

Chemische Modifikation von Biopolymeren durch Chinone und Chinonmethide

Von Martin G. Peter*

Chinone und Vorstufen, die oxidativ in Chinone und/oder Chinonmethide umgewandelt werden können, sind in der Natur weit verbreitet. Als sekundäre Naturstoffe wirken sie häufig antibiotisch, cytotoxisch, aber auch pathogen, und eine Reihe von Pflanzen und Tieren benutzt chinoiden Substanzen als Abwehrstoffe, oft mit spektakulärem Erfolg. Auf makromolekularer Ebene spielen Chinonmethide im Pflanzenreich eine Schlüsselrolle bei der Biosynthese von Lignin, während die Bildung von Melanoproteinen ein Beispiel für Reaktionen von *o*-Chinonen im Tierreich ist. Bei den Insekten dienen Chinone und Chinonmethide zur Bildung des lebensnotwendigen Exoskeletts. Die Reaktivität von Chinonen in biologischen Systemen hat auch für den Menschen unmittelbare Bedeutung in pharmazeutischer, toxikologischer und technologischer Hinsicht. Den Beispielen in diesem Aufsatz liegt ein gemeinsames Prinzip zugrunde, nämlich die chemische Modifikation von Biopolymeren durch Chinone und Chinonmethide. Wie sich besonders bei einer detaillierteren Betrachtung der Reaktionen zeigt, die zur Sklerotisierung der Insektencuticula führen, sind in den letzten Jahren wichtige neue Erkenntnisse hinzugekommen, die vor allem durch die modernen Methoden der Stofftrennung und der Festkörper-NMR-Spektroskopie ermöglicht worden sind.

1. Einleitung

Chinone und Chinonmethide sind ebenso wie ihre phenolischen Vorstufen in der Natur weit verbreitet^[1]. Sie zeigen oft bemerkenswerte antibiotische, cytotoxische oder allergene Wirkungen, so daß sie vielen Pflanzen^[2, 3], marinen Organismen^[4], Pilzen^[5] und Insekten^[6] als vorteilhafte Verteidigungsmittel dienen können. Für den Menschen unmittelbar nützlich sind chinoiden Verbindungen z. B. in der Medizin bei der Chemotherapie bestimmter Tumoren oder in der Technik bei der Chinongerbung des Leders. Wir kennen aber auch unerwünschte Wirkungen von Chinonen und ihren Vorstufen, z. B. die mit der enzymatischen Bräunung einhergehende Qualitätsminderung von pflanzlichen Nahrungsmitteln. Schließlich sind einige Erkrankungen auf die Toxizität von bestimmten phenolischen Xenobiotica oder sogar auf den anomalen Metabolismus von endogenen phenolischen Wirkstoffen, z. B. Catecholaminen, zurückzuführen.

Auf molekularer Ebene beruhen die Wirkungen von chinoiden Verbindungen fast immer auf irreversiblen chemischen Modifikationen von Biopolymeren. Wenn ein Chinon als Xenobioticum wirkt, so resultiert daraus für das betroffene biologische System ein Nachteil. Reaktionen von Chinonen oder Chinonmethiden mit Biopolymeren können jedoch vorteilhaft oder sogar lebensnotwendig sein, wenn sie zur Konstruktion von makromolekularen Komplexen dienen, wie die Biosynthese von Melanoproteinen in Tieren, Lignopolysacchariden in Pflanzen oder Sklerotinen in Insekten zeigt.

Der vorliegende Aufsatz behandelt irreversible Reaktionen chinoider Verbindungen in biologischen Systemen. Reversible primäre Stoffwechselvorgänge wie der Elektronentransport in der Atmungskette werden nicht diskutiert. Der

Begriff „Chinoide“ soll hier *o*- und *p*-Chinone sowie die bei der Oxidation eines Diphenols auftretenden reaktiven Zwischenstufen umfassen. Unsere gegenwärtigen Ansichten über Reaktionen von chinoiden Verbindungen in biologischen Systemen gründen sich im wesentlichen auf Ergebnisse der präparativen und mechanistischen Organischen Chemie, die eine beeindruckende Vielfalt von Reaktionen und Reagentien zur Herstellung von Chinonderivaten aufweist (Übersichten:^[7-10]).

Versuche zur direkten Aufklärung der Mechanismen von Reaktionen chinoider Verbindungen in biologischen Systemen führten nur selten zur eindeutigen Identifizierung der Reaktionsprodukte. Der Grund liegt offensichtlich in der Instabilität der sich primär bildenden Zwischenstufen und der Komplexität der in Folgereaktionen daraus entstehenden Produktgemische. Diese Reaktionen können unter physiologischen Bedingungen nur schwer oder gar nicht kontrolliert werden. Anhand von Strukturen neuer Verbindungen, die manchmal bei synthetischen oder mechanistischen Untersuchungen aus komplexen Gemischen isoliert wurden, lassen sich jedoch Vorstellungen über die zu sekundären Produkten führenden Umwandlungen ableiten. Neben diesem klassisch orientierten Ansatz sind neuere Erkenntnisse vor allem aus Anwendungen moderner Methoden der Stofftrennung und Spektroskopie, insbesondere der ESR-, Hochfeld- und Festkörper-NMR-Spektroskopie, gewonnen worden.

Das Verständnis der chemischen Grundlagen von Reaktionen chinoider Verbindungen in biologischen Systemen ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer technischer Anwendungen oder die Verminderung von unerwünschten Effekten dieser Substanzen. Darüber hinaus ergeben sich oft neue Erkenntnisse über bedeutende Lebensprozesse. Ziel des vorliegenden Aufsatzes ist es, unser derzeitiges Wissen über das chemische Verhalten von Chinonen und Chinonmethiden in biologischen Systemen zusammenzufassen. Damit soll die kritische Auseinandersetzung mit

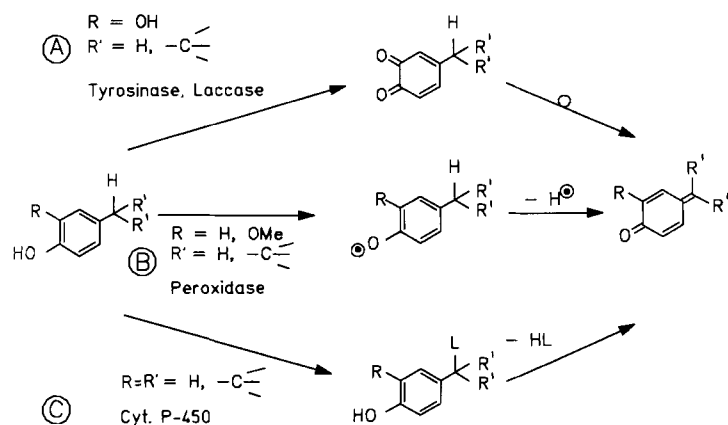
[*] Prof. Dr. M. G. Peter
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

der Reaktivität von Chinoiden in biologischen Systemen stimuliert und ein Beitrag zur Klärung einiger der noch offenen Fragen geleistet werden. Der erste Teil gibt eine allgemeinere Einführung in die Reaktivität von Chinoiden, die mit einigen Beispielen von naheliegender biologischer Relevanz illustriert werden. Im zweiten Teil folgt eine Betrachtung der strukturellen Zusammenhänge in Komplexen von Polyphenolen mit Biopolymeren. Daran schließt sich eine kritische Wertung der chemischen Modifikationen einzelner funktioneller Gruppen in Proteinen, Polysacchariden und Nucleinsäuren sowie deren Korrelation mit biologischen Wirkungen an. Schließlich werden die Mechanismen der Sklerotisierung der Insektencuticula als besonders illustratives Beispiel für die herausfordernde und faszinierende Komplexität von Chinon-Biopolymer-Wechselwirkungen in der Natur diskutiert.

2. Grundlagen

2.1. Biologische Oxidation von Phenolen

Die Varianten der enzymatischen Oxidation von 4-Alkyl-1,2-diphenolen und 4-Alkylmonophenolen zu Chinonen und Chinonmethiden sind in Schema 1 zusammengefaßt^[11, 12]. 2-Alkyl-1,4-diphenole reagieren analog.



Schema 1. (A), (B), (C) siehe Text.

Die Oxidation von Phenolen kann prinzipiell durch drei Enzyme katalysiert werden: Tyrosinase (Monophenol-Monooxygenase; EC 1.14.18.1) bewirkt die Hydroxylierung eines Monophenols in der *o*-Position. Dieses Enzym hat auch Diphenol-Oxidase-Aktivität, wobei in einem Zweielektronenübergang ein *o*-Diphenol zu einem *o*-Chinon oxidiert wird. In Gegenwart von diamagnetischen Metallionen lassen sich dabei ESR-spektroskopisch Semichinonradikale nachweisen^[13, 14]. Diese Radikale entstehen durch Komproportionierung eines *o*-Chinons mit überschüssigem Diphenol^[13, 15]. Sowohl *o*- als auch *p*-Diphenole werden durch Diphenol-Oxidasen vom Laccase-Typ in Eielektronenübergängen oxidiert. Die Tautomerisierung eines Alkylchinons führt schließlich zum entsprechenden Chinonmethid (Schema 1, Weg (A)).

Die durch Peroxidase (EC 1.11.1.7) katalysierte Oxidation von Monophenolen mit H₂O₂ liefert in einem Eielektronenübergang Phenoxylradikale. Falls die Seitenkette eines 4-Alkylmonophenols ungesättigt ist und in Konjugation mit dem Phenoxylradikal steht, gehört zu den möglichen Reso-

nanzstrukturen ein *p*-Chinonmethidradikal. Wenn die Seitenkette gesättigt ist, führt eine Radikalabstraktion zum Chinonmethid (Schema 1, Weg (B)). Die Peroxidase/H₂O₂-Oxidation von Diphenolen liefert ebenfalls Semichinonradikale. Die entsprechenden Radikalanionen von *o*-Diphenolen können ESR-spektroskopisch in Form ihrer Komplexe mit divalenten Metallionen nachgewiesen werden^[13, 16]. Semichinonradikale können auch in Eielektronenreduktionen von Chinonen mit Flavoenzymen, z. B. NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, entstehen. Die Reduktion von Sauerstoff durch Semichinonradikale führt zu Superoxid-Radikalanionen^[17]. Bei dem ebenfalls über Chinone vermittelten Elektronentransport von Superoxid zu Wasserstoffperoxid entstehen Hydroxylradikale^[18]. Auf die Mechanismen der Proteinmodifikation durch die hoch cytotoxischen und mutagenen Sauerstoffradikale^[19] soll in dieser Übersicht nicht eingegangen werden.

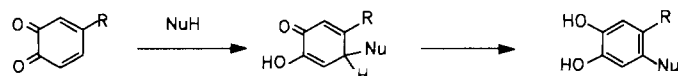
Der dritte Weg (Schema 1, Weg (C)) beschreibt die Bildung von Chinonmethiden durch zunächst oxidative Einführung einer Abgangsgruppe L in die Seitenkette und anschließende Elimination von HL. Im Zusammenhang mit der Thematik des vorliegenden Aufsatzes ist diese Reaktionssequenz vor allem für den Metabolismus bestimmter phenolischer Xenobiotica von Bedeutung. Er beginnt üblicherweise mit einer Hydroxylierung (L = OH) unter Beteiligung von Cytochrom P-450.

Chinone können unter physiologischen Bedingungen auch in nichtenzymatischen Reaktionen entstehen. Die Autoxidation eines Phenols führt zu einem Phenoxyl- oder einem Semichinonradikal. Das daraus durch Anlagerung von molekularem Sauerstoff gebildete Chinolhydroperoxid zerfällt unter anderem zum entsprechenden Chinon^[20, 21].

Chinone und Chinonmethide sind elektrophile Spezies, die Nucleophile vinylog addieren. Phenoxyl- und Semichinonradikale können zu Chinonmethiden umlagern oder über phenolische Kupplungsreaktionen oligomerisieren. Sowohl die nucleophile Addition als auch die oxidative phenolische Kupplung sind fundamentale Prozesse bei der Polymerisation von Phenolen.

2.2. Nucleophile Addition

Die Michael-artige vinyloge Addition eines Nucleophils an das α,β -ungesättigte Carbonylsystem eines Chinons ist lange bekannt (Schema 2).



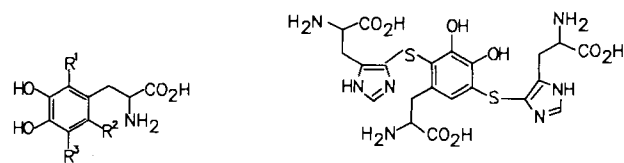
Schema 2.

Primärprodukt ist ein substituiertes Diphenol, das mit überschüssigem Oxidationsmittel, z. B. dem Chinon, ein substituiertes *o*-Chinon liefert. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen schließen sich weitere Schritte an: Mit R = H ist eine zweite Michael-Addition, gefolgt von der Oxidation zum disubstituierten *o*-Chinon, denkbar. Nach Wanzlick^[7] bezeichnet man diese Reaktionssequenz als A-D-A-D, wobei A für Addition und D für Dehydrierung steht. Schema 2 ist auf *p*-Chinone entsprechend anzuwenden.

In biologischen Systemen vollzieht sich die nucleophile Addition an Chinone und Chinonmethide gewöhnlich als

spontane, d. h. nicht enzymkatalysierte Reaktion. In Biopolymeren sind als nucleophile Gruppen Thiole, Thioether, primäre und sekundäre Amine sowie Hydroxygruppen der Seitenketten von Polypeptiden vorhanden. Polysaccharide enthalten überwiegend Hydroxygruppen, während im Zusammenhang mit Nucleinsäuren zusätzlich an aromatische Amine zu denken ist. Die biologische Relevanz von Schema 2 sei mit einigen Beispielen von Reaktionen, die zu strukturell definierten Verbindungen geführt haben, illustriert.

Oxidiert man Dopa in Gegenwart von Cystein mit Tyrosinase, so entsteht durch 1,4- und 1,6-Addition des Thiols an Dopa-Chinon ein Gemisch der Cysteinyl-Dopa-Verbindungen **1–4**^[22]. Diese sind wichtige Zwischenstufen der in Abschnitt 3 näher erläuterten Biosynthese von Phäomelaninen. Das Hauptprodukt ist das durch 1,6-Addition entstandene 5-Cysteinyl-Dopa **1**. Kalyanamaran et al.^[23] zeigten jedoch ESR-spektroskopisch, daß bei der Oxidation von 4-Methylbrenzcatechin mit Periodsäure in Gegenwart von Zn^{2+} bei $\text{pH} = 3$ ausschließlich das korrespondierende 1,4-Addukt entsteht. Die vinyloge Addition von Thiolen an 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) führt zu Semichinonradikalen, die sich sogar in Abwesenheit spinstabilisierender Metallionen ESR-spektroskopisch beobachten lassen^[24].



