

Orientierende Untersuchungen zur Duftinduktion mit JA an Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* und *Phaseolus lunatus* machen aber deutlich, daß bei diesen artifiziellen Systemen die Emission von flüchtigen Verbindungen im Vergleich zu der der intakten Pflanze nur sehr eingeschränkt stimuliert werden kann.

Experimentelles

Frisch geschnittene Triebe mit 2 bis 5 Blättern der in Tabelle 1 aufgeführten Pflanzen werden in wäßrige Lösungen von racemischer *trans*-Jasmonsäure ($10 \mu\text{mol mL}^{-1}$) oder Coronatin (50 und 100 nmol mL^{-1}) eingestellt. Nach 10 h werden die vorinkubierten Pflanzen in ein geschlossenes Gefäß (ca. 750 mL Totvolumen) gebracht und die freigesetzten Duftstoffe 20 h durch Luftumwälzung an einem Aktivkohlefilter (1.5 mg) angereichert [21]. Nach Desorption mit Dichlormethan ($30 \mu\text{L}$) werden die Eluate durch GC-MS untersucht (DB1-Quarzkapillare, $10 \text{ m} \times 0.31 \text{ mm}$; Temperaturprogramm: 50°C (2 min), dann mit 10 Grad min^{-1} bis 200°C ; Detektion: Fisons-MD-800-Massenspektrometer, GC-Interface: 260°C ; Scanbereich: $35\text{--}300 \text{ Da sec}^{-1}$). Als Kontrollen dienten Duftmuster von frisch geschnittenen Pflanzen in Wasser ohne Zusatz von JA oder Coronatin. Die Pflanzen *Phaseolus lunatus* und *Zea mays* wurden wie in Lit. [18] beschrieben angezogen. *Gerbera jamesonii*, cv. *Sirtaki* wurde von Prof. M. Dicke, Landwirtschaftliche Universität, Wageningen (Niederlande), zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Pflanzen stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Bonn.

Eingegangen am 22. Dezember 1994,
veränderte Fassung am 6. März 1995 [Z 7570]

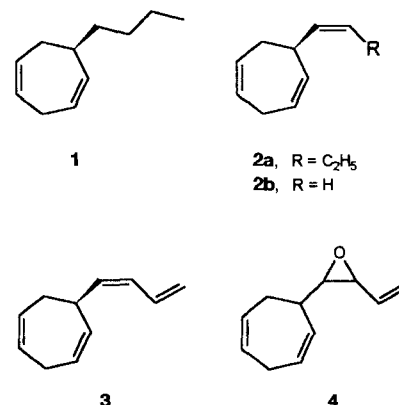
Stichworte: Duftstoffe · Jasmonsäure · Pflanzenhormone

Pericyclische Reaktionen in der Natur – Inaktivierung von Algenpheromonen durch spontane Cope-Umlagerung**

