati-deus*), die besonders zur Blütezeit in ihren oberirdischen Teilen beträchtliche Mengen Ectocarpene enthält<sup>[45]</sup>, während Sesquiterpene und eine ganze Skala von offenkettigen  $C_{15}$ - bis  $C_{17}$ -Kohlenwasserstoffen in der Wurzel vorhanden sind<sup>[46]</sup>. Letztere haben ebenfalls alle eine charakteristische Vinylgruppe und Doppelbindungen in den Positionen, die bei Ableitung von polyungesättigten Fettsäuren zu erwarten sind. Biogenese-Versuche mit markierten Vorläufern wurden sowohl an *Senecio* als auch an der Färbdistel *Carthamus tinctorius* ausgeführt, deren Keimlinge in ihrem Öl gleichfalls größere Mengen Vinylkohlenwasserstoffe enthalten<sup>[47]</sup>. Da gerade hier bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien (Keimlinge) 1-Pentadecen, 1,8Z,11Z-Heptadecatrien und, als Hauptprodukt, 1,8Z,11Z,14Z-Heptadecatetraen nachgewiesen werden können (das Spektrum ist dem von *Senecio* vergleichbar), wurden bei diesem leicht zu handhabenden Objekt erste Markierungsexperimente mit  $^3H$ -Linolensäure durchgeführt. Gefunden wurden Einbauquoten bis zu 4%, die diese Fettsäure mit hin als Vorläufer nahelegen<sup>[48]</sup>, und es läßt sich diskutieren, daß aktivierte Derivate der Fettsäuren in diese Reaktionen eingeführt werden.

## 5. Reception der Signalstoffe

Wir wissen noch nicht, wo der Lockstoff auf dem Androgameten gebunden, wie sein Reiz verarbeitet und auf die bewegende Geißel vermittelt und schließlich, auf welche Weise das Signal beendet und unwirksam gemacht wird. Orientierende Versuche mit markiertem *Ectocarpus* 2 lassen vermuten, daß die Rezeptoren an der Ansatzstelle der Geißeln massiert sind. In Analogie zu Beobachtungen bei der Chemotaxis von Mikroorganismen kann man schließen, daß die Reizleitung und -verarbeitung auf chemischer oder konformatorischer Modifikation von Binde-, Übertragungs-, Adaptations- und Umwandlungsproteinen beruht, bis – sei es durch Ionen- oder Energiefluß – die Geißelbewegung moduliert wird<sup>[49]</sup>. Kinematographische Untersuchungen des Bewegungsmusters von *Ectocarpus*-Androgameten deuten darauf hin, daß es die kleine Geißel ist, auf deren Steuerbewegungen das Lockstoff-sensorische System einwirkt<sup>[50]</sup>. Die dorsiventralen Gameten reagieren stark thigmotaktisch und werden von der großen, mit eventuell passiv beweglichen Mastigonemata besetzten Geißel auf der Unterlage entlanggezogen. Es ist also kein freies Schwimmen in dem begrenzten Raum zwischen Seetangfäden oder auf der Oberfläche eines Braunalgen-Thallus, sondern eher ein Kriechen. Durch eine erhöhte Schlagfrequenz der Kurzgeißel wird die zunächst geradlinige Fortbewegung der Gameten in eine Rechtsspiralbewegung umgewandelt, so daß die sich rechts befindende Lockstoffquelle, der Gynogamet, eingekreist und schließlich erreicht wird (Fig. 3). Ein Weibchen zur Linken wird verfehlt.

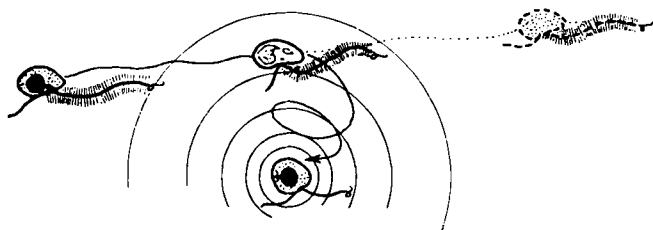


Fig. 3. Bewegungsänderung der Algen-Gameten in einem Lockstoff-Gradienten. Zunehmende Pheromonkonzentration erhöht die Schlagfrequenz der asymmetrisch angeordneten Kurzgeißel und führt so durch eine erzwungene Rechtsspiralbewegung zum Gynogameten.

Ein gewisses „Gedächtnis“ der oder eines der konformativ geänderten Proteine (das aber nicht zu lange dauern darf, damit ein Gradienten verspürt und ihm gefolgt werden kann) ermöglicht es, den Sender (Emitter) zu orten. Durch Unwirksammachen des Reizstoffes kann die räumliche Information in eine zeitliche umgewandelt werden, so daß das System mit einem Rezeptortyp auskommen und eine Gradientenkontrolle längs des Gameten ( $dc/dx$ ) entbehren kann. Dies noch weitgehend hypothetische Modell der Reizbeantwortung solcher einzelliger eukaryontischer Lebewesen erfordert spezifische Rezeptoren, deren Existenz und Wirkungsweise wir durch chemische und sinnesphysiologische Versuche nachgewiesen haben.