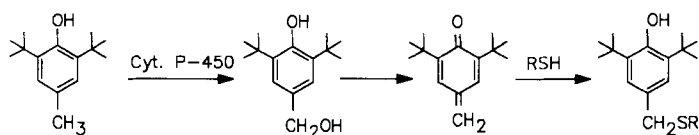
1-4

5

- 1: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = \text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+) \text{COO}^-$
 2: $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+) \text{COO}^-$
 3: $\text{R}^1 = \text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+) \text{COO}^-$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$
 4: $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+) \text{COO}^-$, $\text{R}^2 = \text{H}$

Das natürlich vorkommende Adenochromin **5** ist biogenetisch mit Bis(cysteinyl)dopa **4** verwandt. Dieser Naturstoff ist vermutlich eine Vorstufe der in *Octopus vulgaris* vorkommenden eisenbindenden Pigmente, der Adenochrome. Der Abbau von Adenochromen ergab die ungewöhnliche Aminosäure 5-Mercaptohistidin, die mit einer Dopa-Einheit verknüpft ist^[25].

Thiole lassen sich auch an Chinonmethide addieren, wie durch Isolierung des Cystein-Adduktes **6** an das aus 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol intermediär entstandene Chinonmethid überzeugend nachgewiesen ist (Schema 3, vgl. Schema 1, Weg ©)^[26].



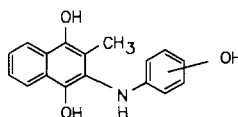
6

Schema 3.

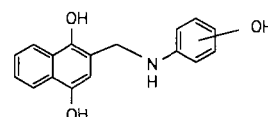
Primäre und sekundäre Amine addieren an Chinone gemäß der in Schema 2 gezeigten allgemeinen Reaktionsfolge (Übersichten: ^[7, 9, 10]). Die Additionsbereitschaft desamins hängt infolge seiner Basizität stark vom pH-Wert des Reaktionsmilieus ab. Schon 1913 wurde beschrieben, daß Anilin ($\text{pK}_a = 4.6$) bereits in Eisessig an *o*-Benzochinon zum Bis-

Additionsprodukt anlagert^[27]. Das Bis(anilino)benzochinon erhält man auch in wäßriger Lösung, wenn Brenzcatechin bei physiologischem pH-Wert mit Tyrosinase oxidiert wird^[28, 29]. In Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen lassen sich ESR-spektroskopisch Radikalanionen des Monoaddukts nachweisen^[23].

Beispiele für die Addition von aromatischen Aminen an die mit Alkylchinonen tautomeren Chinonmethide zeigt Schema 4 (vgl. Schema 1, Weg A). Bei der Reaktion von 3- oder 4-Aminophenol mit Menadion erhält man neben den klassischen Michael-Addukten **7** auch die Chinonmethid-Addukte **8**^[30].



7



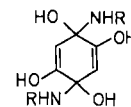
8

Schema 4.

Aliphatische Amine ($\text{pK}_a = 9-11$) liefern bestenfalls unter aprotischen Bedingungen A-D-A-D-Produkte in genügenden Ausbeuten. Als klassisches Beispiel sei die Herstellung von 4,5-Bis(dimethylamino)-1,2-benzochinon in wasserfreiem Aceton angeführt^[31]. Analoge Reaktionsprodukte sind neben Schiff-Basen nach Tyrosinase-katalysierter Oxidation von 4-Methylbrenzcatechin in Gegenwart von β -Alaninmethylester isoliert und spektroskopisch charakterisiert worden^[32].

Das bei der Oxidation von Dopamin entstehende *o*-Chinon kann zu 2,3-Dihydroindol-5,6-diol cyclisieren. Ein Vergleich der bei elektrochemischer Oxidation in wäßrigem Puffer bei $\text{pH} = 7.4$ beobachteten relativen Geschwindigkeit dieser intramolekularen Addition mit den Geschwindigkeiten der intermolekularen Addition einiger Nucleophile an Dopamin-Chinon führt zum folgenden aufschlußreichen Ergebnis^[33]: Die SH-Gruppe von Cystein reagiert ca. doppelt so schnell wie die von Glutathion und ca. 200mal so schnell wie Anilin. Die intermolekulare Addition dieses aromatischenamins verläuft zehnmal so schnell wie die intramolekulare Cyclisierung von Dopamin, die ihrerseits doppelt so schnell ist wie die intermolekulare Addition der Aminogruppen von α -Aminosäuren. Die Bevorzugung der intramolekularen gegenüber der intermolekularen Reaktion läßt sich auch am System Dopa-Chinon/*p*-Benzochinon demonstrieren^[34].

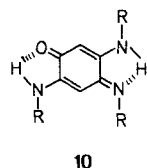
Grundsätzlich hiervon verschieden ist die 1,2-Addition von Aminen an eine Carbonylgruppe des chinoiden Systems. So liefert die Umsetzung von 2,5-Dihydroxy-*p*-benzochinon mit einigen biogenen Aminen in Ethanol die Tetrole **9**^[35]. Histamin addiert unter diesen Bedingungen mit der primären Aminogruppe statt mit dem Imidazol-Stickstoff. Mit *p*-Benzochinon und primären Aminen erhält man die üblichen 2,5-disubstituierten Produkte in der A-D-A-D-Sequenz.



9

$\text{R} = \text{PhCH}_2\text{CH}_2$, $p\text{-HO-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$, 4-Imidazolyl- CH_2CH_2

An die 1,2-Carbonyladdition schließt sich normalerweise eine Dehydratisierung zu den korrespondierenden Schiff-Basen an. Das aus der Kombination einer A-D-A-D-Sequenz mit einer Kondensation hervorgehende Reaktionsprodukt von *o*-Benzochinon mit Anilin im Molverhältnis 1:3 ist schon lange bekannt^[27–29]. Auch nach Umsetzung von aliphatischen Aminen mit *o*-Chinonen in Methanol^[36] oder Eisessig^[32] lassen sich die entsprechenden Produkte **10** isolieren; die Reaktionsmischungen sind in diesen Fällen jedoch sehr komplex und die Ausbeuten entsprechend mäßig bis äußerst gering.



10

R = Me, Et, *n*Bu [36], CH₂CH₂COOCH₃ [32]

Schiff-Basen können auch durch Tautomerisierung eines A-D-Produktes, z. B. eines 4-Alkyl-5-amino-*o*-chinons (vgl. Schema 2), zum korrespondierenden 2-Hydroxy-*p*-chinonimin entstehen. Bei den Schiff-Basen von aliphatischen Aminen, insbesondere von α -Aminosäuren, schließt sich leicht ein Strecker-Abbau an, bei dem das primäre Kondensationsprodukt zum Azomethin umlagert und dieses dann zum aromatischen Amin und dem korrespondierenden aliphatischen Aldehyd hydrolysiert.

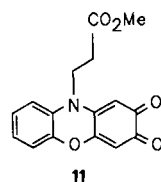
2.3. Heterocyclische Verbindungen aus Chinonen

Die Primärprodukte der Addition von Nucleophilen an Chinone und Chinonmethide können zu einer bemerkenswert großen Zahl heterocyclischer Verbindungen weiterreagieren. Diese Sekundärreaktionen sind – mit Ausnahme der Bildung von Zwischenstufen bei der Biosynthese von Melaninen (siehe Abschnitt 3) – im Zusammenhang mit der chemischen Modifikation von Biopolymeren in der Literatur fast immer unberücksichtigt geblieben. A priori läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß derartige Reaktionen in biologischen Systemen allgemeinere Bedeutung haben. Im folgenden sei daher die Bildung von Heterocyclen aus Chinonen und Chinonmethiden anhand einiger möglicherweise biologisch relevanter Beispiele kurz diskutiert (Übersicht: [37]).

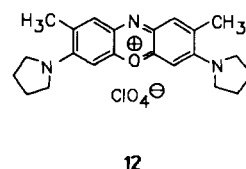
Die Umsetzung von *p*-Benzochinon mit *o*-Aminophenolen in Eisessig führt zu 2-Aminophenoxazin-3-on und höher kondensierten heterocyclischen Systemen^[38]. 2-Aminophenoxazin-3-on kann auch bei der Oxidation von *o*-Aminophenol in biologischen Systemen entstehen, wie kürzlich mit menschlichen Erythrocyten gezeigt wurde^[39]. Das Phenoxazin-Grundgerüst liegt in Naturstoffen bei den Actinomycin-Antibiotica und den Augenpigmenten von Insekten, den Ommochromen, vor, deren biomimetische Synthese ebenso gut untersucht ist wie die enzymatischen Schritte ihrer Biosynthese (Übersichten: [7, 40, 41]). Aus 2-Aminothiophenolen entstehen analog die entsprechenden Phenothiazinone^[42, 43].

Phenoxazinone können sich auch bei der Umsetzung von *o*-Chinonen mit aliphatischen Aminen bilden. So führt die

Oxidation von Brenzcatechin in Eisessig in Gegenwart von β -Alaninmethylester in niedriger Ausbeute zum *N*-Alkylphenoxazinchinon **11**^[32]. Diese Reaktion verläuft offensichtlich über ein *N*-Alkyl-*o*-aminophenol, das sich in einer A-D-A-D-Sequenz an ein weiteres Molekül *o*-Benzochinon anlagert. Nach Umsetzung von α -Aminosäuren mit 5-Methyl-4-pyrrolidino-1,2-benzochinon in wäßrigem Methanol isoliert man das Perchlorat **12**^[44]. In diesem Falle stammt der Stickstoff offensichtlich aus einer Aminosäure, deren Seitenkette in der Strecker-Reaktion abgebaut wird. Die Bildung der Phenoxazin-Ringsystems erfolgt hier durch Kondensation eines *o*-Aminophenols mit den Carbonylgruppen eines *o*-Benzochinons.

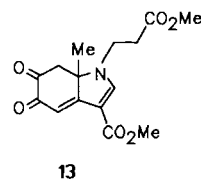


11

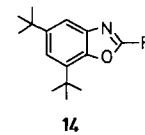


12

Das ungewöhnliche Indol-Derivat **13** wurde in geringer Ausbeute nach Oxidation von 4-Methylbrenzcatechin in Eisessig in Gegenwart von β -Alaninmethylester isoliert^[45]. Vermutlich wird der β -Alaninmethylester intermediär zum Enamin dehydriert. Dieses addiert in einer Nenitzescu-artigen Reaktion an 4-Methylbenzochinon. Nach vinyloger 1,4-*N*-Addition eines weiteren Moleküls β -Aminoester folgen Cyclisierung und Desaminierung.

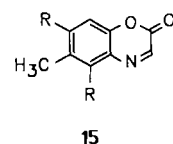


13

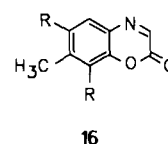


14

Die Benzoxazole **14** entstehen als stabile Additions/Kondensationsprodukte aus höher substituierten *o*-Chinonen, z. B. 3,5-Di-*tert*-butyl-*o*-benzochinon, und primären Aminen des Typs R-CH₂-NH₂^[46]. In diesen Fällen schließen sich an die Bildung der Schiff-Base eine Umlagerung und eine intramolekulare oxidative Cyclisierung an. Hier besteht eine Analogie zu der Reaktion von 3,5-Di-*tert*-butyl-*o*-benzochinon mit α -Aminosäureestern zu den entsprechenden Benzoxazinonen^[47]. Glycinethylester lagert sich an 4-Methyl-*o*-benzochinon unter Bildung der Benzoxazinone **15** und **16** an^[48].



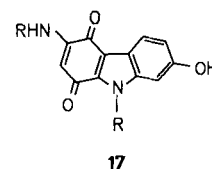
15



16

R = NHCH₂COOEt

2-Alkylamino-*p*-benzochinone können zu den Carbazolen **17** dimerisieren, die nach der Umsetzung von primären Alkylaminen^[49] oder Glycinethylester^[48] mit *p*-Benzochinon beobachtet wurden.



17

R = Alkyl, CH₂COOEt

3. Zur Struktur von Polyphenol-Biopolymer-Komplexen

Natürlich vorkommende Polyphenole haben grundsätzlich äußerst komplexe Strukturen. Umfangreiche Arbeiten über Modellreaktionen, Abbaubersuche und Studien zur Biosynthese dieser Biopolymere führten zu zahlreichen Partialstrukturen, aus denen sich Konstitutionsschemata wie einzelne Fragmente eines Mosaiks ableiten lassen. Die darin verborgenen Gesamtbilder sind jedoch noch nicht in allen Einzelheiten erkennbar. Insbesondere wissen wir sehr wenig über die exakte Verknüpfung der meist heterogenen, in den Polymeren statistisch verteilten Monomere. Eine umfassende Darstellung des aktuellen Standes der Chemie von Polyphenolen liegt außerhalb des Rahmens dieses Aufsatzes. Dennoch wird es nützlich sein, die wesentlichen Eigenschaften dieser Makromoleküle in Erinnerung zu rufen, bevor ihre Wechselwirkungen mit anderen Biopolymeren diskutiert werden. Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung der wichtigsten natürlich vorkommenden Polyphenole.

Tabelle 1. Klassifizierung von polyphenolischen Biopolymeren.

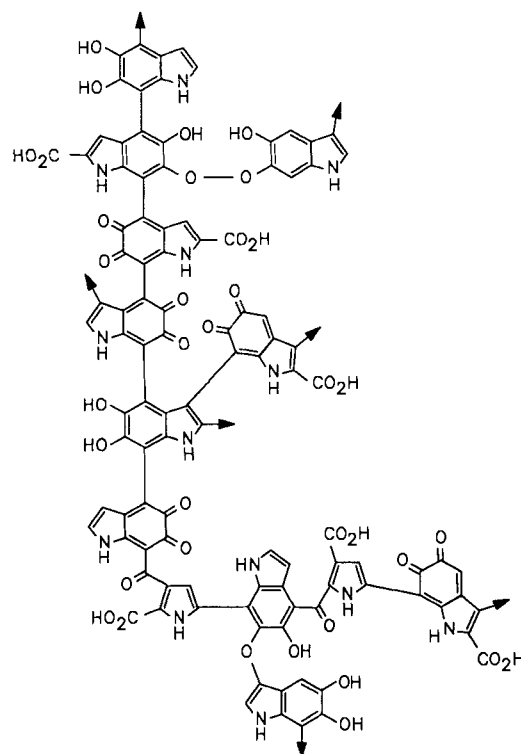
Polymer	phenolisches Monomer	Lit.
Eumelanin	Dopa, Dopamin oder Noradrenalin	[50, 51]
Phäomelanin	Dopa und Cystein	[50, 52]
Allomelanine	stickstofffreie Catechole	[50]
Lignin	Methoxy(propyl)phenole	[53, 54]
Lignine von Pilzen	Styrylpyrone	[55]
Tannine brauner Algen	Phloroglucin	[56–58]
Kondensierte Tannine	Flavonole	[59, 60]
Hydrolysierbare Tannine	Gallensäure und Glucose	[61]
Huminsäuren	diverse	[62]

Die Bindungen zwischen polyphenolischen Polymerisationsprodukten chinoider Vorstufen und anderen Biopolymeren, d. h. Proteinen, Polysacchariden und Nucleinsäuren, kommen grundsätzlich durch folgende Wechselwirkungen zustande:

- Abfangen von reaktiven Zwischenstufen (Chinonen, Chinonmethiden oder Radikalen) auf einer beliebigen Stufe des Polymerisationsprozesses. In diesen Fällen entstehen kovalente Bindungen. Der Komplex aus Polyphenol und einem anderen Biopolymer bildet sich entweder durch Polymerisation eines phenolischen Haptens mit weiteren Chinoniden oder durch Reaktion einer funktionellen Gruppe, z. B. eines Proteins, mit einem im Polyphenol vorhandenen reaktiven Zentrum.
- Nichtkovalente Assoziation zwischen einem Biopolymer und einem Polyphenol. Der makromolekulare Komplex wird in diesem Fall über eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.
- Biopolymere können natürlich auch durch Kombinationen von kovalenten und nichtkovalenten Kräften quervernetzt werden.