Wilhelm Boland*, Georg Pohnert und Ingo Maier

Professor Hans-Jürgen Bestmann zum 70. Geburtstag gewidmet

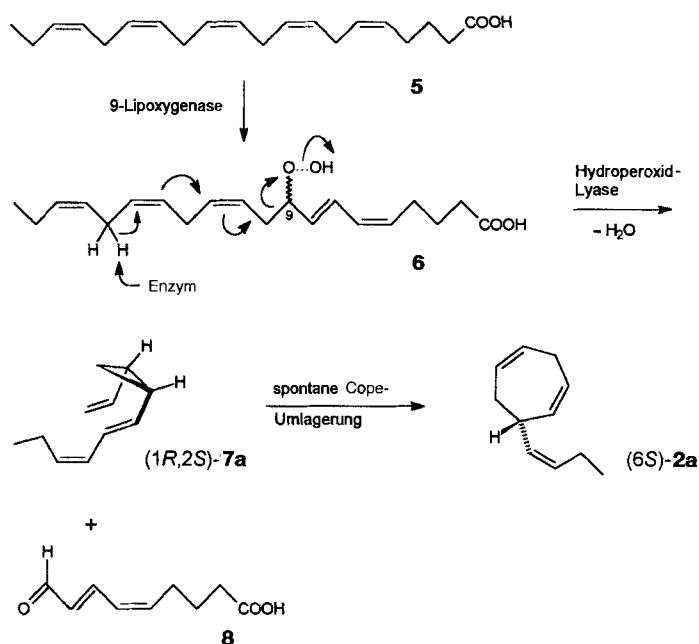
Bei der sexuellen Fortpflanzung nutzen weibliche Gameten von marinen Braunalgen olefinische C_{11} -Kohlenwasserstoffe als chemische Signale zur Freisetzung und/oder Anlockung der männlichen Geschlechtszellen^[1, 2]. Als Prototyp einer ganzen Gruppe hinsichtlich ihrer Strukturen verwandter Signalstoffe wurde 1971 von Müller et al. Ectocarpin **2a** als Sexualpheromon der weltweit verbreiteten Braunalge *Ectocarpus siliculosus* identifiziert^[3]. Seither wurden weitere an C-6 substituierte Cyclohepta-1,4-diene als Lockstoffe oder Substanzen, die eine Massenentlassung von männlichen Gameten induzieren (Release-Faktoren), gefunden. Zu den besonders häufigen Signalstoffen zählen Dictyoten **1**^[4], Desmaresten **3**^[5] und das für die hochentwickelten Laminariales typische Lamoxiren **4**^[6, 7]. Die jeweils zur Reaktionsauslösung erforderlichen Schwellenkonzentrationen liegen, abhängig von Spezies und Funktion, im Bereich von 0.01 bis 10 nmol L^{-1} .



Kürzlich haben wir gezeigt, daß **1** und **2a** in den weiblichen Gameten von marinen Braunalgen aus ungesättigten C_{20} -Fettsäuren gebildet werden^[8, 9]. Arachidonsäure ist die Vorstufe für **1**, und **2a** entsteht analog aus *cis*-Eicosa-5,8,11,14,17-pentaensäure **5** (Schema 1). Obwohl die ersten Schritte der Fettsäureaktivierung noch nicht bekannt sind, kann wegen der Analogien zu Modelluntersuchungen an terrestrischen Pflanzen^[10] auf die 9-Hydroperoxyfettsäure **6** (9-HPEPE) als erstes O-funktionalisiertes Intermediat geschlossen werden. Aus **6** könnte eine Hydroperoxid-Lyase unter oxidativer Spaltung des C-Gerüsts gemäß Schema 1 das Dicarbonyl- C_9 -Fragment **8** und das thermolabile *cis*-disubstituierte Cyclopropan (1*R*,2*S*)-**7a** (C_{11}) freisetzen. Divinylcyclopropane vom Typ **7** sind thermolabil und sollten durch eine spontan eintretende [3,3]-sigmatrope Umlagerung (Cope-Umlagerung) die Cyclohepta-1,4-diene **1–4** geben^[11, 11].

[*] Prof. Dr. W. Boland, Dipl.-Chem. G. Pohnert
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn
Telefax: Int. + 228/735388
Dr. I. Maier
Fakultät für Biologie der Universität Konstanz

[**] Biosynthese von Algenpheromonen, 4. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. D. G. Müller, Universität Konstanz, für seine Unterstützung. – 3. Mitteilung: [17].



Schema 1. Postulierter Mechanismus der Biosynthese von (6S)-2a aus all-*cis*-Eicosa-5,8,11,14,17-pentanoisäure 5. Nach der Aktivierung von 5 durch eine Lipoxygenase zum 9-Hydroperoxid 6 kann das C-Gerüst durch eine Hydroperoxid-Lyase oxidativ gespalten werden. Dabei entstehen formal das C₁₁-Fragment (1R,2S)-7a und die Dicarbonylverbindung 8.