### 5.1. Biologischer Aktivitätstest

Um den informatorischen Wert eines Lockstoffs zu messen, benutzen wir das in Abschnitt 2.1 angedeutete Verfah-

ren in modifizierter Form, die es ermöglicht, quantitative Daten zu gewinnen<sup>[51]</sup>. Gestufte Verdünnungen des Lockstoffs in einem biologisch inerten Perfluorether (FC 78)<sup>[\*]</sup> werden als Mikrotropfen (0.1  $\mu$ L) definierte Zeit im Dunkeln (um phototaktische Störungen auszuschließen) mit Gametensuspensionen zusammengebracht. Ein Solvensblindwert wird ebenfalls bestimmt. Man macht sodann eine Blitzlicht-Dunkelfeldaufnahme und vergleicht die Zahl der Gameten über einem Probefeld mit dem entsprechenden Blindwert<sup>[\*\*]</sup>. Der erhaltene Wert ist reproduzierbar der Konzentration des Lockstoffs proportional, so daß sich Dosis-Wirkungs-Kurven konstruieren lassen, die bei logarithmischer Auftragung annähernd linear sind und somit darauf hinweisen, daß auch für diese primitiven Sinneszellen das Weber-Fechnersche Gesetz (logarithmische Abhängigkeit zwischen Reizgröße und Reizantwort) gilt. Die Reizschwelle ist der Grenzwert der Konzentration, bei dem der Probenwert eben den Blindwert übersteigt. Die aktuellen Wirkstoffkonzentrationen ( $C_L$ ) erhält man unter Berücksichtigung der jeweiligen Verteilungskoeffizienten ( $K_{fcw}$ ) einer Substanz zwischen der organischen Phase (FC 78) und dem Seewassermilieu. Die Verteilungskoeffizienten werden gaschromatographisch oder durch UV-Messungen (bei konjugierten Verbindungen) bestimmt. Das Produkt aus der Schwellenkonzentration in der organischen Phase ( $C_L$ ) und  $K_{fcw}$  entspricht dann der wahren Wirkstoffkonzentration im wäßrigen Milieu ( $C_L$ )<sup>[52]</sup>.

Im experimentellen Ansatz und unter den angenommenen stringenten Bedingungen werden reproduzierbare Ergebnisse erhalten, die sich vernünftig diskutieren lassen und Möglichkeiten zur systematischen Erforschung des Systems Signalstoff/Bindungsort eröffnen. Bei der quantitativen Auswertung kommt man zu eindrucksvoll niedrigen Werten für die zur Reizauslösung notwendige Schwellenkonzentration in der Wasserphase. Für das System (S)-(+)-*Ectocarpus*/Ectocarpus-Androgameten wurden  $8.9 \times 10^{-10}$  mol/L<sup>[54]</sup>, für das System (+)-Multifiden/*Cutleria*-Androgameten sogar  $6.5 \times 10^{-12}$  mol/L gemessen<sup>[52]</sup>. Aus dem Schwimmverhalten, der Reaktionszeit und dem Aktionsvolumen der Gameten errechnet man Schwellenwerte von 1 bis 10 Lockstoffmolekülen je Gamet für eine effektive Reizauslösung. Auch ein Vergleich der Reizsteilheiten und -schwellen der Systeme ist illustrativ. Die Gameten des primitiven, isogamen *Ectocarpus* haben eine geringe Empfindlichkeit und brauchen – im engverflochtenen Lebensraum fädiger Gametophyten – auch keine grö-

[\*] FC 78 ist ein Handelsnamen der 3M-Company für einen niedermolekularen Perfluorether der Summenformel  $C_8F_{16}O$ .

[\*\*] Das Ergebnis wird als Lockquotient  $Q$  = Gameten je Standardfeld der Probe dividiert durch Gameten über dem Standardfeld ohne Zusatz des Lockstoffs ausgedrückt und statistisch behandelt. Definitionsgemäß ist die unkorrigierte Schwellenkonzentration einer Substanz erreicht, wenn  $Q$  dem Wert 1.00 zustrebt. Diese Wirkungsprüfung basiert auf der Kenntnis der Grenzkonzentration in der Wasserphase, die den Gameten unmittelbar oberhalb der FC78-Grenzfläche umgibt. Man hat deshalb die Diffusionsgeschwindigkeit der Signalstoffe zu berücksichtigen. Nach dem 1. Fickschen Gesetz ist die Zahl der transportierten Moleküle zu einer gegebenen Zeit nach  $dn/dt = -AD \times dc/dt$  mit der Konzentration in der FC78-Phase verknüpft. Demnach ist die Population über den Proben-tröpfchen zeit- und konzentrationsabhängig. Um derartige Effekte abzuschätzen, wurden die Gameten über Tröpfchen mit verschiedenen Lockstoffkonzentrationen in Abständen von 1 min ausgezählt, wobei sich zeigte, daß das Zeitoptimum bei 4 min liegt [53]. Weiterhin wird eine molekulare Lösung der lipophilen Locksubstanzen (keine Micellen) und ihre chemische Beständigkeit während des Meßvorganges vorausgesetzt.



