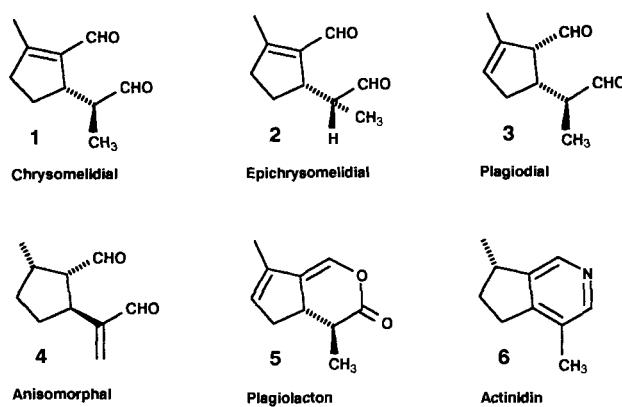


Biosynthese von Iridodialen in Wehrdrüsen von Blattkäferlarven (Chrysomelinae)**

Von Michael Lorenz, Wilhelm Boland* und Konrad Dettner

Cyclopentanoide Naturstoffe mit Iridoidgrundgerüst sind bei Pflanzen und Insekten weit verbreitet^[1]. Im Pflanzenreich sind insbesondere die Iridoidglucoside von Interesse, da sie zum Teil beachtliche pharmakologische Aktivitäten aufweisen und sie ferner über Secoiridoide Durchgangsstufen zu sehr vielen Alkaloiden sind^[2]. Daher wurde ihre Biosynthese in den letzten 30 Jahren intensiv studiert. Die Schlüsselschritte der Biosynthese sind die ω -Hydroxylierung von Geraniol zu 8-Hydroxygeraniol und dessen Weiteroxidation zu 8-Oxocitral, das direkt oder nach zusätzlichen Transformationen zum Iridoidgrundgerüst cyclisiert werden kann^[2, 3] (analog Schema 1). Weitere Oxidations- und Cyclisierungsschritte schließen sich an und führen zu mehr als 1000 heute bekannten pflanzlichen Iridoiden^[1, 4]. Bei Insekten dienen einige flüchtige Iridoide zur Kommunikation^[5], andere, z.B. 1–6, werden als Klebstoffe, Insektizide, Fixative oder Fumigantien in den Wehrsekreten produziert^[6].



Larven des Meerrettichblattkäfers *Phaedon cochleariae*, des Sauerampferblattkäfers *Gastrophysa viridula* und des auf Weiden heimischen Blattkäfers *Plagiodes versicolora* besitzen auf dem Meso- und Metathorax sowie den ersten sieben Abdominalsegmenten neun Drüsenpaare, die bei Gefahr ausgestülpt werden können. An den Drüsenöffnungen erscheint ein Tropfen eines Wehrsekrets, das bei *P. cochleariae* und *G. viridula* hauptsächlich aus Chrysomelidial 1 und Epichrysomelidial 2 als niedermolekularen Komponenten besteht^[7] (vgl. Abb. 1). Aus den Drüsen von *P. versicolora* wird das nach diesem Insekt benannte Plagiodial 3 sowie das Plagiolacton 5 ausgeschieden^[7]. Im Gegensatz zur gut untersuchten Biosynthese pflanzlicher Iridoide gibt es aber bislang noch keine Studie zur Biosynthese von Iridodialen in Insekten. Lediglich ihre Einordnung in den Terpenstoffwechsel konnte durch den Einbau von [¹⁴C]Mevalonolacton in den Dialdehyd Anisomorphal 4 an der Stabheuschrecke *Anisomorpha buprestoides* sichergestellt werden^[8]. Wir berichten hier, daß sich die Biosynthese der Iridodialen 1, 2 und 3 in den Larven der zuvor erwähnten Blattkäfer zwar im

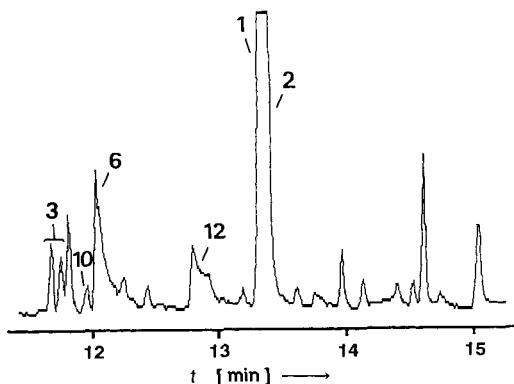


Abb. 1. Ausschnitt aus dem gaschromatographischen Profil flüchtiger Verbindungen aus dem Wehrsekret von *P. cochleariae* 24 h nach Injektion von [²H₅]-8 in die Hämolymphe. Trennbedingungen: RSL 300 (15 m × 0.32 mm) unter Temperaturprogrammierung (50 °C für 2 min, dann mit 10 °C min⁻¹ auf 200 °C); Finnigan Ion Trap, ITD 800 als Detektor (Scansbereich: 35 → 250 Da s⁻¹). Identifizierte Verbindungen: 1 = Chrysomelidial, 2 = Epichrysomelidial, 3 = Plagiolacton und Epiplagiolacton, 6 = Actinidin, 10 = 1-Nor[²H₅]chrysomelidial, 12 = Alkylinole.