Um diese Vorstellungen experimentell zu erhärten, haben wir einen synthetischen Zugang zu den thermolabilen Cyclopropanen (1R,2S)-7a, (1R,2S)-7b und (1R,2S)-7c entwickelt^[12, 13] und die Aktivierungsenergien der Cope-Umlagerungen zu (6S)-2a, (6R)-3 bzw. (6S)-2b bestimmt^[14]. Die Arrhenius-Parameter und die Halbwertszeiten der Cyclopropane für zwei Meerestemperaturen an für Braunalgen typischen Standorten (Frühjahrstemperaturen in nördlichen und mediterranen Breiten) sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Aktivierungsenergien stimmen

Tabelle 1. Aktivierungsparameter und Halbwertszeiten für die Cope-Umlagerung der Cyclopropane (1R,2S)-7.

Cyclopropan	Cycloheptadien	R	E _a [kJ mol ⁻¹]	ln A	t _{1/2} (8 °C) [min]	t _{1/2} (18 °C) [min]
(1R,2S)-7a	(6S)-2a	C ₂ H ₅	63.8 ± 1.2	18.9 ± 0.4	56	21
(1R,2S)-7b	(6R)-3	CH=CH ₂	62.6 ± 1.5	18.5 ± 0.5	45	18
(1R,2S)-7c	(6S)-2b	H	64.9 ± 1.2	19.0 ± 0.4	77	30

gut mit früher berichteten Daten für das unsubstituierte *cis*-Divinylcyclopropan überein^[15, 16]. Angesichts von Halbwertszeiten zwischen 18 und 77 min muß man aber fragen, ob die männlichen Gameten tatsächlich die bislang als Pheromone betrachteten Cyclohepta-1,4-diene 1–4 erkennen oder ob nicht eher die instabilen Primärprodukte wie (1R,2S)-7a als die eigentlichen Signalstoffe anzusehen sind. Vergleichende Bioassays mit männlichen Gameten von *Ectocarpus siliculosus* (Klon PAR-27a) und (1R,2S)-7a sowie 2a haben nun ergeben, daß in der Tat nur das

instabile Cyclopropan (1R,2S)-7a als Pheromon wirkt. Die Schwellenkonzentration für (6S)-2a beträgt ca. 10 nmol L⁻¹ (Seewasser)^[17, 18], die für das thermolabile (1R,2S)-7a hingegen nur ca. 5 pmol L⁻¹ (Abb. 1). Auch ist der Akkumulationsfaktor *Q* (Quotient aus der Zahl der Gameten in der pheromondotierten und der in der unbehandelten Probe) für (1R,2S)-7a erheblich größer (*Q*_{max} ≈ 15) als der für (6S)-2a (*Q* ≈ 2.2 bei der höchsten verfügbaren Konzentration^[17]); das Konzentrations-Wirkungs-Profil von (1R,2S)-7a entspricht damit dem bei thermostabilen Pheromonen von marinen Braunalgen üblicherweise erhaltenen^[18–20].

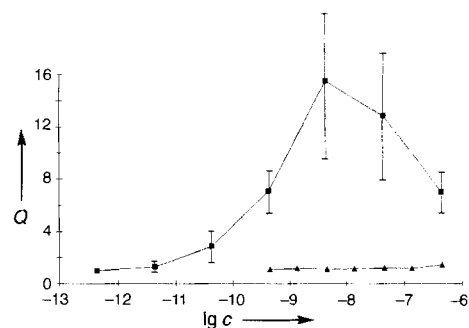


Abb. 1. Biologischer Aktivitätstest^[21] von (1R,2S)-7a (■) und (6S)-2a (▲) an männlichen Mikrogameten von *Ectocarpus siliculosus*, Klon PAR-27a₅. Aufgetragen ist der Akkumulationsfaktor *Q* gegen den Logarithmus der Konzentration *c* von (1R,2S)-7a und (6S)-2 in Seewasser^[19, 22]. Männliche Gameten des hier verwendeten Klon reagieren nur auf die höchste verfügbare Konzentration von (6S)-2a.