Die Tyrosinase-katalysierte Oxidation von Tyrosin oder Dopa führt zu dem äußerst heterogenen schwarzen Polymer Eumelanin (siehe [50, 51] zur Begriffsdefinition von Melaninen und [63] zur aktuellen Diskussion des Mechanismus der Melanin-Bildung). Als Zwischenstufe tritt 2,3-Dihydro-5,6-

dihydroxyindol-2-carbonsäure auf, die ihrerseits durch intramolekulare 1,4-Addition der α -Aminogruppe an das im Dopa-Chinon vorhandene *o*-chinoide System entsteht. Ein allgemein akzeptiertes Konstitutionsschema zeigt Schema 5^[50, 51]. Die im Polymer enthaltenen CN-, CC- und CO-Bindungen werden durch Additionen entsprechender nucleophiler Gruppen an *o*-chinoide Systeme oder durch oxidative phenolische Kupplungen gebildet. Bei der Polymerisation entstehen durch partiellen Abbau von Indoleinheiten auch Pyrrolcarbonsäuren, die das Konstitutionsschema weiter komplizieren. ESR-spektroskopisch lassen sich sowohl in synthetischen als auch in natürlichen Eumelaninen *o*-Semi-chinonradikale nachweisen^[64, 65]. Chinonmethide werden im Zusammenhang mit der Biosynthese von Eumelanin nicht als reale Zwischenstufen in Betracht gezogen.

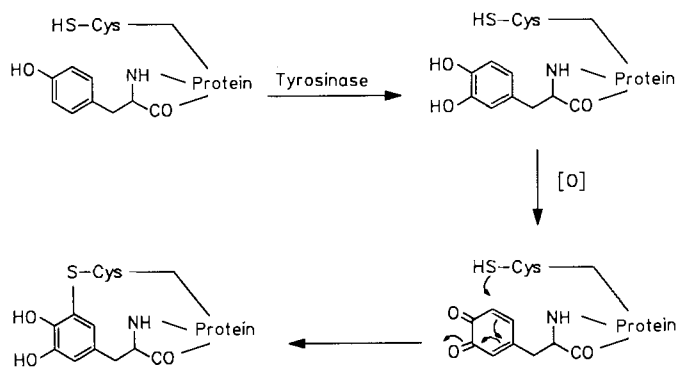


Schema 5.

Bekanntlich polymerisieren auch tyrosinhaltige niedermolekulare Peptide unter Einwirkung von Tyrosinase^[66]. In Abhängigkeit von der Position des Tyrosinrestes in der Aminosäuresequenz treten dabei UV-spektroskopisch unterscheidbare Zwischenstufen auf: Ein *N*-terminaler Tyrosinrest wird zum Dopachrom-Typ oxidiert, während die Positionierung innerhalb der Sequenz oder am *C*-Terminus das UV-Spektrum eines *N*-Acyl-Dopa-Chinons (d. h. eines *o*-Chinons) liefert. Im Gegensatz zu den aus freiem Tyrosin mit Tyrosinase entstehenden unlöslichen Eumelaninen sind die durch Oxidation von tyrosinhaltigen Peptiden erzeugten Polymere wasserlöslich.

Natürlich vorkommende Eumelanine sind stets mit Proteinen verknüpft. Die Tyrosinase-katalysierte Oxidation von Dopa führt in Gegenwart von Proteinen zu Reaktionsprodukten, die nach saurer Hydrolyse Cysteinyl-Dopa liefern^[67]. Ito et al. zeigten kürzlich, daß auch bei Behandlung von Proteinen mit Tyrosinase peptidgebundene 5-Cysteinyl-Dopa-Einheiten entstehen^[68]. Der Mechanismus dieser Reaktion ist als enzymkatalysierte Hydroxylierung von Tyro-

sinresten zu Dopa-Resten, gefolgt von Oxidation zum korrespondierenden *o*-Chinon und nucleophiler Addition von peptidgebundenem Cysteinyl-SH zu verstehen (Schema 6).

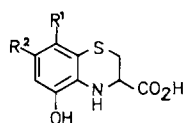


Schema 6.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Biosynthese von Melanoproteinen über Michael-artige 1,6-Additionen von Cysteinyl-SH an Dopa-Chinon verläuft, das durch Oxidation sowohl von freiem als auch von peptidgebundenem Tyrosin entstehen kann.

Allgemein wird angenommen, daß die Konstitution von Dopamin-Melanin der des Dopa-Melanins ähnlich ist. CP/MAS- ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch kürzlich, daß das Polymer von Dopamin hohe Anteile an aliphatischen C-Atomen enthält und infolgedessen weitgehend aus Dihydroindol- und Dopamin-Einheiten aufgebaut sein muß^[69].

Die Oxidation von Dopa führt in Gegenwart von Cystein zu den braunen Phäomelaninen. Prinzipielle Zwischenstufen sind hierbei die Cysteinyl-Dopa-Derivate **1–4** und die Dihydrobenzothiazine **18** und **19**, die aus der intramolekularen Cyclisierung von **1** bzw. **3** zum entsprechenden *o*-Chinonimin hervorgehen^[52]. Offensichtlich ist hierbei die Bildung der Schiff-Base und deren Reduktion durch überschüssiges Diphenol gegenüber der intramolekularen 1,4-Michael-Addition bevorzugt. Neuere ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchungen lieferten Hinweise dafür, daß bei der Polymerisation von 5-Cysteinyl-Dopa die Seitenketten der Dopa- und Cystein-Einheiten teilweise abgebaut werden^[70].



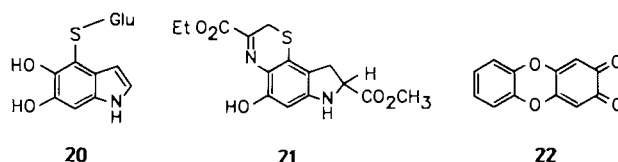
18, 19

18: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$
19: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$, $\text{R}^2 = \text{H}$

Die Grenze zwischen Eumelaninen und Phäomelaninen ist anhand von biosynthetischen oder strukturellen Kriterien nicht eindeutig definierbar. 5-Cysteinyl-Dopa ist zwar ein schlechtes Substrat für Tyrosinase, die enzymatische Oxidation wird jedoch durch Dopa beschleunigt. Daher lassen sich Dopa und 5-Cysteinyl-Dopa enzymatisch oxidativ copolymerisieren, wobei die relativen Anteile der monomeren Edukte mit den Schwefelgehalten der Polymere korrelieren^[71]. Derartige Mischpolymere können ESR-spektroskopisch charakterisiert werden^[72].

Oxidiert man 5,6-Dihydroxyindol mit Tyrosinase in Gegenwart von Glutathion, so erhält man das Addukt **20**^[73]. Das Tetrahydrothiazinoindol **21** wurde aus Produktgemischen der Reaktion von Dopachrommethylester mit Cysteinethylester oder Glutathion isoliert^[74]. Diese bemerkenswerten Resultate lassen vermuten, daß die kovalente Verknüpfung von Cysteinyl-SH mit Melaninen bei der Biosynthese von Melanoproteinen nicht nur auf der Stufe des Dopa-Chinons, sondern auch auf der Ebene von indolischen, eventuell sogar oligomeren Zwischenstufen erfolgen kann.

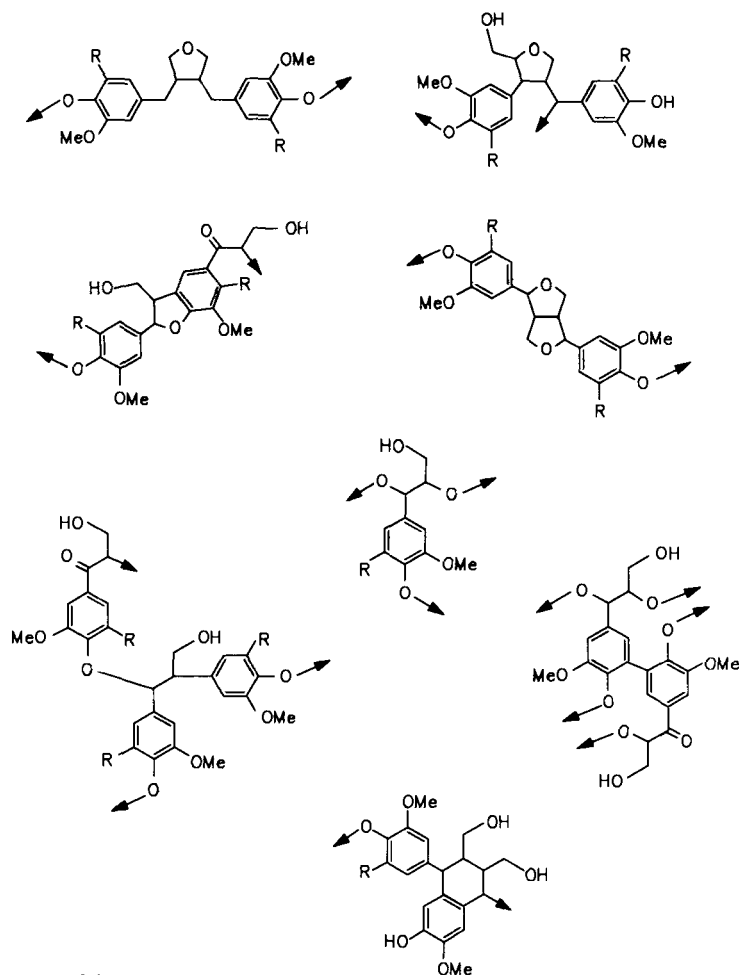
Die enzymatische Oxidation von stickstofffreien Catecholen führt zu dunklen Polymeren, den Allomelaninen. Hinsichtlich deren Struktur ist lediglich bekannt, daß die Monomere über CC- und CO-Bindungen verknüpft sind (Übersicht: ^[50]). Allomelanine können sowohl durch Michael-Addition von H_2O als auch durch Anlagerung phenolischer Hydroxygruppen von nicht oxidiertem Edukt entstehen, wie die Struktur des nach Oxidation von Brenzcatechin



isolierten Dibenzodioxinchinons **22** nahelegt^[75]. Eine präparative Synthese von **22** wurde kürzlich von *Eugster et al.*^[76] mitgeteilt. Das Dibenzodioxin-Ringsystem kommt in der Natur bei den Ecklonochinonen vor^[76]. Die Polymerisation von Catecholen kann außer über nucleophile Additionen auch über radikalische Phenolkupplung erfolgen. In einigen Allomelaninen ist Stickstoff enthalten, der höchstwahrscheinlich aus Aminosäureresten von Proteinen stammt^[50]. Die Anwesenheit von Stickstoff ist jedoch kein sicheres Indiz für die Verknüpfung von Allomelaninen mit intakten Aminosäureresten, da diese in der Strecker-Reaktion abgebaut werden können (vgl. Formel **12**).

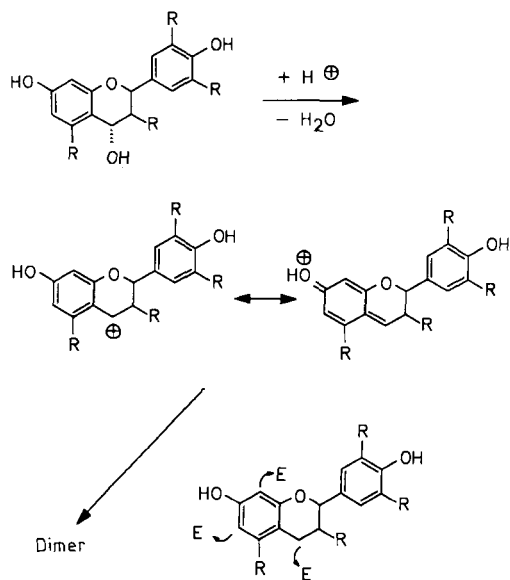
Wie heute aufgrund der klassischen Arbeiten *Freudenbergs*^[53] bekannt ist, entstehen Lignine durch Polymerisation von *p*-Hydroxy-*m*-methoxyphenylpropyl-Einheiten. Der primäre Peroxidase-katalysierte Einelektronenentzug führt von diesen Phenolen zunächst zu Phenoxyl- und *p*-Chinonmethyldradikalen (vgl. Schema 1, Weg **(B)**). Deren Polymerisation resultiert in einer außerordentlich großen Zahl von Bindungstypen, von denen einige in Schema 7 dargestellt sind^[54]. Lignine enthalten keinen Stickstoff.

In den Tanninen von braunen Meeresalgen sind Phloroglucin-Einheiten über CC- und CO-Bindungen miteinander verknüpft^[57, 58]. Die Biosynthese dieser Polyphenole verläuft wahrscheinlich über oxidative Kupplungen von Phenoxyl- und Arylradikalen. Es ist vorstellbar, daß die Phenole auch mit Tyrosinresten von Proteinen kuppeln, so daß kovalente Bindungen zwischen Polyphenolen und Polypeptiden entstehen. Tatsächlich enthalten die hochmolekularen Algentannine wechselnde Mengen Stickstoff^[56]. Schwefel wurde in Form von Sulfatgruppen nachgewiesen^[58]. Oligomere Phloroglucine kommen auch in einigen Farnen vor^[77], wobei ein prinzipieller Strukturunterschied zu den Algentanninen darin besteht, daß die Monomere hier über Methylenbrücken miteinander verknüpft sind.



Schema 7. R = H, OMe

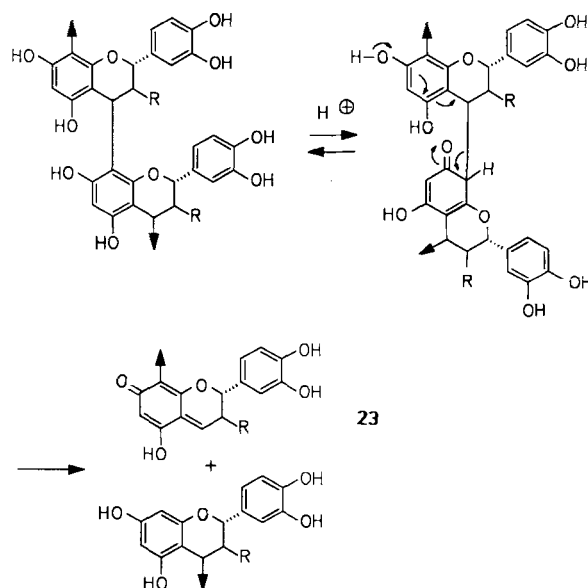
Pflanzliche Tannine teilt man üblicherweise in zwei Gruppen ein: die hydrolysierbaren und die kondensierten Tannine. Die Vertreter der ersten Gruppe sind aus Glucose und radikalisch oligomerisierten Gallensäuren aufgebaut^[61], die kondensierten Tannine bestehen dagegen aus 3- und 4-Hydroxyflavanolen. Aufgrund der von Roux und Ferreira^[59] durchgeführten eleganten biomimetischen Synthesen von oligomeren Flavanolen ist anzunehmen, daß deren Polymerisation zu den Tanninen über Carbenium-Ionen oder über Chinonmethide führt (Schema 8).