Prinzip an den pflanzlichen Stoffwechsel anlehnt, im Detail jedoch eine ganz überraschende Vielfalt aufweist (siehe Schema 1).

Die experimentelle Studie wurde so durchgeführt, daß wäßrige Lösungen (ca. 1 µL; 0.9 proz.) deuterierter Vorstufen^[9] in die Hämolymphe 10–14 d alter Larven injiziert wurden; ca. 4–36 h nach der Applikation der Vorstufen kann durch Reizung der Tiere von den evertierten Drüsenservoisen Wehrsekret abgenommen werden, das [²H]-Iridodial enthält, wie die massenspektrometrische Analyse ergab.

Erste Spuren deuterierter Metaboliten werden bereits nach 1 h gefunden. Alternativ kann man den Larven die Vorstufe auch über den Fraß zuführen, indem man ihnen mit Vorstufen imprägnierte Blätter als Nahrung anbietet; mit dieser Technik findet man jedoch erst nach 3 d deutlichen Einbau. Allerdings belegt dieses Experiment, daß Blattkäferlarven auch pflanzliche Vorstufen wie Geraniol oder 8-Hydroxygeraniol aufnehmen und für ihre Iridoidbiosynthese nutzen können. Um von den sehr geringen Mengen der [²H]-Metaboliten aussagekräftige Massenspektren zu erhalten, wurden 2-Nor-Vorstufen vom Typ 7 und 8 eingesetzt; weitere Stoffwechselketten waren an C1, C2 oder C8 mit Deuterium markiert^[9]. Die Nor-Verbindungen ermöglichen eine vollständige gaschromatographische Trennung von Metaboliten und natürlichen Iridoide (Abb. 1). Den Experimenten liegt die Annahme zugrunde, daß die synthetischen 3-Nor-Vorstufen analog zu den natürlichen Substraten umgesetzt werden. Die jeweils als Referenz erforderlichen 1-Nor[²H₅]chrysomelidale wie [²H₅]-10 können durch biomimetische Reaktionen aus den acyclischen Dialdehyden 9 durch Säure^[10] oder Basenkatalyse^[11] erhalten werden. Beide Varianten liefern das 1-Nor[²H₅]chrysomelidial 10 ohne signifikanten Verlust von Deuterium an C4 der Vorstufe^[12] (> 95 % Retention). Die mechanistischen Vorstellungen zum Verlauf der säurekatalysierten Cyclisierung (50 proz. HCOOH)^[10] von 8-Oxocitral müssen aufgrund dieses Befundes teilweise revidiert werden. Die baseninduzierte Cyclisierung von 9 (MeOH, 0.01 N NaOH, 10 min) ist als Tandem-Michael-Addition von H₂O oder MeOH mit anschließender Eliminierung der konjugaten Base zu verstehen. Aus den Inkubationsexperimenten folgt, daß 7 und 8 von Larven aller drei Arten glatt zu den entsprechenden 1-Nor-ridodialen 10 bzw. 11 umgesetzt werden. Ferner läßt sich bei *P. versicolora* und *G. viridula* auch noch die Zwischenstufe