Für den Aufbau des Pheromongradienten nach dem Beginn der Sekretion, der chemotaktischen Orientierung des männlichen Gameten bis hin zur Fusion der Geschlechtszellen werden nur wenige Minuten benötigt. Damit scheint (6S)-2a als Folgeprodukt des instabilen Pheromons (1R,2S)-7a auch keine zeitabhängige Rolle als chemischer Signalstoff zu spielen.

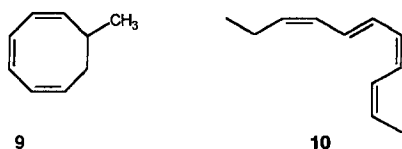
Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abbildung 1 zeigen deutlich, daß die biologische Bedeutung der spontanen Cope-Umlagerung in einer schnellen, temperaturabhängigen Inaktivierung der primär gebildeten Cyclopropyl-Pheromone besteht. Der weitere (a)biotische Abbau zu vollkommen inaktiven, oxygenierten Verbindungen ist wesentlich langsamer und verläuft in Stunden bis Tagen^[1]. Damit verfügen marine Braunalgen in ihrem Sexualzyklus über den schnellsten und effektivsten bislang bekannten Mechanismus zur spontanen Inaktivierung von Lockstoffen und/oder Release-Faktoren sowie über das einzige Signalsystem, bei dem diese Inaktivierung durch eine [3,3]-sigmatrope Umlagerung erreicht wird.

Durch die hohe biologische Aktivität des instabilen Cyclopropanes (1R,2S)-7a werden implizit auch die Vorstellungen zur Biosynthese der Cycloheptadiene 1–4 aus Fettsäurevorstufen gestützt (siehe Schema 1). Die Freisetzung von (1R,2S)-7a kann sogar direkt nachgewiesen werden, indem man den Extrakt einer sehr dichten Suspension frisch entlassener Gameten von *E. siliculosus* (ca. 5 × 10⁷ Zellen) durch HPLC an einer RP-18-Phase untersucht. Man erhält ein transientes Signal für eine Substanz, deren Retentionsvolumen und UV-Spektrum (λ_{max} = 246 nm) mit denen von synthetischem (1R,2S)-7a übereinstimmen. Ferner entspricht die Halbwertszeit des abklingenden Signals der der Umlagerung von synthetischem (1R,2S)-7a zu (6S)-2a (siehe Tabelle 1).

Nach diesen Befunden muß angenommen werden, daß in vielen Fällen, in denen bislang Cycloheptadiene als Pheromone oder Release-Faktoren identifiziert wurden, tatsächlich die

thermolabilen Cyclopropylvorstufen als Signalstoffe mit noch niedrigeren Schwellenkonzentrationen fungieren. Erste Ergebnisse aus Untersuchungen an fertilen männlichen Gametophyten der nordatlantischen Braunalge *Desmarestia aculeata* bestätigen dies. So weist ein thermostabiles Analogon von Desmarstenvorläufer **3** (CH_2OCH_3 statt $\text{CH}=\text{CH}_2$ in **7b**)^[19] sehr niedrige Schwellenkonzentrationen für den pheromoninduzierten Entlassungsvorgang auf.

Die Biosynthesen der Pheromone mariner Braunalgen enthalten demnach außergewöhnlich viele pericyclische und electrocyclic Reaktionen. 7-Methylcycloocta-1,3,5-trien **9** ist eine Spurenkomponekte aus dem Pheromonbouquet der mediterranen Braunalge *Cutleria multifida* und entsteht wahrscheinlich durch electrocyclic Ringschluß aus (1,3Z,5Z,7E)-Nonatetraen. Die ungewöhnliche Konfiguration des (2Z,4Z,6E,8Z)-Undeca-2,4,6,8-tetraens **10** (Gifforden), das vom Thallus der fertilen *Giffordia mitchellae* freigesetzt wird, ergibt sich aus einer bei Raumtemperatur spontan verlaufenden 1,7-Wasserstoffverschiebung^[1, 20].