Schema 8. R = H, OH

Komplexe aus pflanzlichen Tanninen und Proteinen sind insbesondere aufgrund ihrer Bedeutung in der Ledergerbung und ihrer unerwünschten Effekte auf die Qualität von pflanzlichen Nahrungsmitteln intensiv untersucht worden. Eine ältere, recht umfassende Übersicht gibt das klassische Buch von Gustavson^[78]. Nach weit verbreiteter Ansicht beruht die Assoziation beider Gruppen von Tanninen mit Collagen auf nichtkovalenten Wechselwirkungen. Eine maximale Bindung wird im pH-Bereich 3–5 beobachtet, was auf ionische Wechselwirkungen positiv geladener Seitenketten von Lysin- und Argininresten mit sauren Gruppen der Tannine hinweist^[79]. Starke Bindungen findet man jedoch auch in Komplexen von Tanninen mit synthetischen Polyamiden, Polyvinylpyrrolidon oder Polykondensaten aus Harnstoff mit Formaldehyd, die keine basischen Funktionen enthalten. In diesen Fällen müssen die Komplexe über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polyphenolischen Hydroxygruppen und Amid-Carbonylgruppen stabilisiert werden. Mit kondensierten Tanninen beobachtet man eine Denaturierung von Proteinen nur bei einem Polymerisationsgrad ≥ 6 ^[80]. Quantitative Untersuchungen über reversible, nichtkovalente Protein-Polyphenol-Wechselwirkungen wurden erst kürzlich veröffentlicht^[81].

Mit chaotrophen Agentien, z.B. 8 M Harnstofflösung, lassen sich die Komplexe aus hydrolysierbaren Tanninen und Collagen aufbrechen, während kondensierte Tannine nicht vollständig von Proteinen abgetrennt werden können. Wahrscheinlich existieren in diesen Komplexen auch kovalente Bindungen, die rein hypothetisch durch Abfangen des im Säuren aus Proanthocyanidin entstehenden Chinonmethids **23** durch nucleophile funktionelle Gruppen des Proteins entstehen können (Schema 9)^[82]. Diese Interpretation wird da-



Schema 9. R = H, OH

durch untermauert, daß UV-spektroskopisch die Bildung eines Chinonmethids aus 4,7-Flavandiol in saurer Lösung nachgewiesen und ein Addukt mit Thiophenol isoliert werden konnte^[83]. Natürlich kann auch das korrespondierende Carbenium-Ion als reaktive Zwischenstufe auftreten. Eine Abfangreaktion von flavanoiden Chinonmethiden bzw. Carbenium-Ionen mit Sauerstoff- oder Stickstoff-Nucleophilen ist bisher nicht bekannt.

Die Huminsäuren sind wohl die kompliziertesten polyphenolischen Biopolymere. Ihre Chemie und Biochemie ist informativ in einer umfassenden Monographie dargestellt^[62]. Sie entstehen unter anderem aus anderen polyphenolischen Polymeren und enthalten auch die für Proteine typischen Heteroelemente. Huminstoffe werden manchmal als Endprodukte von Biomaterialien im Boden bezeichnet.

4. Reaktionen von funktionellen Gruppen in Biopolymeren mit Chinonen und Chinonmethiden

In Abschnitt 3 haben wir biologisch wichtige makromolekulare Komplexe aus Polyphenolen und anderen Biopolymeren unter dem Aspekt der molekularen Verknüpfung der Komponenten betrachtet. Im folgenden soll nun die biologische Wirkung von Chinoiden mit Strukturveränderungen zellulärer Bestandteile korreliert werden.

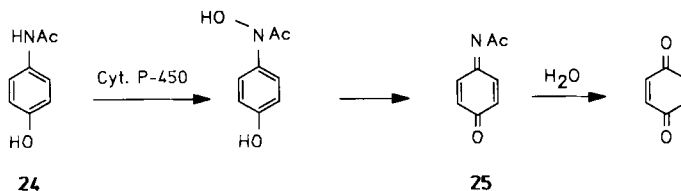
4.1. Reaktionen von Thiolen und Sulfiden

Im wäßrigen Milieu der Zelle sind die stärksten Nucleophile Cystein-SH-Gruppen. Reaktionen von Cystein mit einer Reihe von Chinonen wurden zuerst von *Mason* und *Peterson*^[84] UV-spektroskopisch untersucht, um Erkenntnisse über die Biosynthese von Melanoproteinen zu gewinnen. Ähnliche Versuche wurden später von *Pierpoint*^[85] mit Chlorogen- und Kaffeesäure beschrieben. Der erste Strukturbeweis eines Additionsproduktes von Cystein an ein enzymatisch erzeugtes *o*-Chinon gelang aber erst viel später nach Isolierung der isomeren Cysteinyl-Dopa-Derivate **1–4** durch *Ito* und *Prota*^[22]. Inzwischen liegen auch zahlreiche Berichte über Thiol-Additionen von Peptiden, insbesondere Glutathion, vor, wobei eine Reihe von Chinoiden entweder in vivo oder in vitro als Michael-Acceptoren wirken können.

Östradiol wird mit Tyrosinase zu einem Gemisch von 2,3,17- und 3,4,17-Östratriol oxidiert, wobei in Gegenwart von Zn^{2+} Semichinonradikale beobachtbar sind^[13]. Diese „Catecholöstrogene“ liefern Semichinonradikale auch bei der Autoxidation in alkalischer Lösung oder bei Einwirkung von Peroxidase/ H_2O_2 . Die Cytotoxizität von Catecholöstrogenen beruht vermutlich entweder auf der Bildung von Semichinonradikalen oder auf der Oxidation zum *o*-Chinon. Das 3,4-Catechol ist wahrscheinlich stärker cytotoxisch als das 2,3-Catechol. Die mehrfach beschriebene Bindung von 17-Ethinyl-2,3,17-östratriol an Rattenlebermikrosomen ist vermutlich auf eine Addition von proteingebundenen SH-Gruppen an das korrespondierende 3,4-*o*-Chinon zurückzuführen^[86].

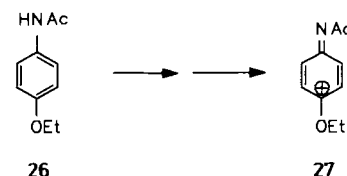
Das Analgeticum 4'-Hydroxyacetanilid (Paracetamol) **24** kann in hoher Dosierung bei Säugetieren Lebernekrosen auslösen. Als Ursache für die Cytotoxizität wird der Metabolismus von **24** zu *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin **25** und dessen Hydrolyse zu *p*-Benzochinon angesehen (Schema 10). Die Oxidation von **24** wird durch eine von Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase^[87] oder auch durch Prostaglandin-H-Synthetase^[88] katalysiert. In vitro läßt sich ein Addukt aus **25** und Glutathion nachweisen^[87, 88]. Wenn der Vorrat der Zellen an Glutathion erschöpft ist, bindet **25** vermutlich kovalent an Proteine. Neben der SH-Addition findet

unter physiologischen Bedingungen eine weitgehende Polymerisation von **25** statt.



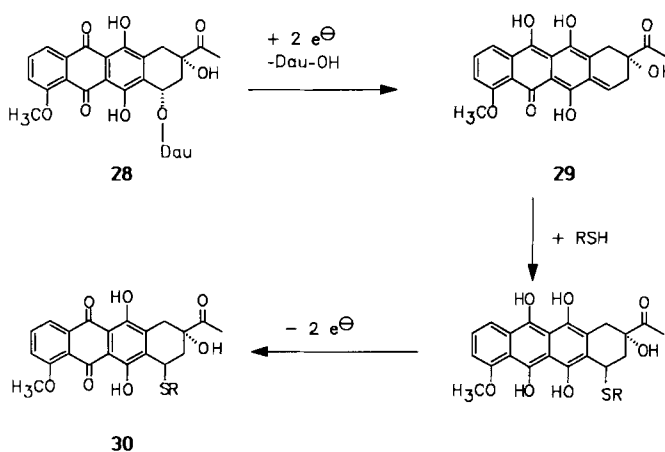
Schema 10.

Der Austausch der Hydroxygruppe von **24** gegen eine Ethoxygruppe führt zu dem ebenfalls analgetisch wirksamen Phenacetin **26**. Dieses ist im Unterschied zu **24** schwach carcinogen; als Ursache hierfür wird die Bildung des Nitrenium-Ions **27** statt des *p*-Chinonimins **25** diskutiert^[89] (Schema 11).



Schema 11.

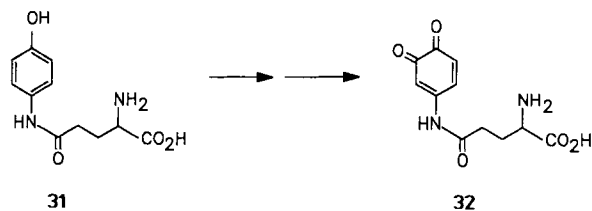
Die antitumorale Wirkung von Daunomycin **28** und verwandten Anthrachinon-Antibiotica wird auf eine Intercalation in DNA, Quervernetzung von Doppelsträngen und Induzierung von Einzelstrangbrüchen – entweder durch Sauerstoffradikale oder nucleophile Additionen – zurückgeführt (Übersicht: ^[90]). Die Hypothese einer chemischen Modifikation von Biopolymeren durch nucleophile Addition wird durch Isolierung der Produkte **30** in Modellreaktionen gestützt. Reaktive Zwischenstufe ist dabei wahrscheinlich das durch Elimination der Zuckereinheit aus dem enzymatisch reduzierten Anthrachinon entstehende Chinonmethid **29** (Schema 12)^[91].



Schema 12. Dau = 1-β-3-Amino-2,3,6-tridesoxy-L-lyxohexosyl;
R = $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOH}$ bzw. 1-β-D-Glucosyl.

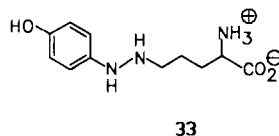
Einige Cysteinyl-Dopa-Verbindungen und Cysteaminyl-phenole sind selektiv cytotoxisch und hemmen das Wachstum bestimmter Tumoren^[92]. Man vermutet, daß diese biologische Wirkung darauf beruht, daß das chinoides Oxidationsprodukt (z. B. von **1**) mit SH-Gruppen von Enzymen der DNA-Biosynthese reagiert.

Das Glutaminyl-Derivat **31** kommt im Pilz *Agaricus bisporus* vor^[93]. Die enzymatische Oxidation von **31** führt zum *o*-Benzochinon **32** (Schema 13), das ein wirksamer Hemmstoff von SH-abhängigen Enzymen des Elektronentransports ist^[93] und antineoplastische Aktivität in Melanomzellen von Mäusen zeigt^[94].



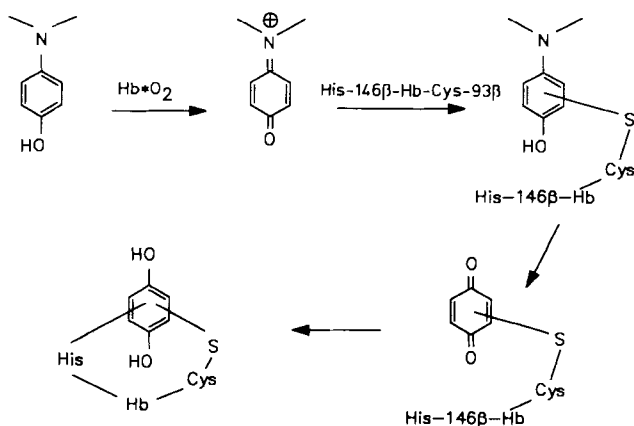
Schema 13.

Eine verwandte Pilzart, *A. xanthoderma*, enthält das ungewöhnliche Phenylhydrazin-Derivat **33** neben 4-Diazocyclohexadienon^[95]. Extrakte dieses Pilzes haben eine ausgeprägte antibiotische und cytotoxische Aktivität.



33

Die Oxidation von 4-(Dimethylamino)phenol durch Oxyhämoglobin bewirkt den Verlust von Cystein- und Histidinresten des Proteins^[96]. Man nimmt an, daß der Cystein-93β-Rest des Hämoglobins an das korrespondierende *p*-Chinoniminium-Ion addiert. Autoxidation des Addukts und nachfolgende Hydrolyse führen zum substituierten *p*-Chinon, das nun Histidin-146β des Hämoglobins anlagert (Schema 14). Die Struktur des Addukts ist nicht eindeutig nachgewiesen; die Hypothese wird jedoch durch partiellen Abbau des chemisch modifizierten Hämoglobins mit Trypsin und nachfolgende Aminosäureanalyse gestützt.

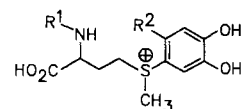


Schema 14.

Der anomale Metabolismus von Catecholaminen im Gehirn kann zu schweren Neuropathien führen. Man vermutet, daß dabei kovalente Modifikationen von Proteinen in catecholaminergen Neuronen eine Rolle spielen^[33]. Nach in-vitro-Oxidation des äußerst neurotoxischen 6-Hydroxydopamins in Gegenwart von Glutathion wurde 6-(2-Aminoethyl)-2,3,5-trihydroxyphenylglutathion isoliert. Das gleiche

Addukt erhält man auch im Tierversuch, so daß der vorgeschlagene Mechanismus plausibel erscheint^[97].

Methioninreste von Proteinen addieren sich im sauren pH-Bereich mit den Sulfidgruppen vinyllog an *o*-Benzochinon. Diese Reaktion kann bei der Untersuchung von Proteinstrukturen, insbesondere der pH-Abhängigkeit von Konformationen, nützliche Dienste leisten^[98]. Indirekte Hinweise für die 1,4-Addition von *N*-Acetylmethionin an *o*-Benzochinon^[99] und Dopa-Chinon^[100] ergaben sich bei UV-spektroskopischen Untersuchungen, wobei die Strukturen **34** bzw. **35** vorgeschlagen wurden. Bei physiologischem pH-Wert findet die Sulfid-Addition an Chinone aber offenbar nicht statt^[23].



34, 35

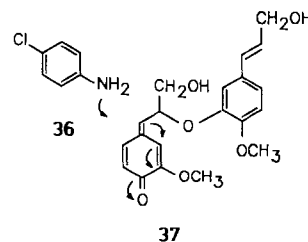
34: R¹ = Ac, R² = H

35: R¹ = H, R² = CH₂CH(NH₃⁺)COO⁻

Analog wird anscheinend auch die seltene Aminosäure Selenomethionin (Übersicht: ^[101]) an *o*-Benzochinon addiert. Die Struktur des in 1 N HCl gebildeten Produkts wurde entsprechend **34** (Se statt S) formuliert^[102].