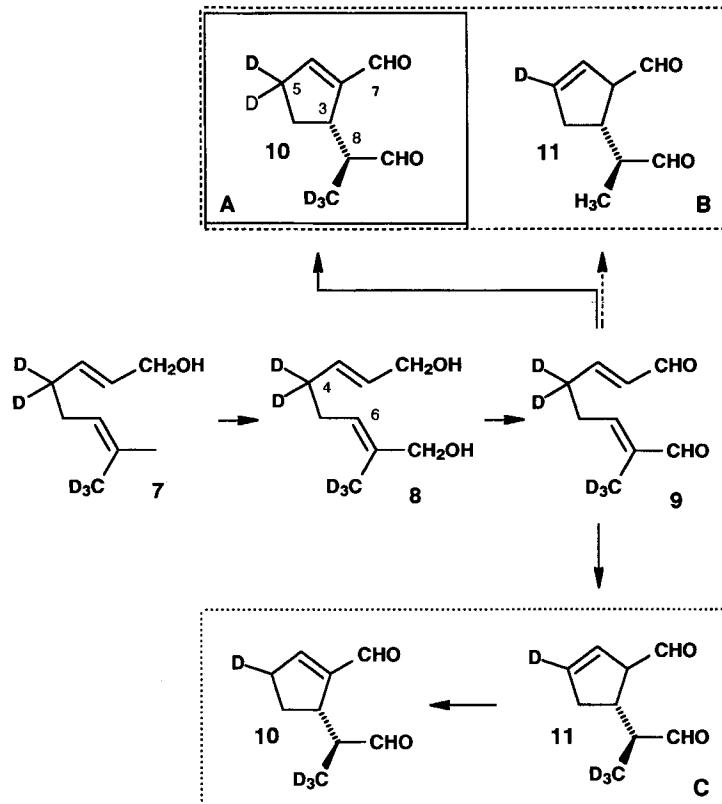
[*] Prof. Dr. W. Boland, Dr. M. Lorenz

Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, W-7500 Karlsruhe
Telefax: Int. +721/698-305

Prof. Dr. K. Dettner
Tierökologie II der Universität
Postfach 101252, W-8580 Bayreuth

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP: Chemische Ökologie) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

des acyclischen Dialdehyds **9** im Wehrsekret sicher nachweisen. Mithin kann die Biosynthese von Chrysomelidial **1** und Plagiodial **3** in Larven der zuvor erwähnten Insekten hinsichtlich ihrer Grundprinzipien analog zur Biosynthesesequenz in Pflanzen formuliert werden (Schema 1), und man kann deshalb auch erwarten, daß beide Lebensformen mit ähnlichen Enzymen ausgestattet sind.



Schema 1. Metabolismus von deuterierten 2-Norgeraniolen **7** und 3-Nor-8-hydroxygeraniolen **8** in verschiedenen Blattkäferlarven. **A**, **B** und **C** bezeichnen die Synthesewege von *G. viridula*, *P. versicolora* bzw. *P. cochleariae*.

Durch die beiden Deuteriumatome an C4 der Vorstufen **7** und **8** werden allerdings auch Unterschiede in den Biosynthesewegen der drei Blattkäferlarven sichtbar. Analog zu den biomimetischen Cyclisierungen überführten Larven von *G. viridula* **8** via **9** ohne Verlust eines Deuteriumatoms von C4 der Vorstufe in 1-Nor[²H₅]chrysomelidial **10** (Schema 1, **A**). Die Zahl der Deuteriumatome an C5 kann den Massenspektren von **10** zuverlässig anhand des Basispeaks entnommen werden (*m/z* 69 entspricht einem Fragment-Ion mit C5 – ²H₂; *m/z* 67 entspricht C5 – ¹H₂)^[12, 13]. Deuterium an C2 von **8** geht erwartungsgemäß verloren; Deuterium an den Aldehydgruppen von **9** bleibt erhalten und schließt damit zusätzliche Redoxreaktionen auf dem Wege zu **10** oder **11** aus. Das isomere Diol (6Z)-**8** wird nicht metabolisiert.

Injiziert man Larven von *P. versicolora* das Diol **8**, so läßt die massenspektrometrische Analyse der Metaboliten vermuten, daß in den Wehrdrüsen dieser Larve zwei verschiedene Cyclasen aktiv sein könnten (Schema 1, **B**). Das entstehende 1-Nor[²H₅]chrysomelidial **10** hat nämlich zwei Deuteriumatome an C5, während das für diese Larve typische Hauptprodukt hier als 1-Nor[²H₄]plagiodial **11** eines der beiden Wasserstoffisotope von C4 der Vorstufe **8** verloren hat. Auch ein **5** entsprechendes 3-Nor[²H₄]plagiolacton weist nur ein Deuteriumatom an C5 auf, wodurch es sich als

Folgeprodukt von 1-Norplagiodial **11** einordnen läßt. Ob die fehlende Methylgruppe der Nor-Vorstufe diese Produktverteilung verursacht, bleibt zu prüfen. Die beiden Deuteriumatome an C5 von 1-Nor[²H₅]chrysomelidials **10** schließen jedenfalls aus, daß **10** durch Isomerisierung von primär gebildetem 1-Nor[²H₄]plagiodial **11** zum thermodynamisch stabileren **10** entsteht.