Bere Reichweite. Die Gleichzahl von Andro- und Gynogameten erfordert keine stark lockende Zeichensprache, während bei den anisogamen und oogamen Formen wirkungsvollere Kommunikationssysteme entwickelt werden mußten. Entsprechend sind die Steilheiten im Receptorsystem Multifiden/*Cutleria*-Androgameten und Fucoserraten/*Fucus*-Spermatozoiden sehr viel größer<sup>[51]</sup>. Aber auch hier genügt die Reichweite von ca. 1 mm, wie bei allen anderen Systemen, für das Biotop (Fig. 4).

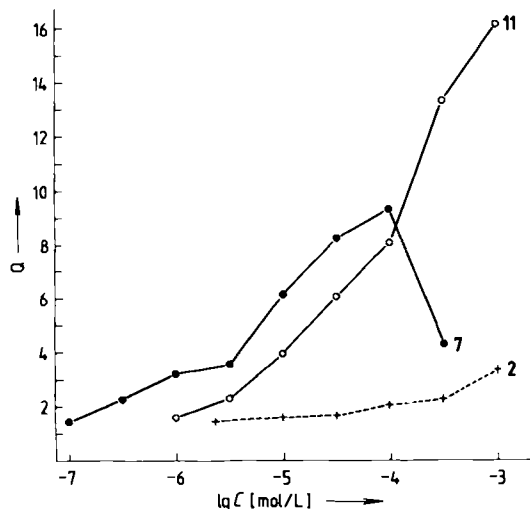
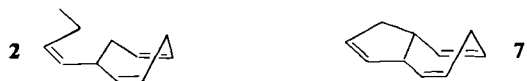


Fig. 4. Dosis/Wirkungs-Diagramm für Braunalgen-Lockstoffe (Illustration des Weber-Fechnerschen Gesetzes). 2 = Ectocarpin bei *Ectocarpus*; 7 = (+)-Multifiden bei *Cutleria*; 11 = Fucoserratin bei *Fucus*. Aufgetragen sind die „Lockquotienten“  $Q$  gegen den Logarithmus der Pheromonkonzentration  $C$  in der organischen Phase ( $Q = K \lg C$ ).

Die Spezifität der Lockstoffsysteme ist ebenfalls recht bemerkenswert. Nur der arteigene Lockstoff ist im natürlichen System gut wirksam; er hat aber auch bei verwandten Formen einen Effekt, wenn auch die Lockschwelle oft mehrere Zehnerpotenzen höher liegt. So sprechen *Cutleria*-Androgameten nicht nur auf Multifiden 7, sondern auch auf Ectocarpin 2 an<sup>[54]</sup>. In Schema 7 ist angedeutet, weshalb das möglich sein mag: In geeigneter Konformation sind die beiden Substanzen einander räumlich nicht unähnlich und finden auch auf der entsprechend konfigurierten Receptoroberfläche für den jeweils anderen Lockstoff Platz und Kontakt.



Schema 7.

Sowie man aber das Ectocarpin modifiziert, spricht nur noch das *Ectocarpus*-System empfindlich an, nicht aber das *Cutleria*-System. Wird z. B. die *Z*-Butenylseitenkette von 2 durch eine *E*-Propenylseitenkette ersetzt, so sinkt der informatorische Gehalt für *Ectocarpus*-Androgameten um drei Zehnerpotenzen, für *Cutleria*-Spermatozoiden aber nur um eine Zehnerpotenz<sup>[54]</sup>.

## 5.2. Receptor-Screening mit synthetischen „Multifidenen“

Ein besser variierbares, daher für die Abtastung des entsprechenden Receptors brauchbareres Molekül als Ectocarpin 2 ist Multifiden 7 mit seinen beiden Seitenketten

und der spezifischen Doppelbindungs- und Stereochemie des Cyclopentenrings. Die in Schema 2 beschriebene Synthese ermöglichte es uns, mehr als 40 Isomere, Homologe und Analoge von Multifiden mit unterschiedlich langen und angeordneten Seitenketten, mit verschiedener Lage der Ring-Doppelbindung und mit Heteroatomen in Seitenketten und Ring herzustellen. Die Substanzen wurden bis zu über 99% durch präparative Gaschromatographie gereinigt<sup>[30]</sup>. Es gelang auch, die beiden Enantiomere, (+)- und (-)-Multifiden, in großer Reinheit zu synthetisieren<sup>[35]</sup>. Die Abwandlungen dieses Moleküls lassen sich einteilen in solche, in denen 1. die Doppelbindungen reduziert oder an eine andere Stelle verlegt sind; 2. die eine oder die andere Seitenkette verkürzt oder verlängert, *cis*- oder *trans*-orientiert ist; 3. eine Doppelbindung durch eine C-Heteroatom-Gruppe ersetzt ist<sup>[53]</sup>.