4.2. Reaktionen von Aminogruppen

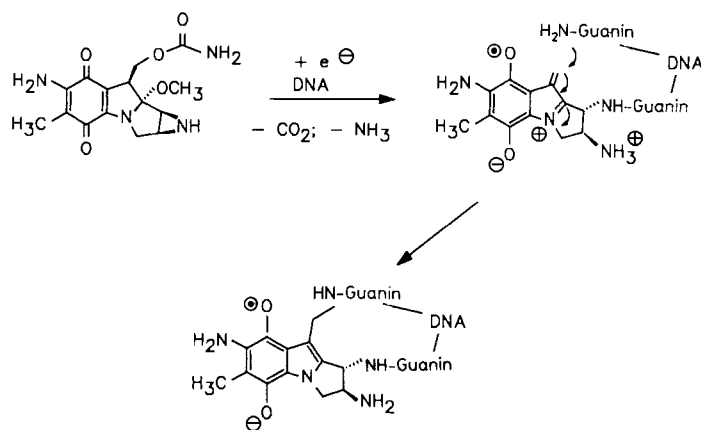
Die Peroxidase/H₂O₂-katalysierte Oxidation von Coniferylalkohol bei pH = 7.5 führt in Gegenwart von **36** zum Einbau des aromatischenamins in das synthetische Lignin^[103]. Die Copolymerisation verläuft laut ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren über das in Schema 15 gezeigte Chinonmethid **37**.



Schema 15.

Es ist leicht vorstellbar, daß die in Nucleinsäuren besonders häufig vorkommenden heteroaromatischen Amine an Chinone oder Chinonmethide addieren können. Erstaunlicherweise wurden aber entsprechende Produkte bisher nicht isoliert. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß das Antitumor-Antibiotikum Mitomycin C eine Quervernetzung von DNA über Guaninreste bewirkt. Der kürzlich in einer Modellreaktion entdeckte, in Schema 16 wiedergegebene Mechanismus zeigt jedoch, daß die Quervernetzung über Iminium-Ionen und nicht über die zuvor postulierten Chinonmethide verläuft^[104].

Eine andere Gruppe von biologisch aktiven chinoiden Naturstoffen soll ebenfalls hier erwähnt werden, obwohl ihre Wirkungsweise noch nicht aufgeklärt ist. Die sesquiterpenoiden Monoaminochinone **38** und **39** wurden aus dem Meereschwamm *Dysidea avara* isoliert^[105]. Sehr wahrscheinlich entstehen sie als Artefakte bei der Extraktion aus Avarol **40**.



Schema 16.

Sowohl Avarol **40** als auch die Aminochinone **38** und **39** beeinträchtigen die Entwicklung von Seeigelleiern. Verwandte Verbindungen mit cytotoxischer und antimikrobieller Aktivität kommen auch in Schwämmen der Spezies *Smenospongia* vor^[106].



38, 39

38: $R^1 = H$, $R^2 = NHCH_3$
39: $R^1 = NHCH_3$, $R^2 = H$

40

Aliphatische Amine ($pK_a = 9-11$) gibt es in biologischen Systemen in großer Vielfalt. Primäre Amine sind in Form von Catecholaminen, ϵ -Aminogruppen von freien und peptidgebundenen Lysinresten sowie α -Aminogruppen von freien und N -terminalen peptidgebundenen Aminosäuren vorhanden. Sekundäre Amine sind durch N -terminale Prolin- und Hydroxyprolinreste repräsentiert; die Imidazolgruppe von Histidin ($pK_a = 6.05$) nimmt eine Zwischenstellung zwischen aliphatischen und aromatischen Aminen ein.

Reaktionen von Aminosäuren und Proteinen mit enzymatisch erzeugten Chinonen führen gewöhnlich zu komplexen Gemischen, die noch nicht in die einzelnen Komponenten getrennt werden konnten. Sie wurden jedoch eingehend UV-^[84, 85] und neuerdings ESR-spektroskopisch^[123] untersucht. *Mason* und *Peterson*^[84] fanden, daß Amide, Harnstoff- und Guanidin-Gruppen, 3-substituiertes Indol und 4-substituiertes Imidazol sowie Serin-OH nicht mit einigen enzymatisch in situ erzeugten o -Chinonen reagieren. Die UV-Spektren deuteten jedoch auf eine Reaktion mit primären und sekundären aliphatischen Aminen und Thiolen hin. Zu ähnlichen Resultaten kam *Pierpoint*^[85], der die UV-Spektren von Gemischen aus Phenol-Oxidase, Aminosäuren und Chlorogen- oder Kaffeesäure als Indiz dafür wertete, daß primäre Aminogruppen von α -Aminosäuren und die ϵ -Aminogruppe von Lysin addiert worden waren.

ESR-Spektren von Reaktionsgemischen aus N -Acetyldopamin, primären Aminen und Tyrosinase liefern bei physiologischem pH-Wert unter Bedingungen der Spin-Stabilisierung mit Zn^{2+} -Ionen keinen Hinweis auf die Bildung von

D-A-Produkten^[14]. *Kalyanamaran* et al.^[123] gelangten aufgrund ähnlicher Versuche zu folgendem Schluß: α -Aminosäuren liefern 1,4-Additionsprodukte bei $pH \geq 8$; Lysin und Histidin addieren mit der α -Amino- statt der ϵ -Aminogruppe oder des Imidazol-Stickstoffs. Die sekundäre Aminofunktion von Hydroxyprolin addiert bereits bei physiologischem pH-Wert, während die N -Termini von Peptiden aufgrund der mit steigender Kettenlänge einhergehenden Abnahme der Basizität sogar im schwach Sauren reagieren. Die N -Addition von Prolin an 4-Methyl- o -benzochinon wurde bereits vor 40 Jahren von *Jackson* und *Kendal*^[107] im Zusammenhang mit der Untersuchung eines violetten Pigments diskutiert, das autoxidativ in Rohextrakten aus Pilzen oder Kartoffeln entsteht. *Weaver* et al.^[93] führen diese Farbe allerdings auf die Bildung von γ -Glutaminy-3,4-benzochinon zurück.

Der allergene Wirkstoff von giftigem Efeu (*Toxicodendron radicans*, Anacardiaceae) ist das aus einem Gemisch der 3-Hexadec(en)yl- und 3-Pentadec(en)ylbrenzcatechine **41** bestehende Urushiol. Wiederholter Kontakt mit der Pflanze führt zur schweren allergischen Dermatitis. Man nimmt an, daß die Toxizität von Urushiol auf der Oxidation der Brenzcatechine zu den o -Chinonen beruht, wobei die pharmakologische Wirkung durch die lipophilen Seitenketten verstärkt wird. Auf molekularer Ebene soll die Addition von Mercapto- und Aminogruppen an das o -Chinon gemäß Schema 2 zur chemischen Modifikation von Serumproteinen und damit zu deren Umwandlung in Antigene führen. Diese Hypothese wurde indirekt durch Isolierung entsprechender Additionsprodukte in Modellversuchen^[108] sowie in Studien zur Bindung von vermutlich o -chinoiden Oxidationsprodukten einiger Alkylbrenzcatechine an Proteine^[109] bestätigt. Wenn man γ -Globulin auf eine Säule, die mit Chinon imprägniertes Celite enthält, aufträgt und anschließend eluiert, so beobachtet man eine teilweise irreversible Retention des Proteins^[109]. Der gebundene Anteil ist dann besonders hoch, wenn das Chinon durch Oxidation von 3-Pentadecylbrenzcatechin erzeugt wurde. Mit 4-, 5- oder 6-Methyl-3-pentadecylbrenzcatechin als Ausgangsmaterialien findet man geringere Bindung, während die Anwesenheit von mehr als einer Methylgruppe, z. B. in 4,5-Dimethyl- oder 4,5,6-Trimethyl-3-pentadecyl- o -benzochinon, die Adsorption des Proteins fast vollständig verhindert.

Kürzlich fand man in Urushiol-sensibilisierten Meerschweinchen immunologische Kreuzreaktionen mit den Urushiol-Analoga **42** und **43**^[110]. Wenn die Aminogruppen als Methansulfonamid blockiert werden, so geht die Kreuzreaktivität verloren. Resorcin-Derivate zeigen ebenfalls keine Kreuzreaktionen, was die Chinon-Hypothese der allerge-

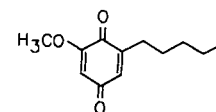


41-43

41: $R^1 = R^2 = OH$, $R^3 = n-C_{15}H_{31}$,
 $n-C_{15}H_{29}$, $n-C_{16}H_{33}$, $n-C_{16}H_{31}$

42: $R^1 = OH$, $R^2 = NH_2$,
 $R^3 = C_nH_{2n+1}$ ($n = 13, 15, 17$)

43: $R^1 = NH_2$, $R^2 = OH$,
 $R^3 = C_nH_{2n+1}$ ($n = 13, 15, 17$)



44

nen Wirkung von Urushiol zusätzlich absichert. In diesem Zusammenhang sei auch auf die umfangreichen Untersuchungen zur Pharmakologie und zur Wirkungsweise des ausgeprägt allergenen *p*-Chinons Primin **44** hingewiesen (Übersicht: [13]).

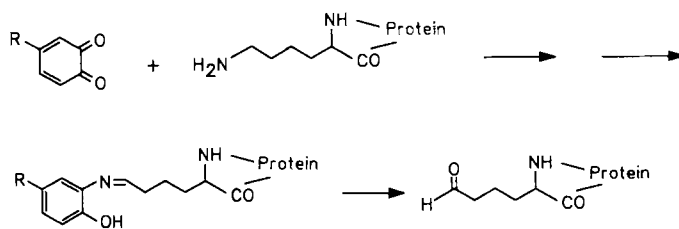
Pflanzliche Gewebe zeigen nach einer Schädigung oft die bekannte Bräunungsreaktion mit Luftsauerstoff. Dabei wird der Nahrungswert entsprechender Lebensmittel vermutlich infolge einer oxidativen Modifikation von Lysinresten durch pflanzliche phenolische Inhaltsstoffe vermindert. Die Reaktionsprodukte sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert worden; hochaufgelöste Massenspektren der extrem komplexen Gemische von Abbauprodukten aus hydrierten und derivatisierten Pflanzenproteinen sprechen jedoch für die Anwesenheit von Addukten aus Lysin und Kaffeesäure [111, 112].

Bei der Inaktivierung eines phytopathogenen Kartoffel-Virus in Gegenwart von Chlorogensäure und Phenol-Oxidase addiert sich vermutlich ebenfalls die ϵ -Aminogruppe von Lysin an Chlorogenochinon [113, 114]. Dabei beobachtet man eine teilweise Quervernetzung von Untereinheiten der Hüllproteine. Das Quervernetzungsprodukt läßt sich mit Trypsin (Spaltung der Lysin-Peptidbindungen) nicht in gleichem Ausmaß wie das Edukt hydrolysieren. Schlüsselschritt der Quervernetzung soll die Bildung eines 3,5-Diamino-4-alkyldiphenols in einer D-1,4-A-D-1,6-A-Sequenz sein. Außerdem wird eine Bildung von Arylether-Bindungen zwischen zwei Monoamino-Addukten diskutiert [113]. Die Stöchiometrie der Bindung an Chlorogenochinon hängt vom pH-Wert der Reaktionsgemische ab: Bei pH = 7.0 beträgt das Verhältnis von Chlorogensäure zu Protein-Untereinheit 1:1, während bei pH = 7.8 ein Verhältnis von 2:1 gefunden wird.

In der Miesmuschel, *Mytilus edulis*, kommt im Periostracum und in der Phenoldrüse ein ungewöhnliches Protein vor, das einen hohen Anteil 3,4-Dihydroxyphenylalaninreste enthält [115, 116]. Der Byssus enthält auch eine Catechol-Oxidase [117]. Dieses Enzym hat offenbar die Aufgabe, die peptidgebundenen Dopa-Einheiten zu den entsprechenden *o*-Chinonen zu oxidieren, an die dann möglicherweise ϵ -Aminogruppen von Lysinresten angelagert werden. Man könnte auch eine Quervernetzung von Proteinketten über SH-Gruppen in Betracht ziehen (vgl. Schema 6); die Aminosäureanalyse ergibt jedoch kein Cystein und nur Spuren von Methionin [116]. Die Miesmuschel verfügt auf diese einzigartige Weise über einen Polyamidklebstoff aus Dopa-haltigen Proteinen, die oxidativ über die entsprechenden Dopa-Chinon-Proteine quervernetzt werden. Bemerkenswerterweise haben der Naturstoff Primin **44** und einige seiner Homologen molluscizide Wirkung [118].

Die sequentielle Addition von zwei Lysinresten an ein Chinon muß nicht notwendigerweise die einzige Möglichkeit zur Quervernetzung von schwefelfreien Proteinen sein. An die Addition der ϵ -Aminogruppe kann sich der bereits mehrfach erwähnte Strecker-Abbau anschließen (Schema 17). Der dabei entstandene Aldehyd ist wiederum ein elektrophiler Aminogruppen-Acceptor. Außerdem sind Aldolkondensationen denkbar, an die sich weitere Kondensationen und Umlagerungen anschließen können. Derartige Transformationen spielen bekanntlich eine wichtige Rolle bei der Reifung und Alterung von Kollagen (Übersicht: [119]).

Nach Behandlung von Proteinen mit Brenzcatechin und Peroxidase/H₂O₂, anschließender Perameisensäure-Oxida-



Schema 17.

tion und Hydrolyse wurde α -Aminoadipinsäure isoliert [120]. Außerdem beobachtete man eine Quervernetzung der Proteine [121, 122], wobei die Strukturen der Quervernetzungen jedoch noch unbekannt sind. Die Behandlung von Proteinen mit Peroxidase/H₂O₂ in Abwesenheit von Catecholen führt über eine oxidative Kupplung von Tyrosinradikalen zu Dityrosin-Einheiten [123].

Während der Oxidation von Brenzcatechin mit Tyrosinase wird das Enzym langsam deaktiviert, was mit der Addition nucleophiler Gruppen des Proteins an das im aktiven Zentrum entstehende *o*-Chinon erklärt werden könnte (Übersicht: [124]). Frühere Ergebnisse zur Bindung von radioaktiv markiertem Brenzcatechin an Tyrosinase [125] scheinen jedoch aufgrund der von Lerch [124, 126] beschriebenen Versuche zweifelhaft: Zwar beobachtet man einen Verlust von den im aktiven Zentrum vorhandenen Histidinresten; die Bindung des Diphenols und seiner Oxidationsprodukte ist aber viel geringer, als man es nach Abschätzung der Stöchiometrie erwarten würde.

Additionen von Aminen an das aus Pyridoxol unter recht drastischen Bedingungen herstellbare 4-Methylen-1,4-dihydropyridin wurden vor einiger Zeit als Modellreaktionen für den Mechanismus der Neurotoxizität einiger Vitamin-B₆-Derivate beschrieben [127]. Eine unter physiologischen Bedingungen prinzipiell denkbare Addition von Aminosäuren an Chinonmethide ist bisher noch nicht beobachtet worden.