Experimentelles

Fertile weibliche Gametophyten von *Ectocarpus siliculosus* (ca. 2.1 g Frischgewicht) wurden ca. 16 h bei 2 °C gehalten und dann mit frischem Medium bei 18 °C im Licht zur Gametenentlassung gebracht. Die Zellsuspension (5.2×10^7 Zellen in 10 mL Seewasser) wurde abgesaugt und 4 h bei 4 °C im Licht (ca. $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) aufbewahrt, um eine deutliche Pheromonanreicherung zu erzielen. Die Suspension wurde dann zunächst mit 4 mL eiskaltem MeOH versetzt und anschließend mit 5 mL eiskaltem CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wurde bei 0 °C auf etwa 1 mL eingeeengt und unmittelbar durch HPLC untersucht (LiChrospher 100, RP-18, 25×0.4 cm; Laufmittel: MeOH/ H_2O 9/1; Fließgeschwindigkeit: 0.5 mL min^{-1} ; Injektionsvolumen: 100 μL ; Detektion: 244 nm). Die Umlagerungsgeschwindigkeit der instabilen Vorstufe wurde durch Stopp des Flusses am Peakmaximum und Aufzeichnung der abnehmenden Extinktion im Vergleich zu der der synthetisierten Referenzprobe bestimmt.

Eingegangen am 4. Februar 1995 [Z 7692]

Stichworte: Biosynthesen · Cope-Umlagerungen · Pericyclische Umlagerungen · Pheromone

- [1] W. Boland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 31.
- [2] I. Maier, *Plant Cell Environ.* **1993**, 16, 891.
- [3] D. G. Müller, L. Jaenicke, M. Donike, T. Akintobi, *Science* **1971**, 171, 815.
- [4] D. G. Müller, G. Gassmann, W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, *Science* **1981**, 212, 1040.
- [5] D. G. Müller, A. Peters, G. Gassmann, W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, *Naturwissenschaften* **1982**, 69, 290.
- [6] D. G. Müller, G. Gassmann, K. Lüning, *Nature (London)* **1979**, 279, 430.
- [7] F.-J. Marner, B. Müller, L. Jaenicke, *Z. Naturforsch. C* **1984**, 39, 689.
- [8] K. Stratmann, W. Boland, D. G. Müller, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1261; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1246.
- [9] K. Stratmann, W. Boland, D. G. Müller, *Tetrahedron* **1993**, 49, 3755.
- [10] C. Neumann, W. Boland, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 191, 453.
- [11] R. E. Moore, *Acc. Chem. Res.* **1977**, 10, 40.
- [12] a) D. Wirth, I. Fischer-Lui, W. Boland, D. Icheln, T. Runge, W. A. König, J. Phillips, M. Clayton, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 734; b) S. Pantke, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe, **1992**.
- [13] G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron* **1995**, im Druck.
- [14] Kinetische Messungen: Die Abnahme der Extinktion verdünnter Lösungen von (1R,2S)-**7a**, (1R,2S)-**7b** und (1R,2S)-**7c** (je ca. 0.01 %) in *n*-Octan wurde mit einem Perkin-Elmer-12-UV/Vis-Spektrometer in einer thermostatisierbaren (Haake-D8-Kryostat, ± 0.1 °C) Küvette am Absorptionsmaximum ((1R,2S)-**7a**: 244, (1R,2S)-**7b**: 277, (1R,2S)-**7c**: 241 nm) bei fünf Temperaturen über zwei bis drei Halbwertszeiten verfolgt. Zur statistischen Auswertung (Standardabweichungen) wurde jedes Experiment mindestens dreimal wiederholt. Die Temperatur wurde dabei mit einem NiCr-Ni-Thermoelement und

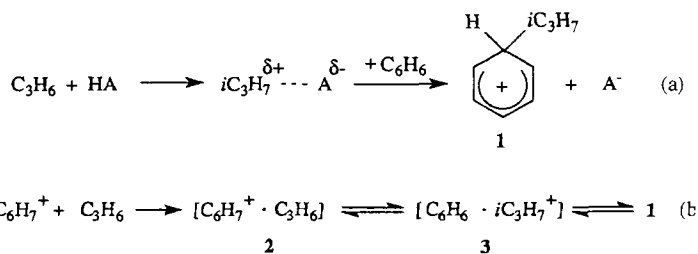
einem Präzisionsvoltmeter protokolliert. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus den Meßdaten nach der Methode von Swinbourne^[23] abgeleitet.