In der ersten Gruppe nimmt die biologische Wirkung im allgemeinen um zwei Zehnerpotenzen ab, wenn nur eine Doppelbindung fehlt; der Verlust weiterer Doppelbindungen ist weniger schwerwiegend (kooperative Bindung). Auch in der zweiten Gruppe ist die Wirksamkeit außerordentlich stark, in Extremfällen um drei Zehnerpotenzen, vermindert. Nur die dem natürlichen Molekül entsprechende *cis*-Geometrie gibt wirksame Moleküle. Figur 5 de-

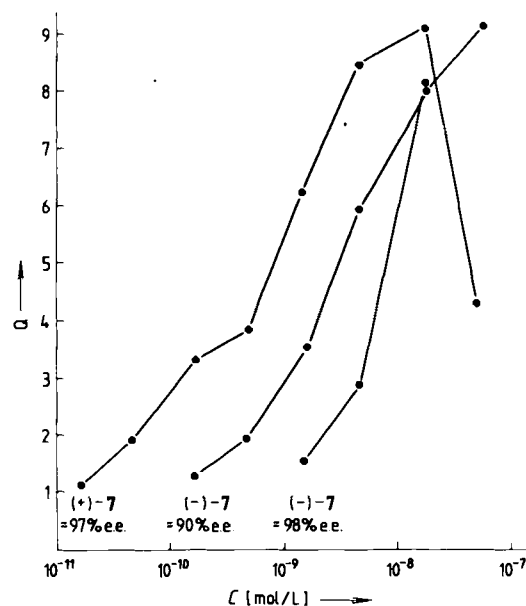


Fig. 5. Dosis/Wirkungs-Diagramm für (+)- und (-)-Multifiden 7 (in Meerwasser).

monstriert, daß sich auch die Wirkung der Enantiomere unterscheidet. Das natürliche (+)-Enantiomer erweist sich als ca. 100mal wirksamer als sein (-)-Antipode (>98% e.e.). Dies bedeutet, daß das unnatürliche Enantiomer praktisch unwirksam ist, zumindest aber, daß es keine antagonistischen Eigenschaften hat.

Die wesentlichen Bindungselemente sind, neben Form und Größe, die Doppelbindungen im mehrfach ungesättigten Kohlenwasserstoff Multifiden. Die Bindung am Receptor wird infolgedessen durch  $\pi$ -Elektronen, also über induzierte Dispersions-Wechselwirkungen, vermittelt. Wir haben ein Modell für die Receptorgrube vorgeschlagen, in welchem Dipol/Dipol-Wechselwirkungen das Signalmolekül binden und hydrophobe Kräfte erheblich zur Bildung

des Ligand/Receptor-Komplexes im Grenzflächenbereich Wasser/Gametenoberfläche beitragen<sup>[52]</sup> (Fig. 6).

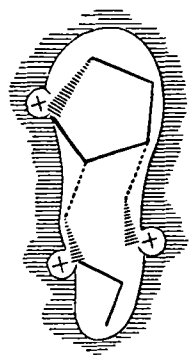
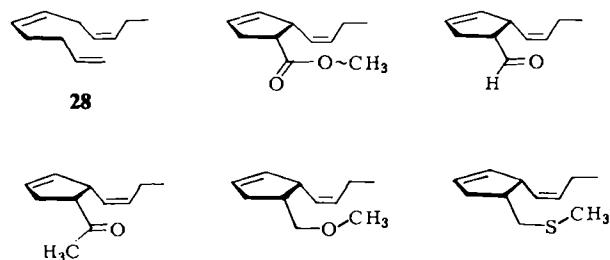


Fig. 6. Das „Ohr“ der Gameten für die Sprache der Locksignale. Schematische Darstellung der wechselseitigen Polarisation von Ligand (Multifiden 7) und Receptor. Komplementär zu den  $\pi$ -Elektronen des Signalmoleküls angeordnete elektrophile Gruppen können durch Induktion von Dipolmomenten zur Bindung und begleitenden Konformationsänderung des Gesamtsystems Receptor/Ligand beitragen.

Die spezifisch geformte Receptorfläche enthält elektrophile Gruppen, die den Doppelbindungspositionen des Pheromons komplementär sind und dadurch gegenseitige Polarisation der Partner bewirken. Konzentriert zum Bindvorgang oder auch als Folgereaktion kommt es zur Konformationsänderung im Komplex und damit zur biologischen Wirkung. Um die Bindungsweise von Multifiden an seinen Receptor ohne störende sterische Effekte sowie Konformations- oder Solvatisierungseffekte zu untersuchen, wurden weitgehend äquivalente Parapheromone mit systematisch geänderten elektronischen Eigenschaften synthetisiert<sup>[36]</sup>. Die Ergebnisse von Bindungsstudien bestätigen das vorgeschlagene Receptormodell im wesentlichen und geben damit klareren Einblick in die Primärschritte der molekularen Erkennungsvorgänge im Gametencyclus der Phaeophyceen<sup>[53]</sup>. Seitenketten mit stärker polarisierbaren Gruppen tragen mehr zur Aktivität des Parapheromons (Signalmolekül) bei als solche mit schwächer polarisierbaren. Analoga, in denen die ursprüngliche Vinylgruppe durch eine Halogenmethylgruppe ersetzt wurde, zeigen um so bessere biologische Wirksamkeit, je stärker polarisier-