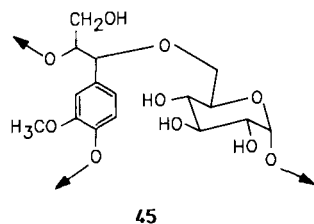
4.3. Reaktionen von Hydroxygruppen

In biologischen Systemen ist das häufigste Nucleophil natürlich Wasser. Andere Möglichkeiten der nucleophilen Addition von Hydroxygruppen ergeben sich aus der Anwesenheit von Kohlenhydraten sowie Serin, Threonin und Hydroxyprolin. In der Naturstoffchemie findet man jedoch fast ausschließlich Beispiele für Additionen und Radikalreaktionen von phenolischen OH-Gruppen mit Chinoiden. Außer den Hydroxygruppen von Alkoholen kommen auch Carboxylat-Ionen als nucleophile Addenden in Frage. Reaktionen von Alkoholen mit *p*-Chinonen sind in der präparativen Organischen Chemie von beträchtlichem Interesse [10].

Im Zusammenhang mit chemischen Modifikationen von Proteinen ist bisher keine Addition einer OH-Gruppe von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin an Chinoide bekannt. *p*-Chinon wurde jedoch zur Immobilisierung von Enzymen an Polyhydroxymethylmethacrylat [128] und an Polysacchariden [129] verwendet. Die dabei ablaufenden Reaktionen sind nicht im Detail untersucht. Die Polymere werden im ersten Schritt wahrscheinlich über eine OH-Addition aktiviert. Nach erneuter Oxidation wird dann das Enzym vermutlich über Mercapto- oder Aminogruppen gebunden. Die Immobilisierung beruht also auf der Reaktionsfolge A(Hy-

droxy an Benzochinon)-D-A (Protein an das Chinon-modifizierte Polymer).

Eine Addition von Hydroxygruppen aus Peptiden an Zwischenprodukte bei der Lignin-Biosynthese wurde ebenfalls noch nicht beobachtet. Wie jedoch *Freudenberg* et al. bereits vermuteten^[131], enthält Lignin CO-Bindungen zu Kohlenhydraten. Die in der Partialstruktur **45** gezeigte Formulierung wurde kürzlich für das Produkt aus enzymatischem Abbau eines Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes aus dem Holz von *Pinus densiflora* und anschließender Methylierungsanalyse vorgeschlagen^[130]. Andere CO-Bindungsarten, nämlich Etherbindungen zu Ferulasäure und Esterbindungen zu *p*-Cumarsäure, findet man in Weizenstroh^[131].



5. Mechanismen der Sklerotisierung von Insektencuticula

In den vorangegangenen Abschnitten haben wir gesehen, daß Biopolymere in Gegenwart von Chinoiden sowohl auf direktem Wege über kovalente oder nichtkovalente Bindungen als auch indirekt über Desaminierungen oder Radikalreaktionen chemisch modifiziert werden können. Wir wenden uns nun einem in der Natur einzigartigen Vorgang zu, nämlich der zur Konstruktion eines Exoskeletts bei Insekten notwendigen Sklerotisierung der Cuticula. Dieses Thema ist mehrfach sehr intensiv unter biologischen und biochemischen Gesichtspunkten bearbeitet worden. An dieser Stelle sollen die mechanistischen Aspekte unter Berücksichtigung der bisher über die chemische Modifikation von Biopolymeren gewonnenen Erkenntnisse erörtert werden.

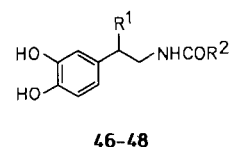
Arthropoden benötigen ein Exoskelett, das eine der Voraussetzungen für die Aufrechterhaltung von essentiellen Lebensvorgängen ist. Es dient der Anheftung der Muskulatur sowie der Erhaltung der Körperstruktur und bietet weitgehenden Schutz gegen schädliche mechanische oder chemische äußere Einflüsse. Bei den Insekten wird der Prozeß der Aushärtung des Exoskeletts als „Sklerotisierung“ bezeichnet; er ist oft von einer Dunkelfärbung begleitet. Das beste Beispiel ist die allgemein bekannte Metamorphose von Insektenlarven zu den mehr oder weniger intensiv braunen Puppen. Im Larvenstadium müssen die Werkzeuge zur Futterraufnahme in Form der sklerotisierten Mandibeln bereitgestellt werden. Unter anwendungsorientierten Gesichtspunkten bietet sich hier ein Ansatz zur Entwicklung neuartiger Schädlingsbekämpfungsmittel: Eine Hemmung der Sklerotisierung wäre für das betroffene Insekt tödlich. Die beste Voraussetzung für eine gezielte Insektizidforschung ist natürlich dann gegeben, wenn möglichst präzise Vorstellungen über die voraussichtliche Wirkungsweise einer biologisch aktiven Substanz entwickelt werden können.

Die molekularen Mechanismen der Sklerotisierung der Insektencuticula haben schon vor langer Zeit das Interesse vie-

ler Forscher geweckt. Trotz zahlreicher Versuche ist jedoch die Chemie dieses Prozesses noch nicht vollständig beschreibbar. Man weiß lediglich, daß in der Cuticula eine Wechselwirkung von Polyphenolen mit Biopolymeren notwendig ist, deren Einzelheiten in einer Reihe von teilweise kontroversen Hypothesen diskutiert werden^[132]. Nach weit verbreiteter Ansicht beruht die Sklerotisierung auf kovalenten Modifikationen von Strukturproteinen, die über *o*-Chinone und *p*-Chinonmethide quervernetzt werden. Die Chinone entstehen durch enzymatische Oxidation von *N*-Acyl-3,4-dihydroxyphenethylaminen. Andere Hypothesen gehen jedoch von nichtkovalenten Polyphenol-Protein-Wechselwirkungen und einer Abnahme des Wassergehalts in der Cuticula aus. Da sich einige neuere Übersichtsartikel ausführlicher mit der Biochemie der Insektencuticula befassen^[132–135], sollen im folgenden nur die stichhaltigen Ergebnisse im Zusammenhang mit den aus historischen Gründen bemerkenswerten Beobachtungen dargestellt werden.

Erste Untersuchungen zum Mechanismus der Sklerotisierung wurden 1940 von *Pryor* veröffentlicht, der die Aushärtung der Eipakete von Küchenschaben^[136] und der Insektencuticula^[137] als Ergebnis einer kovalenten Quervernetzung von Proteinen mit *o*-Chinonen beschrieb. Von ihm stammt auch der Vorschlag, braune Polyphenol-Protein-Komplexe als „Sklerotine“ zu bezeichnen. Da die Sklerotinbildung durch Vorbehandlung der Proteine mit Formaldehyd verhindert werden kann, nahm *Pryor* an, daß peptidische Aminogruppen an der Sklerotisierung beteiligt sind. Angesichts der verwirrenden Vielfalt der Spekulationen und Hypothesen erscheint auch *Pryors* Vermutung bemerkenswert, wonach „die Festigkeit der Cuticula durch eine Polymerisation der Chinone in den Poren der Protein-Matrix erreicht wird“^[136].

Die prinzipielle Sklerotisierungssubstanz wurde vor rund 25 Jahren in den klassischen Arbeiten von *Karlson* et al. entdeckt. Sie führten zur Identifizierung von *N*-Acetyldopamin **46**, das zunächst aus Larven der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*^[138] und später auch aus einer Reihe von anderen Insekten spezialisiert wurde^[139]. Ein weiteres Sklerotisierungsgens ist *N*- β -Alanyldopamin **47**^[140], das im Unterschied zu **46** eine freie primäre Aminogruppe enthält.



- 46:** R¹ = H, R² = CH₃
47: R¹ = H, R² = CH₂CH₂NH₂
48: R¹ = OH, R² = CH₃

Heute bestehen keine Zweifel mehr an der grundsätzlichen Bedeutung von Dopamin-Derivaten als funktionelle Komponenten der Sklerotisierung. Das Schlüsselenzym der Biosynthese, die Dopa-Decarboxylase, läßt sich mit α -Methyl-Dopa oder mit Carbidopa (Desamino- α -hydrazino- α -methyl-Dopa) hemmen^[141, 142]. Wenn man Larven der Fliege *Lucilia cuprina* mit diesen Inhibitoren behandelt, so bleiben die Puppen hell und sterben infolge eines auf die Permeabilitätsänderung der Cuticula zurückzuführenden Wasserverlustes.

Überwiegend wird angenommen, daß die Diphenole zunächst in der Cuticula enzymatisch oxidiert werden. Da eine Cyclisierung zu den Indol-Derivaten nicht stattfinden kann, sollten die *o*-Chinone gemäß Schema 2 weiterreagieren. Daraus entwickelt sich die Hypothese, daß die Strukturproteine der Cuticula über ϵ -Aminogruppen von Lysinresten in einer 1,4-A-D-1,6-A-Sequenz quervernetzt werden. Daneben könnte auch eine 1,4-A-D-Reaktion mit anschließender Kondensation zur Schiff-Base stattfinden. Da Thiole in der Cuticula – wenn überhaupt – nur in Spuren vorkommen^[143], scheint diese Hypothese zunächst einleuchtend. In Moskito-Larven verhindert eine Hemmung der Phenoloxidation mit 2,6-Di-*tert*-butyl-4-(α,α -dimethylbenzyl)phenol die spätere Sklerotisierung der Puppencuticula, so daß die Puppen nach der Häutung rasch absterben^[144]. Am Aufbau der Cuticula sind auch tyrosinreiche Proteine beteiligt, die unter Einwirkung von Tyrosinase in Gegenwart von **46** oder **47** quervernetzt werden können^[145 b]. Diese Quervernetzung ist in vitro mit dem Resorcinderivat *N*-Acetyl-2-hydroxytyramin auf mechanistisch noch unbekannte Weise hemmbar^[146].

Bisher ist nur ein Beispiel für die Isolierung eines Bislysin-Adduktes aus sklerotisiertem Insektenmaterial bekannt^[147]. Die Originalarbeit zu diesem in der Sekundärliteratur zitierten, eigentlich höchst wichtigen Resultat wurde allerdings nicht veröffentlicht. Indirekte Hinweise für die Beteiligung von Lysinresten an den zur Sklerotisierung führenden Reaktionen ergeben sich aus vergleichenden Aminosäureanalysen von sklerotisierter und nichtsklerotisierter Cuticula^[133, 143, 148].

Offenbar spielen jedoch Histidinreste eine viel wichtigere Rolle. Festkörper-NMR-Spektren der Cuticula von Puppen, denen $[1,3\text{-}^{15}\text{N}_2]\text{Histidin}$ und $[\text{Phenyl-}^{13}\text{C}]\text{Dopamin}$ verabreicht worden war, zeigen eindeutig eine direkte Verknüpfung von Aren- mit Imidazol-Einheiten^[149], wobei allerdings nicht erkennbar ist, ob das Dopamin in monomerer oder polymerer Form gebunden ist. Ebenso läßt sich nicht entscheiden, ob die Aren-Einheit als Hapten an eine Peptidkette gebunden oder ob sie Bestandteil einer Quervernetzungsregion ist. Dennoch haben diese Ergebnisse vor allem aufgrund des methodischen Ansatzes grundsätzliche Bedeutung. Eine Beteiligung von Histidin an der Sklerotisierung ist auch aufgrund vergleichender Aminosäureanalysen zu vermuten^[150].

Es deutet einiges darauf hin, daß außer der Quervernetzung von Proteinen über basische Aminosäurereste und *o*-Chinone auch andere Mechanismen von Bedeutung sind. Aus Reaktionsgemischen von **46** und pulverisierter Insekten-cuticula läßt sich racemisches *N*-Acetylnoradrenalin **48** isolieren. Die Oxidation von 4-Methylbrenzcatechin mit der Cuticula einer Fliegenspezies liefert 3,4-Dihydroxybenzylalkohol und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd^[151]. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Hydroxylierung der Seitenkette von 4-Alkyl-1,2-diphenolen in der Cuticula nicht enzymkontrolliert ist^[152, 153]. Bekanntlich entsteht bei der Seitenkettenoxidation von Dopamin mit Dopamin- β -Hydroxylase (*R*)-Noradrenalin. Wenn nun bei der Oxidation von **46** racemisches **48** entsteht, so liegt die Vermutung nahe, daß dieses durch nichtstereoselektive Addition von H_2O an das durch Umlagerung des 4-Alkyl-*o*-chinons gebildete *p*-Chinonmethid erzeugt wird. In Analogie zur Biosynthese von Lignin bildet sich racemisches **48** sehr wahrscheinlich in einer Nebenreak-

tion der Polymerisierung von **46** in der Insekten-cuticula (vgl. Schema 1, Wege **B** und **C**). Das Enzym, das die Chinonmethid-Bildung katalysiert, wurde bisher nicht isoliert. Bemerkenswerterweise bewirkt die Diphenol-Oxidase Tyrosinase eine oxidative Decarboxylierung von 3,4-Dihydroxymandelsäure zu Protocatechualdehyd, wobei als Zwischenstufe wahrscheinlich das korrespondierende Chinonmethid auftritt^[154]. Aus den Cuticulae zahlreicher Insekten-spezies wurde eine beeindruckende Vielfalt seitenkettenoxidierter Derivate und Benzodioxin-Dimere von **46** und **47** isoliert (Übersichten: ^[132, 133]), über deren Funktion bei der Sklerotisierung noch keine Klarheit besteht.

Die braune Farbe vieler sklerotisierter Cuticulae deutet darauf hin, daß die phenolischen Substrate oxidativ polymerisiert werden. So ist zu erwarten, daß dunkle Cuticula außer Eumelaninen^[40, 148, 155] auch die durch Oxidation der Sklerotisierungsagentien über *o*-Chinone und *p*-Chinonmethide gebildeten polyphenolischen Polymere enthält. Die Anwesenheit von Eumelanin ist aus ESR-Spektren von sklerotisierter Cuticula zu erkennen^[14, 64]. Aufgrund mechanistischer Überlegungen scheint es zwingend, daß diphenolische Sklerotisierungsagentien und peptidständige Tyrosinreste mit reaktiven Zwischenstufen der Eumelanin-Bildung copolymerisieren^[156, 157]. Die Anwesenheit von polyphenolischen Polymeren bestätigen auch CP/MAS- ^{13}C -NMR-Spektren, die weiterhin andeuten, daß die aromatischen Einheiten überwiegend in der reduzierten, d.h. diphenolischen Form vorliegen^[158].

Karlson et al. zeigten bereits 1962, daß die Sklerotisierung und die Melaninbildung unabhängig voneinander ablaufen können^[159]. Dieselbe Arbeitsgruppe fand auch die nichtproteinogene Aminosäure β -Alanin in der sklerotisierten Cuticula der Fliege *Calliphora erythrocephala*^[160]. Wie man heute weiß, spielt diese in allen sklerotisierten Cuticulae vorkommende Aminosäure eine wichtige Rolle bei der Regulation von Melanin- und Sklerotin-Bildung^[155]. In Mutanten von *Drosophila melanogaster*, bei denen entweder die Biosynthese von β -Alanin defekt ist oder bei denen diese Aminosäure nicht in die Cuticula transportiert werden kann, wird Dopa oder Dopamin in das schwarze Eumelanin eingebaut^[161], wobei ein minder festes Exoskelett entsteht^[162]. Einen ähnlichen Effekt beobachtet man auch nach Anwendung eines Inhibitors der β -Alanin-Biosynthese, Hydrazinoessigsäureethylester, an Puppen von *Manduca sexta*. Diese sind schwarz statt (wie normal) braun^[163]. Wahrscheinlich wird β -Alanin zur Acylierung von Dopamin benötigt, um die Cyclisierung des Dopaminchinons und damit die Eumelanin-Bildung zu verhindern, so daß die intermolekulare Quervernetzung von Proteinen ermöglicht wird. Da *N*- β -Alanyldopamin **47** tatsächlich als Komponente der Sklerotisierung auftritt, wird die Chinon-Hypothese auf diese Weise zusätzlich bestätigt. Offen bleibt jedoch die Frage, ob die Protein-Quervernetzung über Monomere oder Polymere des Diphenols oder seiner Oxidationsprodukte erfolgt. Nach anderer Meinung wird β -Alanin für die korrekte Anordnung supramolekularer Strukturen, d.h. die Packung von Chitin-fibrillen und Strukturproteinen, benötigt^[162]. Mischungen von Chitin und β -Alanin nehmen langsam eine braune Färbung an^[162], die vermutlich aus Umsetzungen vom Typ der Maillard-Reaktion herrührt^[119, 164].