- [15] J. M. Brown, B. T. Golding, J. J. Stofko, Jr., *J. Chem. Soc. Perkin 2* **1979**, 436.
- [16] M. Schneider, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 717; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 707.
- [17] W. Boland, L. Jaenicke, D. G. Müller, A. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 144, 169.
- [18] W. Boland, F.-J. Marner, L. Jaenicke, D. G. Müller, E. Fölster, *Eur. J. Biochem.* **1983**, 134, 97.
- [19] W. Boland, K. Jakoby, L. Jaenicke, D. G. Müller, E. Fölster, *Z. Naturforsch. C* **1980**, 36, 262.
- [20] G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron* **1994**, 50, 10235.
- [21] I. Maier, M. Calenberg, *Bot. Acta* **1994**, 107, 451.
- [22] Die aktuelle Konzentration des Pheromons im Seewasser errechnet sich aus ihrer Konzentration im biologisch inerten Lösungsmittel (Fluorkohlenwasserstoff FC72, 3M Company, Düsseldorf) und ihrem Verteilungskoeffizienten $K(\text{FC72/Seewasser})$. Für das instabile (1R,2S)-**7a** kann der Koeffizient $K(\text{FC72/Seewasser})$ nur näherungsweise zu 2000 abgeschätzt werden, für das stabile *trans*-Isomer beträgt er 2700. (Zum Vergleich: Die Verteilungskoeffizienten von *cis*- und *trans*-disubstituierten Cyclopentenpheromonen^[19] betragen 4800 bzw. 6200).
- [23] E. S. Swinbourne, *J. Chem. Soc.* **1960**, 473, 2371.

Die Crafts-Friedel-Reaktion: aromatische Alkylierung innerhalb eines [Arenium-Ion-Olefin]-Komplexes in der Gasphase**

Massimiliano Aschi, Marina Attinà und Fulvio Cacace*

Bei der Alkylierung von Arenen mit Olefinen, eine der wichtigsten industriellen Anwendungen der Friedel-Crafts-Reaktion, werden die Alkene zunächst durch Brønsted-Säuren wie $\text{H}(\text{BF}_3\text{OH})$, $\text{H}(\text{AlCl}_3\text{OH})$, H_2SO_4 etc. protoniert; anschließend wird das entstandene Carbenium-Ion oder der polarisierte Komplex^[1] an das Aren addiert [Gl. (a)]. Ein alternativer Reaktionsweg, bei dem die Alkylierung innerhalb eines von einem Arenium-Ion und einem Olefin gebildeten Komplexes stattfindet, ist ebenfalls denkbar [Gl. (b)].



Gleichung (b) entspricht nur dann einem eigenständigen Reaktionsweg mit spezieller Kinetik und Mechanismus, wenn die Alkylierung innerhalb des Komplexes erfolgt, ohne daß sich die Reaktanten trennen. Entweicht jedoch das Carbenium-Ion in das Medium und reagiert mit dem Aren erst in einem späteren Stadium, so ist die Reaktionssequenz (b) eine herkömmliche

[*] Prof. Dr. F. Cacace, Dr. M. Aschi
Università di Roma „La Sapienza“
Piazzale Aldo Moro 5, I-00185 Rom (Italien)
Telefax: Int. + 6/4991-3888
Prof. Dr. M. Attinà
Università di Camerino (Italien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministero per l'Università e la Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) und vom Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) gefördert.