bar die Halogeneinheit ist. Das Iodderivat ist der erwartete perfekte Imitator, der sogar den Naturstoff ein wenig übertrifft (Fig. 7, vgl. Schema 8). Die Moleküle gleichen einander sterisch und in den permanenten Dipolmomenten (letztere nur annähernd), so daß die Ergebnisse unmittelbar mit den elektronischen Eigenschaften des jeweiligen Substituenten verknüpft werden können. Der Unterschied in den Dosis-Wirkungs-Kurven der  $\text{CH}_2\text{Cl}$ - und  $\text{CH}_2\text{I}$ -Derivate (ca. 1:4) ist daher ein Ausdruck der vom Chlor zum Iod ansteigenden Polarisierbarkeit und der damit verbundenen Elektron-Donoreigenschaften.

Eine andere, in diesem Zusammenhang interessante Gruppe von Parapheromonen sind die Oxa- und Thia-Multifidene<sup>[36,53]</sup>. Das Aldehyd-Derivat (vgl. Fig. 7) hat eine unerwartet niedrige Aktivität. Dies kann wie folgt gedeutet werden: Nur das bindende Elektronenpaar der  $\text{C}=\text{O}$ -Doppelbindung ist für die gegenseitige Polarisation und Bildung eines  $\pi$ -Komplexes zugänglich, denn es befindet sich als einziges in der gleichen Ebene wie die Elektronenwolke der ursprünglichen Vinyl-Doppelbindung. Die Orbitale der beiden einsamen Elektronenpaare dagegen stehen zueinander senkrecht, und zwar so, daß sie nicht an Donor- und Polarisationsprozessen teilnehmen können. Damit erklären sich nicht nur die niedrigen Aktivitäten des Aldehyds und der Acetylverbindung, sondern auch die hohe Aktivität des Ethers. In dieser Verbindung nämlich kann sich das polarisierbare einsame Elektronenpaar des Sauerstoffs leicht in die Ebene maximaler Wechselwirkung einlagern, denn eine  $\text{sp}^3$ -hybridisierte Seitenkette hat alle Freiheitsgrade der Rotation. Dies wird auch durch den entsprechenden Thioether erhärtet, der – wegen der vakanten 3d-Orbitale des Schwefels – typische Acceptor-Eigenschaften aufweisen sollte. Tatsächlich beträgt seine biologische Aktivität nur etwa 30% derjenigen des Ethers, obwohl beide Verbindungen als sterisch gleichwertig anzusehen sind (Schema 8).



Schema 8. Perspektivische Darstellung einiger Pheromon-Imitatoren (vgl. Fig. 7).

Interessant ist der Fall des Esters, der in seiner Aktivität bemerkenswert nahe an den Naturstoff herankommt. Auch hier kann das Konzept des molekularen Wechselspiels erfolgreich angewendet werden. Die Elektronenverteilung des Esters kann der des Ethers ähneln, wobei die Resonanz die Polarisierungseffekte wirkungsvoll unterstützt. Eine weitere wesentliche Voraussetzung für eine derart effektive Bindung unpolarer Moleküle ist eine vorgegebene Raumerfüllung und Stereochemie. Eine induzierte Anpassung scheint allein nicht auszureichen, denn 1,5Z,8Z-Undecatrien 28, das unter anderem die Konformation von Multifiden 7 annehmen kann, ist praktisch inaktiv. Allerdings sind wir uns bewußt, daß in einem solchen linearen

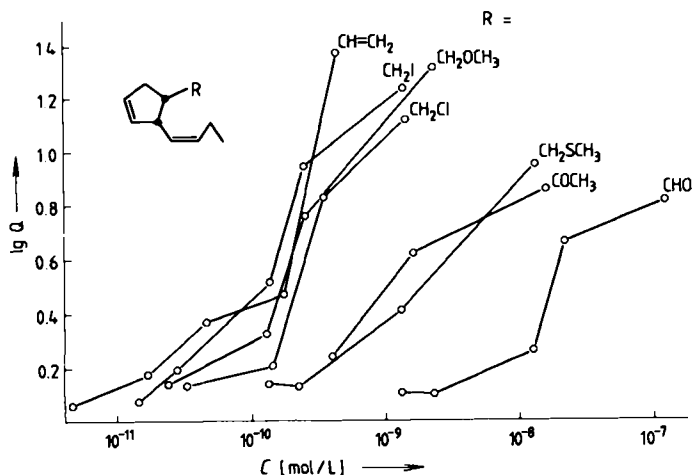


Fig. 7. Dosis/Wirkungs-Diagramm für ausgewählte Derivate von Multifiden 7 ( $\text{R} = \text{CH}=\text{CH}_2$ ). Alle Kurven beginnen bei den errechneten tatsächlichen Grenzkonzentrationen in der (Meer-)Wasserphase ( $C_L$ ).