Die Sklerotin-Bildung ist nicht notwendigerweise von der Anwesenheit von Chitin abhängig. Bekanntlich reichen be-

reits Strukturproteine und *o*-Chinone aus, wie die chitin-freien, äußerst harten und dunklen Eipakete von Küchenschaben beweisen^[136]. Blockiert man jedoch die Chitin-Ablagerung in der Cuticula mit Diflubenzuron, so färbt sich diese schwarz^[165], und die Sklerotisierung kann beeinträchtigt sein (Übersicht: ^[166]). Polymerisiertes *N*-Acetyldopamin bindet nichtkovalent an Chitin^[167].

Chitin ist in Insekten stets mit Protein verknüpft. Prinzipiell kommen als kovalente Bindungen Amid- oder Esterverknüpfungen sowie glycosidische Verknüpfungen von Polypeptiden mit den reduzierenden Enden der Polysaccharidketten in Betracht. Versuche zur Isolierung von strukturell definierten Aminosucker-Konjugaten waren bisher erfolglos; daher kann die Frage nach der molekularen Architektur von Chitin-Protein-Polyphenol-Komplexen noch nicht beantwortet werden. Falls bei der Reaktion zwischen ϵ -Amino-Gruppen von Lysin und dem reduzierenden Ende von Chitin-Ketten Schiff-Basen entstehen, so ist denkbar, daß diese umlagern und zur Bildung von Allylsinresten führen (vgl. Schema 17). Dieser Mechanismus zeigt Analogien zu der in Gegenwart von Glucose beobachteten kovalenten Quervernetzung des Kollagens^[168].

Einige Autoren vertreten die Ansicht, daß die Bedeutung kovalenter Bindungen bei der Sklerotisierung allgemein überschätzt wird. Von größerer Bedeutung sollen dagegen eine Abnahme des Wassergehaltes in der Cuticula und die Bildung nichtkovalenter Komplexe aus Strukturproteinen und polymerisiertem *N*-Acetyldopamin sein^[152, 169]. Polymerisiertes **46** kann wegen der geringen Cyclisierungsgeschwindigkeit von *N*-Acetyldopaminchinon keine signifikanten Anteile aus Indol-Körpern enthalten und ist demnach unter strukturellen Gesichtspunkten als Allomelanin zu klassifizieren (siehe Abschnitt 3). Berücksichtigt man die Möglichkeit zur Umlagerung in Chinonmethide, ist zu erwarten, daß die Reaktivität der Polymere derjenigen von kondensierten Tanninen oder von Lignin ähnelt. Ihre Interaktionen mit Proteinen führen primär zu nichtkovalenten Wechselwirkungen, aus denen statistisch verteilt einzelne kovalente Verknüpfungsstellen entstehen können.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Reaktionen von Chinonen und Chinonmethiden haben in der Natur große Bedeutung, wobei oft spektakuläre biologische Effekte beobachtet werden können. Im vorliegenden Aufsatz wurden Beispiele für Chinone als Abwehrsubstanzen gegeben und toxische und daher unerwünschte Wirkungen beschrieben. Es ist aber auch deutlich geworden, daß einige essentielle Lebensfunktionen von der Fähigkeit zur Bildung hochkomplexer polyphenolischer Polymere abhängen. Auf molekularer Ebene ist ein allgemeines Prinzip erkennbar, nämlich die chemische Modifikation von Biopolymeren in kovalenten oder nichtkovalenten Wechselwirkungen. In vielen Fällen sind diese Wechselwirkungen mit nucleophilen Additionen von schwefelhaltigen funktionellen Gruppen an das chinoide System zu erklären. In Abwesenheit von Schwefel können auch Stickstoff- oder Sauerstoff-Nucleophile reagieren. Andere Reaktionsfolgen wie die Desaminierung und die Chinon-vermittelte Erzeugung von Sauerstoff-Radikalen führen schließlich indirekt zur chemischen Veränderung von Biopolymeren. Mit Ausnahme der

Addition von Mercaptogruppen sind diese Reaktionen für den Strukturchemiker derzeit nur hypothetisch beschreibbar.

Einige der früheren, aus Modellreaktionen abgeleiteten Theorien müssen offenbar neu überdacht werden. Die Beteiligung der ϵ -Aminogruppen von Lysin an der kovalenten Quervernetzung von Proteinen scheint weniger trivial zu sein, als man früher angenommen hat. Zwar verringert die Reaktion von Chinonen mit Proteinen den Lysin-Gehalt, doch ist dieses Ergebnis auch bei oxidativer Desaminierung zu erwarten. Auch die nach Vorbehandlung von Proteinen mit Formaldehyd beobachtete Abnahme der Bindung von Polyphenolen ist kein sicheres Indiz für die Bildung von Additions- und/oder Kondensations-Produkten, da auch ionische Wechselwirkungen infolge der Verminderung von positiven Ladungen beeinträchtigt sein können. Sicher scheint jedoch der in einigen biologischen Systemen geführte Nachweis einer Verknüpfung zwischen Chinoiden und Proteinen über Histidinreste, und es mag allgemein gelten, daß diese Aminosäure eine wichtigere Funktion hat als Lysin.

Der eigentliche Durchbruch in der Analytik von Biopolymer-Polyphenol-Komplexen ist der Festkörper-NMR-Spektroskopie zu verdanken^[69, 149, 158]. Wir sind jedoch noch weit von der Lösung aller offenen Probleme entfernt – man denke nur an die zahlreichen Möglichkeiten nichtkovalenter Bindungen und der Bildung von CC-Verknüpfungen über oxidative Kupplungen. Die Grundbedingung für die Aufklärung struktureller Zusammenhänge muß das sorgfältig durchdachte und kritisch durchgeführte Experiment bleiben. Es ist zu erwarten, daß die Festkörper-NMR-Spektroskopie dabei auch künftig wichtige Informationen liefern wird.

Bei der Planung zukünftiger Forschungsprojekte werden etliche Ideen zu verfolgen sein: Die Untersuchung von Protein-Chinon-Wechselwirkungen in Denaturierungsreaktionen, seien es ökologisch vorteilhafte Verteidigungsmechanismen von Lebewesen oder die Bildung makromolekularer Komplexe, wird Anregungen für die Suche nach neuen pharmazeutischen Anwendungen (vgl. Daunomycin) oder zur Vermeidung toxischer Wirkungen (vgl. Paracetamol) liefern. Aus der Erforschung der Biosynthese und der molekularen Architektur von Biopolymeren werden sich vielleicht neue Impulse für die Medizin (z. B. Eingriffe in die Melanogenese in Melanoma-Zellen) oder Agrikultur (z. B. Hemmung der Bildung des Exoskeletts bei Schadinsekten) ergeben. Schließlich ist vorstellbar, daß neue Materialien entwickelt werden, deren Eigenschaften mit der Härte von Lignocellulose, der Festigkeit und geringen Dichte des Exoskeletts von Insekten oder der Zähigkeit des Byssus von Miesmuscheln vergleichbar sind. Die Konstruktion neuer Materialien aus chemisch modifizierten Proteinen wurde unlängst vorgeschlagen^[170]; mit den sich rasch entwickelnden Möglichkeiten des Protein-Designs und der gezielten Mutagenese werden diese Ideen sicher attraktive neue Forschungsgebiete erschließen. Bei allem anwendungsbezogenen Denken sollte jedoch nicht vergessen werden, daß auch schlichte Neugier eine legitime und wichtige Motivation für die Erforschung der von der Natur entworfenen molekularen Konstruktionspläne liefert.

Die aus dem eigenen Laboratorium zitierten experimentellen Arbeiten wurden zum großen Teil von sehr fähigen Mitarbeitern durchgeführt, deren Namen in der zitierten Literatur angegeben sind. Ihnen danke ich für ihre Ausdauer und ihr begei-

stertes Engagement, besonders in den schwierigen Phasen der Forschung. Einige der hier diskutierten Ideen entstanden in vielen stimulierenden Diskussionen mit zahlreichen Fachkollegen. Vor allem sei Prof. P. Karlson (Marburg), Prof. W. Steglich (Bonn) und Dr. G. F. Weirich (Beltsville) an dieser Stelle für ihr Interesse und zahlreiche Anregungen gedankt. Viele Projekte setzten die Bereitschaft und das Verständnis für eine interdisziplinäre Kooperation im Grenzgebiet zwischen Zoologie/Entomologie und Chemie voraus. Partner fand ich in Prof. A. Egelhaaf (Köln), Prof. R. Keller (Bonn) und Prof. K. Scheller (Würzburg). Unvergessen bleibt auch unser verstorbener Kollege Prof. H. Emmerich (Darmstadt). Die notwendigen finanziellen Mittel stellten der Fonds der Chemischen Industrie und die Deutsche Forschungsgemeinschaft bereit. Letzterer bin ich insbesondere für ein Heisenberg-Stipendium zu großem Dank verpflichtet.

Eingegangen am 5. Mai 1988 [A 715]

- [1] R. H. Thomson: *Naturally Occurring Quinones*, Academic Press, London 1971; *Naturally Occurring Quinones*, Vol. 3, Chapman and Hall, London 1987.
- [2] R. H. Thomson, *Recent Adv. Phytochem.* 12 (1979) 287.
- [3] H. Schildknecht, *Angew. Chem.* 93 (1981) 164; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 164.
- [4] D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* 4 (1987) 539; *ibid.* 3 (1986) 1; *ibid.* 1 (1984) 551; T. Higa, *Mar. Nat. Prod. Chem. Biol. Perspect.* 4 (1981) 93; J. T. Baker, V. Murphy in R. J. Moore (Hrsg.): *CRC Handbook of Marine Science*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1981, S. 7.
- [5] W. B. Turner: *Fungal Metabolites*, Academic Press, London 1971; W. B. Turner, D. C. Aldridge: *Fungal Metabolites*, Vol. 2, Academic Press, London 1983; M. Gill, W. Steglich, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 51 (1987) 1.
- [6] H. Schildknecht, *Angew. Chem.* 82 (1970) 17; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 1; M. S. Blum, *Annu. Rev. Entomol.* 32 (1987) 381.
- [7] H.-W. Wanzlick, *Angew. Chem.* 76 (1964) 313; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3 (1964) 401.
- [8] W. M. Horspool, *Q. Rev. Chem. Soc.* 23 (1969) 204.
- [9] a) S. Patai (Hrsg.): *The Chemistry of Quinonoid Compounds*, Wiley, London 1974; b) S. Patai, Z. Rappoport (Hrsg.): *ibid.* Vol. 2, Wiley, Chichester 1988.
- [10] H. Ulrich, R. Richter in *Houben-Weyl-Müller: Methoden der Organischen Chemie*, Bd. VII/3a, Thieme, Stuttgart 1977, S. 1; C. Grundmann, *ibid.* Bd. VII/3b, 1979, S. 1.
- [11] A. M. Mayer, E. Harel, *Phytochemistry* 18 (1979) 193.
- [12] A. B. Turner, *Q. Rev. Chem. Soc.* 18 (1964) 347.
- [13] B. Kalyanamaran, R. C. Sealy, K. Sivarajah, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 14018.
- [14] M. G. Peter, H. B. Stegmann, H. Dao-Ba, K. Scheffler, *Z. Naturforsch. C 40* (1985) 535.
- [15] M. J. Nilges, H. M. Swartz, A. Riley, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 2446.
- [16] B. Kalyanamaran, R. C. Sealy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106 (1982) 1119.
- [17] P. L. Chesis, D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1696; P. Nata in [9b], S. 879; M. C. Depew, J. K. S. Wan in [9b], S. 963.
- [18] H. Nohl, W. Jordan, *Bioorg. Chem.* 16 (1987) 374.
- [19] K. J. A. Davies, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9895; K. J. A. Davies, M. E. Delsignore, S. W. Lin, *ibid.* 262 (1987) 9902; K. J. A. Davies, M. E. Delsignore, *ibid.* 262 (1987) 9908.
- [20] H. Musso, D. Maaßen, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 689 (1965) 93.
- [21] M. K. Manthey, S. G. Pyne, R. J. W. Truscott, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 1486.
- [22] S. Ito, G. Protta, *Experientia* 33 (1977) 1118.
- [23] B. Kalyanamaran, P. I. Premovic, R. C. Sealy, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 11080.
- [24] N. Takahashi, J. Schreiber, V. Fischer, R. P. Mason, *Arch. Biochem. Biophys.* 252 (1987) 41.
- [25] A. Palumbo, S. Ito, G. Nardi, G. Protta, *Comp. Biochem. Physiol. B 58* (1977) 353; S. Ito, G. Nardi, G. Protta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 1042.
- [26] Y. Nakagawa, K. Hiraga, T. Suga, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 1417.
- [27] F. Kehrman, M. Cordone, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 46 (1913) 3009.
- [28] C. E. M. Pugh, H. S. Raper, *Biochem. J.* 21 (1927) 1370.
- [29] R. H. Hackman, A. R. Todd, *Biochem. J.* 55 (1953) 631.
- [30] H.-J. Kallmayer, *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* 312 (1979) 73, 230.
- [31] L. Horner, H. Lang, *Chem. Ber.* 89 (1956) 2768.
- [32] M. G. Peter, *Z. Naturforsch. C 33* (1978) 912.
- [33] D. C. S. Tse, R. L. McCreery, R. N. Adams, *J. Med. Chem.* 19 (1976) 37.
- [34] A. Hikosaka, J. Kumanotani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 43 (1970) 2620.
- [35] C. R. Tindale, *Aust. J. Chem.* 37 (1984) 611.
- [36] R. Davies, J. L. Frahn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1977, 2295.
- [37] Zusammenfassungen zur Verwendung von Chinonen in der Synthese von Heterocyclen: K. T. Finley in [9b], S. 537; R. W. Middleton, J. Parrick in [9b], S. 1019.
- [38] A. Bolognese, G. Scherillo, W. Schäfer, *J. Heterocycl. Chem.* 23 (1986) 1003.
- [39] A. Tomoda, J. Yamaguchi, H. Kojima, H. Amemiya, Y. Yoneyama, *FEBS Lett.* 196 (1986) 44.
- [40] H. Kayser, *Compr. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* 10 (1985) 367.
- [41] E. Haslam: *The Shikimate Pathway*, Hallsted Press, New York 1974.
- [42] S. Nan'ya, T. Tange, E. Maekawa, Y. Ueno, *J. Heterocycl. Chem.* 23 (1986) 1267.
- [43] N. E. Mackenzie, S. Surendrakumar, R. H. Thomson, H. J. Cowe, P. J. Cox, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1986, 2233.
- [44] G. Protta, G. Curro, *Tetrahedron* 30 (1974) 3627.
- [45] M. G. Peter, F. Speckenbach, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 1279.
- [46] E. J. Corey, K. Achiwa, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 1429.
- [47] K. Köhler, *Dissertation*, Universität Bonn 1985.
- [48] P. A. Cranwell, R. D. Haworth, *Tetrahedron* 27 (1971) 1831.
- [49] R. Ott, E. Pinter, P. Kajtna, *Monatsh. Chem.* 110 (1979) 51.
- [50] R. A. Nicolaus: *Melanins*, Hermann, Paris 1968.
- [51] G. A. Swan, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 31 (1974) 521.
- [52] R. H. Thomson, *Angew. Chem.* 86 (1974) 355; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 305.
- [53] K. Freudenberg, A. C. Neish: *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, Springer, Berlin 1968.
- [54] H. Nimz, *Angew. Chem.* 86 (1974) 336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 313.
- [55] C. K. Wat, G. H. N. Towers, *Recent Adv. Phytochem.* 12 (1979) 371.
- [56] A. G. McInnes, M. A. Ragan, D. G. Smith, J. A. Walter, *Hydrobiologia* 116/117 (1984) 597.
- [57] M. A. Ragan, *Phytochemistry* 23 (1984) 2029.
- [58] J. Peter-Katalinić, H. Egge, B. Deutscher, W. Knöb, K.-W. Glombitza, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 15 (1988) 595.
- [59] D. G. Roux, D. Ferreira, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 41 (1982) 47.
- [60] L. Y. Foo, L. J. Porter, *Phytochemistry* 19 (1980) 1747.
- [61] E. Haslam, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 41 (1982) 1.
- [62] W. Ziehmman: *Huminstoffe*, Verlag Chemie, Weinheim 1980.
- [63] A. Körner, J. Pawelek, *Science (Washington D.C.)* 217 (1982) 1163; J. Pawelek, A. Körner, A. Bergstrom, J. Bologna, *Nature (London)* 286 (1980) 617; J. Cabanes, F. García-Cánovas, J. A. Lozano, J. García-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta* 923 (1987) 187.
- [64] H. S. Mason, D. J. E. Ingram, B. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* 86 (1960) 225.
- [65] R. C. Sealy, C. C. Felix, J. S. Hyde, H. M. Swartz, *Free Radicals Biol.* 4 (1980) 209; M. Pasenkiewicz-Gierula, R. C. Sealy, *Biochim. Biophys. Acta* 884 (1986) 510.
- [66] K. T. Yasunobu, E. W. Peterson, H. S. Mason, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 3291.
- [67] T. Kato, S. Ito, K. Fujita, *Biochim. Biophys. Acta* 881 (1986) 415.
- [68] S. Ito, T. Kato, K. Shinpo, K. Fujita, *Biochem. J.* 222 (1984) 407.
- [69] M. G. Peter, H. Förster, *Angew. Chem* 101 (1989); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989), im Druck.
- [70] R. M. B. Deibel, M. R. Chedekel, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5884; M. R. Chedekel, K. V. Subbarao, P. Bhan, T. M. Schultz, *Biochim. Biophys. Acta* 912 (1987) 239.
- [71] S. Ito, E. Novellino, F. Chioccare, G. Misuraca, G. Protta, *Experientia* 36 (1980) 822.
- [72] R. C. Sealy, J. S. Hyde, C. C. Felix, I. A. Menon, G. Protta, H. M. Swartz, S. Persad, H. F. Haberman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2885; R. C. Sealy, J. S. Hyde, C. C. Felix, I. A. Menon, G. Protta, *Science (Washington D.C.)* 217 (1982) 545.
- [73] M. d'Ischia, A. Napolitano, G. Protta, *Tetrahedron* 43 (1987) 5351.
- [74] M. d'Ischia, A. Napolitano, G. Protta, *Tetrahedron* 43 (1987) 5357.
- [75] W. G. C. Forsythe, V. C. Quesnel, *Biochim. Biophys. Acta* 25 (1957) 155.
- [76] W. L. Lütolf, R. Prewo, J. H. Bieri, P. Rüedi, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 860.
- [77] J. von Ew, T. Reichstein, C.-J. Widén, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 1251; W. J. Richter, F. Raschdorf, J. von Ew, T. Reichstein, C.-J. Widén, *ibid.* 70 (1987) 881.
- [78] K. H. Gustavson: *The Chemistry of Tanning Processes*, Academic Press, New York 1956.
- [79] K. M. Meek, J. B. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 587 (1979) 112.
- [80] A. E. Hagerman, L. G. Butler, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4494.
- [81] J. P. McManus, K. G. Davis, T. H. Lilley, E. Haslam, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 309; J. P. McManus, K. G. Davis, J. E. Beart, S. H. Gaffney, T. H. Lilley, E. Haslam, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1985, 1429.
- [82] J. E. Beart, T. H. Lilley, E. Haslam, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1985, 1439.
- [83] M. R. Attwood, B. R. Brown, S. G. Lissetter, C. L. Torrero, P. M. Weaver, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 177.