Interessanterweise haben aber Larven des Meerrettichblattkäfers *P. cochleariae* genau diesen Weg entwickelt (Schema 1, **C**; vgl. auch Abb. 1). Nach Injektion von **8** wird in ihrem Wehrsekret ausschließlich 1-Nor[²H₄]chrysomelidial **10** gefunden, dem eines der beiden enantiotopen Deuteriumatome von C4 der Vorstufe fehlt. Verwendet man chirales (4*R*, 5*S*)- oder (4*S*, 5*R*)-3-Nor[4,5-²H₂]geraniol vom Typ **7** ($\geq 97\%$ ee an C4) als Vorstufe^[19], so wird enantiospezifisch das C4-H₅ Wasserstoffatom entfernt. Da der Verlust eines Wasserstoffatoms von C5 des Iridoidgerüsts, unabhängig vom Mechanismus der Cyclisierung, die Lage der Ringdoppelbindung determiniert, muß für *P. cochleariae* tatsächlich Plagiodial **3** als Intermediat auf dem Wege zu Chrysomelidial **1** angenommen werden. Formal entspricht dieser Verlauf den bisherigen Vorstellungen zur säurekatalysierten Cyclisierung^[10] von 8-Oxocitral zu **1**. Man kann vermuten, daß die direkte Bildung von **10** und **11** aus einer gemeinsamen Zwischenstufe der Cyclisierung durch Verlust eines Wasserstoffatoms von C2 bzw. C5 erfolgt. Unabhängig von mechanistischen Aspekten bleibt aber festzuhalten, daß im Laufe der Evolution der Zugang zu **1** zumindest innerhalb des Tribus Phaedonini (Unterfamilie Chrysomelinae) über mehrere Wege realisiert wurde. Weitere biogenetische Untersuchungen an iridoidproduzierenden Larven der Phaedonini dürften es ermöglichen, Vertreter dieses Tribus chemotaxonomisch zu charakterisieren.

Eingegangen am 17. Dezember 1992 [Z 5755]

- [1] C. A. Boros, F. R. Stermitz, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1055.
- [2] L.-F. Tietze, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 840; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 828.
- [3] H. Inouye, S. Uesato, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 169.
- [4] S. R. Jensen, O. Kirk, B. J. Nielsen, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 97.
- [5] G. W. Dawson, D. C. Griffiths, N. F. Janes, A. Mudd, J. A. Picket, L. J. Wadham, C. M. Woodcock, *Nature*, **1987**, *325*, 614.
- [6] J. M. Pasteels, M. Rowell-Rahier, J.-C. Braekman, D. Daloz, *Biochem. Syst. Ecol.* **1984**, *12*, 395; K. Dettner, R. Fettköther, O. Anstee, R. Deml, C. Liepert, B. Petersen, E. Haslinger, W. Francke, *J. Appl. Entomol.* **1992**, *113*, 24; A. Huth, K. Dettner, *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 2691.
- [7] J. M. Pasteels, J. C. Braekman, D. Daloz, R. Ottinger, *Tetrahedron*, **1982**, *38*, 1891.
- [8] J. Meinwald, G. M. Happ, J. Labows, T. Eisner, *Science* **1966**, *151*, 79.
- [9] M. Lorenz, W. Boland, unveröffentlicht.
- [10] S. Uesato, Y. Ogawa, M. Doi, H. Inouye, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1020.
- [11] F. Bellesia, F. Ghelfi, U. M. Pagnoni, A. Pinetti, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 381.
- [12] Eine 1:1 Mischung von 1-Norchrysomelidial und 1-Norepichrysomelidial [²H₅]-**10** wird erhalten, indem man 0.15 g (0.95 mmol) des Dialdehyds [²H₅]-**9** in 60 µl PICOOH 1 h zum Sieden erhitzt [10]. Chromatographie an SiO₂ mit Hexan/Et₂O (3:7, v/v) liefert 63 mg (42%) [²H₅]-**10**. MS (Finnigan, Ion Trap ITD 800, 70 eV): *m/z* 157 (M^+ , 1.4%), 139(6), 138(5), 129(14), 128(6), 114(4), 113(4), 112(8), 111(15), 110(11), 109(6), 100(18), 99(13), 98(12), 97(29), 96(35), 95(36), 94(17), 93(12), 92(6), 85(7), 84(9), 83(19), 82(18), 81(18), 80(18), 79(16), 78(11), 71(9), 70(29), 69(100), 68(75), 67(43), 66(28), 65(11), 64(8), 59(12), 58(11), 57(9), 56(11), 55(11), 54(11), 53(15), 52(14), 46(12). Hochauflösungs-MS: ber. für C₉H₇²H₅O₂: 157.1151; gef.: 157.1182.
- [13] Nach hochauflösender Massenspektrometrie (Finnigan MAT 90) entspricht der Basispeak von [²H₅]-**10** (*m/z* 69) einem Molekülion der Formel C₅H₅²H₂⁺ und beinhaltet die C-Atome des Rings; mit Ausnahme eines Deuteriumatoms von der Aldehydgruppe (C7) (vgl. Schema 1) wird beim Zerfall von **10** im Massenspektrometer kein Deuterium aus der Seitenkette auf den Ring übertragen (durch Referenzsubstanzen mit unterschiedlichem Deuterierungsgrad und -muster abgesichert [9]). Ein hypothetisches Zerfallsschema von Iridodial wird in Lit. [14] diskutiert.
- [14] S. Uesato, Y. Ogawa, H. Ihouye, K. Saiki, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2893.