Molekül die Bindungsdimensionen nicht durchweg denen des alicyclischen Pheromons entsprechen. Die starre Natur des Multifidens scheint aber für die Induktion entsprechender Zwänge im Receptor unabdingbar zu sein.

## 6. Schlußfolgerungen und Ausblick

Obgleich der mikroskopisch beobachtbare Aktionsradius von Braunalgenpheromonen kaum mehr als 1 mm beträgt (je nach Art sind dies etwa 10 bis 70 Gynogameten-durchmesser), lassen sie sich doch durchaus den höchstempfindlichen Riechsystemen der Insekten zur Seite stellen<sup>[55, 53]</sup>. In Abwesenheit von Pheromonen würden die Androgameten aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit (bis zu 350  $\mu\text{m/s}$ ) am Ziel vorbeischießen, bevor der Kurs korrigiert werden könnte. Die Pheromone erhöhen nun die Schlagfrequenz der hinteren kleinen Geißel, so daß bei zunehmender Trefferzahl von Pheromonmolekülen im Zusammenwirken mit der Vordergeißel eine spiralförmige Bewegung entsteht, die zunehmend enger und langsamer wird. Ein aus dem „Sendegebiet“ des Gynogameten geratener Androgamet kann die Lockstoffquelle nicht ansteuern und sie höchstens durch Zufall erreichen. Wenn diese Bewegung tatsächlich durch einige wenige Hormonmoleküle eingeleitet werden kann, müssen wir einen effektiven Trigger-Mechanismus postulieren, bei dem vorgeladene Membranpotentiale der Receptoroberflächen beim Auftreffen des chemischen Signals plötzlich zusammenbrechen, wie dies auch für die Erkennungsprozesse der Insektenpheromone postuliert wird<sup>[56]</sup>. Solche einzigartige Empfindlichkeit verlangt aber auch ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis. Im Falle der Braunalgenpheromone wird dies durch die weitgehend unpolare Natur der Signalstoffe im stark polaren wäßrigen Trägermilieu auf einfachste Weise sichergestellt. Andere Mechanismen müssen überschüssiges Pheromon entfernen oder unwirksam machen. Dies wird einmal durch die recht hohe Flüchtigkeit der kugelförmigen Moleküle erreicht, wodurch sie aus dem Wasser entweichen, dann aber wohl auch durch chemischen Angriff auf die reaktionsfähigen Doppelbindungen, z. B. das Divinylmethan-System im Ectocarpus 2. Wie gezeigt, führen polare Substituenten in Lockstoffmolekülen zu weitgehendem Verlust der Wirksamkeit<sup>[52]</sup>. Diese „Selbstreinigung“ des Milieus kann auf lichtinduzierter Oxygenierung im flachen Schelfwasser, aber auch auf Schwermetall-katalysierter Hydratation beruhen, ebenso wie auf aktiven enzymatischen Prozessen an der Oberfläche oder im Inneren der Gameten.

Aus unseren Untersuchungen, besonders am Multifiden/*Cutleria*-System, geht hervor, daß sich das „Ohr der Gameten“ für die Sprache der Locksignale auf einem Molekül der Zelloberfläche oder des Zellinneren befindet und eine solche Form hat, daß das Signal genau eingefügt und durch maximale Wechselwirkungen über Dispersionskräfte und elektrophile Gruppen an klar definierten Positionen festgehalten wird. Nur die natürliche (+)-Form von Multifiden erfüllt diese Voraussetzungen; nur diese kann daher die physiologische Funktion ausüben, die Information an die verarbeitenden Einheiten des Gameten weiterzugeben. Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, deren Kräfte mit je etwa 13 bis 17 kJ/mol anzusetzen sind, bewirken die

Orientierung. Aus der Schwellenkonzentration des nativen Multifidens lassen sich aber grob 70 kJ/mol Gesamtbindungsenergie abschätzen. Das bedeutet, daß etwa die Hälfte der Energie durch andere als die hier diskutierten und gemessenen Kräfte aufgebracht wird. Dies können sehr wohl die entropischen Terme des Gesamtsystems Lockstoff/Receptor/Milieu sein. Wir sind uns zwar bewußt, daß wir mit dem System Multifiden/*Cutleria*-Androgamet nur ein Modell für die sensorischen Vorgänge des Riechens und Schmeckens bei höheren Organismen vorlegen können. Die recht eindrucksvollen Befunde geben aber den Mut zu solchen Extrapolationen.

*Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die stete und großzügige Unterstützung der beschriebenen Arbeiten.*

Eingegangen am 24. Mai 1982 [A 423]

- [1] L. Jaenicke: Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Vortrag N 308, Westdeutscher Verlag, Opladen 1982.
- [2] A. Miyake, *Curr. Top. Dev. Biol.* 12 (1978) 37.
- [3] A. Butenandt, R. Beckmann, E. Hecker, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 324 (1961) 71.
- [4] Übersichten: a) D. G. Müller, *Pure Appl. Chem.* 51 (1979) 1885; b) L. Jaenicke, *Naturwissenschaften* 64 (1977) 69; c) Trends Biochem. Sci. 2 (1977) 152; d) *Naturwiss. Rundsch.* 31 (1978) 236; e) L. Jaenicke in M. Balaban: *Molecular Mechanisms of Biological Recognition*, Elsevier-North-Holland, Amsterdam 1979, S. 395; f) *J. Sci. Ind. Res. C* 39 (1980) 819.
- [5] H. van den Ende: *Sexual Interaction in Plants*, Academic Press, New York 1976.
- [6] R. E. Moore, *Lloydia* 39 (1976) 181.
- [7] G. Thuret, *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. IV*, 2 (1854) 197.
- [8] A. H. Cook, J. A. Elvidge, R. Bentley, *Proc. R. Soc. (London) B* 138 (1951) 97.
- [9] D. G. Müller, *Arch. Mikrobiol.* 190 (1976) 89.
- [10] D. G. Müller, *Planta* 75 (1967) 39.
- [11] D. G. Müller, L. Jaenicke, *FEBS Lett.* 30 (1973) 137.
- [12] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr.* 117 (1975) 285.
- [13] G. Gassmann, unveröffentlicht.
- [14] D. G. Müller, G. Gassmann, K. Lüning, *Nature* 279 (1979) 430.
- [15] D. G. Müller, A. Peters, G. Gassmann, W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, *Naturwissenschaften* 69 (1982) 290.
- [16] A. P. Peters, D. G. Müller, persönliche Mitteilung.
- [17] D. G. Müller, L. Jaenicke, M. Donike, T. Akintobi, *Science* 171 (1971) 815.
- [18] M. J. Wynne, S. Loiseaux, *Phycologia* 15 (1976) 435.
- [19] L. Jaenicke, D. G. Müller, R. E. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 3324.
- [20] D. G. Müller, G. Gassmann, W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, *Science* 212 (1981) 1040.
- [21] R. E. Moore, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 40.
- [22] G. Ohloff, W. Pickenhagen, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 880.
- [23] D. G. Müller, F.-J. Marner, W. Boland, L. Jaenicke, G. Gassmann, *Naturwissenschaften* 67 (1981) 476.
- [24] D. G. Müller, *Naturwissenschaften* 59 (1972) 166.
- [25] D. G. Müller, K. Seferiadis, *Z. Pflanzenphysiol.* 84 (1977) 85.
- [26] L. Jaenicke, K. Seferiadis, *Chem. Ber.* 108 (1975) 225.
- [27] G. P. Bolwell, J. A. Callow, M. E. Callow, L. V. Evans, *J. Cell Sci.* 36 (1979) 19.
- [28] a) W. W. Youngblood, M. Blumer, R. L. Guillard, F. Fiore, *Mar. Biol.* 8 (1971) 190; b) T. G. Halsall, I. R. Hills, *Chem. Commun.* 1971, 448.
- [29] W. Boland, P. Ney, L. Jaenicke, *Synthesis* 1979, 1015.
- [30] L. Jaenicke, W. Boland, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1976, 1135.
- [31] W. Boland, L. Jaenicke, *J. Org. Chem.* 44 (1979) 4819.
- [32] W. Boland, K. Jakoby, L. Jaenicke, noch unveröffentlicht.
- [33] F. J. Marner, L. Jaenicke, *Chem. Ber.* 108 (1975) 2202.
- [34] W. Boland, L. Jaenicke, *Chem. Ber.* 111 (1978) 3262.
- [35] W. Boland, L. Jaenicke, D. G. Müller, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 2266.
- [36] R. Terlinden, Diplomarbeit, Universität Köln 1981.
- [37] T. Akintobi, L. Jaenicke, F.-J. Marner, S. Waffenschmidt, *Liebigs Ann. Chem.* 1979, 986.
- [38] F.-J. Marner, Dissertation, Universität Köln 1975.
- [39] M. Köser, Staatsexamensarbeit, Universität Köln 1978.
- [40] G. Helmchen, G. Nill, D. Flockerzi, M. S. K. Youssef, *Angew. Chem.* 91 (1979) 65; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1979) 63.
- [41] Th. Schotten, Diplomarbeit, Universität Köln 1982.