- [84] H. S. Mason, E. W. Peterson, *Biochim. Biophys. Acta* 111 (1965) 134.
- [85] W. S. Pierpoint, *Biochem. J.* 112 (1969) 609.
- [86] J. L. Maggs, P. S. Grabowski, B. K. Park, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2793.
- [87] D. C. Dahlin, G. T. Miwa, A. Y. H. Lu, S. D. Nelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1327.
- [88] D. W. Potter, J. A. Hinson, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 974.
- [89] M. Novak, M. Pelecanou, L. Pollack, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 112.
- [90] M. J. Waring, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 159.
- [91] K. Ramakrishnan, J. Fisher, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 1215.
- [92] S. Ito, S. Inoue, Y. Yamamoto, K. Fujita, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 673; S. Ito, T. Kato, K. Ishikawa, T. Kasuga, K. Jimbow, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 2007.
- [93] R. F. Weaver, K. V. Rajagopalan, P. Handler, P. Jeffs, W. L. Byrne, D. Rosenthal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 (1970) 1050.
- [94] A. Rosowski, M. Wick, S.-H. Kim, *Congr. Am. Chem. Soc.*, Honolulu 1979, Abstr. MEDI 36.
- [95] S. Hilbig, T. Andries, W. Steglich, T. Anke, *Angew. Chem.* 97 (1985) 1063; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 1063.
- [96] P. Eyer, E. Lierheimer, M. Strosar, *Mol. Pharmacol.* 23 (1983) 282.
- [97] Y.-O. Liang, P. M. Plotsky, R. N. Adams, *J. Med. Chem.* 20 (1977) 581.
- [98] M. N. Gupta, G. S. Murthy, P. J. Vithayathil, *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (1980) 243.
- [99] P. J. Vithayathil, G. S. Murthy, *Nature (London) New Biol.* 236 (1972) 101.
- [100] M. N. Gupta, P. J. Vithayathil, *Bioorg. Chem.* 11 (1982) 101.
- [101] I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.* 95 (1983) 827; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 816.
- [102] M. N. Gupta, R. Gopinath, K. Raju, *Anal. Biochem.* 118 (1981) 227.
- [103] K. T. von der Trenck, D. Hunkler, H. Sandermann, *Z. Naturforsch. C* 36 (1981) 714.
- [104] M. Tomasz, R. Lipman, D. Chowdary, J. Pawlak, G. L. Verdine, K. Nakanishi, *Science (Washington D.C.)* 235 (1987) 1204; M. Tomasz, R. Lipman, B. F. McGuinness, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5892.
- [105] G. Cimino, S. De Rosa, S. De Stefano, L. Cariello, L. Zanetti, *Experientia* 38 (1982) 896.
- [106] M.-L. Kondracki, M. Guyot, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5815.
- [107] H. Jackson, L. P. Kendal, *Biochem. J.* 44 (1949) 477.
- [108] D. J. Liberato, V. S. Byers, R. G. Dennick, N. Castagnoli, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 28.
- [109] J. S. Byck, C. R. Dawson, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 123.
- [110] M. A. ElSohly, P. D. Adawadkar, D. E. Benigni, E. S. Watson, T. L. Little, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 606.
- [111] R. Davies, W. M. Laird, R. L. M. Synge, *Phytochemistry* 14 (1975) 1591.
- [112] J. Eagles, J. F. March, R. L. M. Synge, *Phytochemistry* 19 (1980) 1771.
- [113] W. S. Pierpoint, R. J. Ireland, J. M. Carpenter, *Phytochemistry* 16 (1977) 29.
- [114] W. S. Pierpoint, *Phytochemistry* 21 (1982) 91.
- [115] J. H. Waite, S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta* 541 (1978) 107.
- [116] J. H. Waite, M. L. Tanzer, *Science (Washington D.C.)* 212 (1981) 1038.
- [117] J. H. Waite, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 65 (1985) 359.
- [118] H. Schildknecht, J. Lubosch, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 31.
- [119] J. J. Harding, *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 247.
- [120] M. A. Stahmann, A. K. Spencer, *Biopolymers* 16 (1977) 1299.
- [121] M. A. Stahmann, A. K. Spencer, G. R. Honold, *Biopolymers* 16 (1977) 1307.
- [122] C. Hasson, M. Sugumaran, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5 (1987) 13.
- [123] R. Aeschbach, R. Amado, H. Neukom, *Biochim. Biophys. Acta* 439 (1976) 292.
- [124] K. Lerch, *Mol. Cell. Biochem.* 52 (1983) 125.
- [125] B. J. B. Wood, L. L. Ingraham, *Nature (London)* 205 (1965) 291.
- [126] K. Lerch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3635.
- [127] M. Frater-Schröder, M. Mahrer-Busato, *Bioorg. Chem.* 4 (1975) 332.
- [128] N. Stambolieva, J. Turkova, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45 (1980) 1137.
- [129] J. Brandt, L.-O. Andersson, J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta* 386 (1975) 196.
- [130] T. Watanabe, S. Kaizu, T. Koshijima, *Chem. Lett.* 1986, 1871.
- [131] A. Scalbert, B. Monties, J.-Y. Lallemand, E. Guittet, C. Rolando, *Phytochemistry* 24 (1985) 1359.
- [132] P. C. J. Brunet, *Insect Biochem.* 10 (1980) 467.
- [133] S. O. Andersen, *Annu. Rev. Entomol.* 24 (1979) 29.
- [134] H. Lipke, M. Sugumaran, W. Henzel, *Adv. Insect Physiol.* 17 (1983) 1.
- [135] M. G. Peter, *Habilitationsschrift*, Universität Bonn 1982.
- [136] M. G. M. Pryor, *Proc. R. Soc. (London) B* 128 (1940) 378.
- [137] M. G. M. Pryor, *Proc. R. Soc. (London) B* 128 (1940) 393.
- [138] P. Karlson, C. E. Sekeris, K. E. Sekeri, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 327 (1962) 86.
- [139] P. Karlson, C. E. Sekeris, *Nature (London)* 195 (1962) 183.
- [140] T. L. Hopkins, T. D. Morgan, Y. Aso, K. J. Kramer, *Science (Washington D.C.)* 217 (1982) 364.
- [141] I. F. Turnbull, N. A. Pylotis, A. J. Howells, *J. Insect Physiol.* 26 (1980) 525.
- [142] K. G. Raghavan, G. B. Nadkarni, *Insect Biochem.* 8 (1978) 53.
- [143] R. H. Hackman, M. Goldberg, *Insect Biochem.* 7 (1977) 175.
- [144] V. Semensi, M. Sugumaran, *Pestic. Biochem. Physiol.* 26 (1986) 220.
- [145] a) K. Scheller (Hrsg.): *The Larval Serum Proteins of Insects*, Thieme, Stuttgart 1983; b) L. Grün, M. G. Peter in [145a], S. 102.
- [146] M. G. Peter, U. Grittke, L. Grün, D. Schäfer in A. Zabza, F. Sehnal, D. L. Denlinger (Hrsg.): *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, Politechnika Wroclawska Poland, Wroclaw 1988, S. 519.
- [147] A. C. Neville: *Biology of the Arthropod Cuticle*, Springer, Berlin 1975, S. 126.
- [148] R. H. Hackman in M. Rockstein (Hrsg.): *The Physiology of Insecta*, Vol. 6, Academic Press, New York 1974, S. 215.
- [149] J. Schaefer, K. J. Kramer, J. R. Garrow, G. S. Jacob, E. O. Stejskal, T. L. Hopkins, R. D. Speirs, *Science (Washington D.C.)* 235 (1987) 1200.
- [150] L. Grün, *Dissertation*, Universität Bonn 1986.
- [151] M. Sugumaran, H. Lipke, *FEBS Lett.* 155 (1983) 65.
- [152] M. G. Peter, *Insect Biochem.* 10 (1980) 221.
- [153] M. G. Peter, W. Vaupel, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 848.
- [154] M. Sugumaran, *Biochemistry* 25 (1986) 4489.
- [155] I. Kayser-Wegmann, H. Kayser in [145a], S. 151.
- [156] L. Grün, M. G. Peter, *Z. Naturforsch. C* 39 (1984) 1066.
- [157] H. Lipke, W. J. Henzel, *Insect Biochem.* 11 (1981) 445.
- [158] M. G. Peter, L. Grün, H. Förster, *Angew. Chem.* 96 (1984) 614; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 638.
- [159] P. Karlson, I. Schlossberger-Raecke, *J. Insect Physiol.* 8 (1962) 441.
- [160] P. Karlson, K. E. Sekeri, V. I. Marmaras, *J. Insect Physiol.* 15 (1969) 319.
- [161] M. E. Jacobs, *Insect Biochem.* 8 (1978) 37; A. F. Sherald, *Experientia* 36 (1980) 143.
- [162] M. E. Jacobs, *J. Insect Physiol.* 31 (1985) 509.
- [163] I. Ujváry, K. Hiruma, L. M. Riddiford, G. Matolcsy, C. R. Roseland, K. J. Kramer, *Insect Biochem.* 17 (1987) 389.
- [164] M. Angrick, D. Rewicki, *Chem. Unserer Zeit* 14 (1980) 149.
- [165] a) J. E. Wright, A. Retnakaran (Hrsg.): *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*, Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht 1987; b) B. Mauchamp, O. Perrineau in [165a], S. 101.
- [166] E. Cohen in [165a], S. 43.
- [167] M. G. Peter, R. Keller, G. Kegel in R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G. W. Gooday (Hrsg.): *Chitin in Nature and Technology*, Plenum, New York 1986, S. 21.
- [168] M. J. C. Kent, N. D. Light, A. J. Bailey, *Biochem. J.* 225 (1985) 745.
- [169] J. F. V. Vincent, J. E. Hillerton, *J. Insect Physiol.* 25 (1979) 653; J. E. Hillerton, J. F. V. Vincent, *ibid.* 25 (1979) 957.
- [170] K. Kaleem, F. Chertok, S. Erhan, *Nature (London)* 325 (1987) 328.