- [42] T. Kajiwara, Y. Sasaki, F. Kimura, A. Hatanaka, *Agric. Biol. Chem.* 45 (1981) 1461.
- [43] K. Yamada, M. Ojika, H. Tan, *Chem. Lett.* 1980, 1633.
- [44] K. Seferiadis, L. Jaenicke, *Z. Naturforsch. C* 33 (1978) 997.
- [45] F. Bohlmann, C. Zdero, D. Berger, A. Suwita, P. Mahanta, C. Jeffrey, *Phytochemistry* 18 (1979) 79.
- [46] W. Boland, L. Jaenicke, A. Brauner, *Z. Naturforsch. C* 37 (1982) 5.
- [47] R. G. Binder, W. F. Haddon, R. E. Lundin, A. C. Waiss, J. M. Klisiewicz, *Phytochemistry* 14 (1975) 2085.
- [48] P. Ney, Diplomarbeit, Universität Köln 1982.
- [49] D. E. Koshland, Jr., „Bacterial Chemotaxis as a Model Behavioral System“ in: *Distinguished Lecture Series of the Society of General Physiologists*, Vol. 2, Raven Press, New York 1980.
- [50] A. Geller, D. G. Müller, *J. Exp. Biol.* 92 (1981) 53.
- [51] D. G. Müller, *Z. Pflanzenphysiol.* 80 (1976) 120.
- [52] W. Boland, K. Jakoby, L. Jaenicke, D. G. Müller, *Z. Naturforsch. C* 36 (1981) 262.
- [53] W. Boland, R. Terlinden, L. Jaenicke, D. G. Müller, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
- [54] W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, D. G. Müller, noch unveröffentlicht.
- [55] K. E. Kaissling, E. Priesner, *Naturwissenschaften* 57 (1970) 23.
- [56] K. E. Kaissling in L. Jaenicke: *Biochemistry of Sensory Functions*, Springer, Berlin 1974.

## Synthetische Membranen – Herstellung, Struktur und Anwendung

Von Wolfgang Pusch\* und Axel Walch\*

Professor Klaus Weissemel zum 60. Geburtstag gewidmet

Im letzten Jahrzehnt sind die synthetischen Membranen aus ihrem Schattendasein herausgetreten, das sie lange Zeit zunächst als Membranfilter, später zusätzlich als Dialyse- und Ionenaustauscher-Membranen geführt haben. Ein wesentlicher Fortschritt in Richtung auf eine wirtschaftliche Verwendung war die Entwicklung von heterogenen und homogenen Ionenaustauscher-Membranen auf Kunstharzbasis in den fünfziger Jahren; dies führte zu einer vermehrten Anwendung der Elektrodialyse. Ionenaustauscher-Membranen der ersten Generation wurden und werden in Japan unter anderem zur Salzgewinnung durch Elektrodialyse aus Meerwasser verwendet. Die potentiellen Anwendungen für Elektrosynthesen, Batterieseparatoren und die Chlor-Alkali-Elektrolyse erforderten aber wesentlich resistenter Membranen, deren Herstellung erst in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung chemisch äußerst beständiger ionischer Polymere möglich wurde. So haben z. B. Ionenaustauscher-Membranen auf der Basis von Perfluoropolymeren große Bedeutung gewonnen. – Völlig andere Forderungen ergaben sich an Membranen für die Brack- und Meerwasserentsalzung und allgemein für die Ultrafiltration und Hyperfiltration, z. B. in der Nahrungsmittel- und Automobilindustrie oder auch in der chemischen Industrie. Die Grundlagen für die Entwicklung geeigneter Membranen wurden durch ein umfangreiches Programm zur Gewinnung von Trinkwasser aus Brack- und Meerwasser in den sechziger Jahren in den USA gelegt. Die Fortschritte wurden einerseits durch Anwendung elektronenmikroskopischer Methoden zur Strukturuntersuchung und andererseits durch Anwendung moderner Verfahren der Polymerchemie erreicht. Membranen mit wirtschaftlichen Permeabilitäten dürfen höchstens Dicken von 1000 bis 3000 Å haben. Die Herstellung derart dünner Filme war anfangs nur in Form asymmetrischer Membranen möglich, bei denen während der Membranbildung ein dünner Film auf einer porösen Stützmatrix entsteht. Da sich aber nur wenige Polymere zu asymmetrischen Membranen verarbeiten lassen, bedurfte es neuer Methoden zur Herstellung dünnster Filme. Es gelang, integrierte Membranen aus einer Stützmatrix und mechanisch sowie chemisch stabileren Filmen mit Dicken von teilweise nur 50 Å zu erzeugen. Mit den asymmetrischen und integrierten Membranen hat die Membranentwicklung einen gewissen Abschluß erreicht. Weiter gesteckte Ziele zur Herstellung von Membranen für sehr spezifische Trennprozesse, z. B. die Abtrennung von Schwermetallen aus Abwässern oder die selektive Anreicherung von Gasen, sind bereits in Angriff genommen worden. Für eine erfolgreiche Entwicklung auf diesen Gebieten erscheint es aber unerlässlich, Kenntnisse aus dem Bereich biologischer Membranen zu übertragen.

[\*] Priv.-Doz. Dr. W. Pusch  
Max-Planck-Institut für Biophysik  
Kennedy-Allee 70, D-6000 Frankfurt am Main 70  
Dr. A. Walch  
Kalle Niederlassung der Hoechst Aktiengesellschaft  
Rheingaustraße 190, D-6200 Wiesbaden 1

### 1. Einleitung

Membranen waren und sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten im Bereich der Physikalischen Chemie, der Polymerchemie, der Biologie, Medizin und Physiolo-