

- J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2034; für intermolekulare Reaktionen siehe: b) G. Lalic, Z. Petrovski, D. Galonic, R. Matovic, R. N. Saicic, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 763.
- [7] Für die Reaktion von Dianionen mit Epoxiden siehe: a) T. A. Bryson, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3428; b) M. Yamaguchi, I. Hirao, *Chem. Lett.* **1985**, 337; c) B. Lygo, N. O'Connor, P. R. Wilson, *Tetrahedron* **1988**, *22*, 6881.
- [8] a) A. G. M. Barrett, H. G. Sheth, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5017; b) Y. S. Rao, *Chem. Rev.* **1976**, *76*, 625; c) G. Pattenden, *Prog. Chem. Nat. Prod.* **1978**, *35*, 133; d) D. W. Knight, *Contemp. Org. Synth.* **1994**, *1*, 287.
- [9] a) P. Langer, I. Freifeld, E. Holtz, *Synlett* **2000**, 501; b) P. Langer, I. Freifeld, *Chem. Eur. J.* **2000**, im Druck; c) M. Nakada, Y. Iwata, M. Takano, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 9077.
- [10] Für stereoelektronische Betrachtungen zur Regioselektivität von Cyclisierungen siehe: J. E. Baldwin, L. I. Kruse, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 233. Für  $TiCl_4$ -vermittelte, intermolekulare Michael-Reaktionen von 3-Trimethylsilyloxybutenoaten siehe: T. H. Chan, P. Brownbridge, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 387.
- [11] Zur Konfiguration von Monoanionen von 1,3-Dicarbonylverbindungen siehe: a) S. J. Rhoads, R. W. Holder, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 5443; b) B. Miller, H. Margulies, T. Drabb, Jr., R. Wayne, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 3801; c) B. Miller, H. Margulies, T. Drabb, Jr., R. Wayne, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 3805; d) G. Entenmann, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4241; e) C. Cambillau, P. Sarthou, G. Bram, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 281; f) Übersicht: D. Seebach, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1685; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1624.
- [12] a) H. Gerlach, H. Wetter, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 2306; b) U. Schmidt, J. Gombos, E. Haslinger, H. Zak, *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 2628; c) P. A. Bartlett, J. D. Meadows, E. Ottow, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5304; d) Lit. [8a].
- [13] T. L. B. Oivin, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 3309, zit. Lit.
- [14] Für die Korrelation zwischen der chemischen Verschiebung der CH-Wasserstoffatome und der Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung von  $\gamma$ -Alkylidenbutenoliden siehe z. B.: a) K. Siegel, R. Brückner, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1116; für einen Vergleich der  $^1H$ -NMR-Daten der Tetrahydrofurane **5a, b** mit den Daten verwandter Verbindungen mit bekannter Konfiguration siehe z. B.: b) S. Bystöm, H.-E. Höglberg, T. Norin, *Tetrahedron* **1981**, 2249.

## Verwundungsaktivierte chemische Verteidigung in einzelligen planktonischen Algen\*\*

Georg Pohnert\*

Diatomeen (Kieselalgen) sind im Süßwasser und im Meer weit verbreitete einzellige Algen. Sie bilden einen wichtigen Bestandteil des Phytoplanktons, kommen aber auch als Biofilm auf festen Substraten vor. Obwohl diese Klasse von Mikroalgen zu den bedeutendsten Primärproduzenten in der marinen Nahrungskette zählt, ist nicht viel über ihre chemische Verteidigung bekannt. Zu den wenigen beschriebenen Beispielen zählen die Aldehyde Decadienal **5** und Decatrienal **6** (siehe Schema 1), die aus der planktonischen Diatomee

[\*] Dr. G. Pohnert  
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie  
Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (Deutschland)  
Fax: (+49) 3641-643665  
E-mail: pohnert@ice.mpg.de

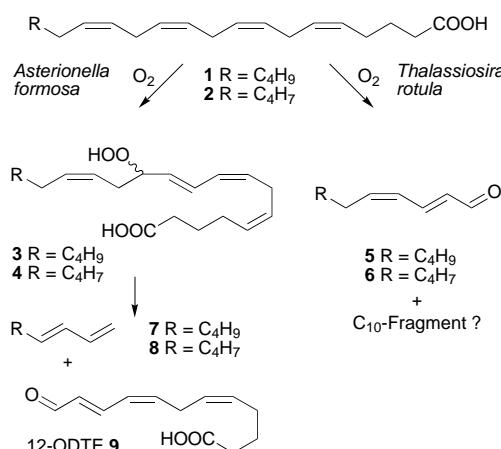
[\*\*] Ich danke Prof. S. Poulet (Roscoff, Frankreich) für die *T. rotula*-Kulturen, Prof. Dr. W. Boland für hilfreiche Diskussionen und J. Rechtenbach für die technische Assistenz.

*Thalassiosira rotula* isoliert wurden.<sup>[1]</sup> In Gegenwart dieser Verbindungen wird der Fortpflanzungserfolg von Copepoden (herbivoren Zooplankttern) stark herabgesetzt, da weniger ihrer Larven schlüpfen. Damit kann das Paradox erklärt werden, dass diese Herbivoren weniger erfolgreich sind, wenn sie auf einer diatomeenreichen Diät leben, obwohl Diatomeen als hochwertige Futterquelle gelten.<sup>[1]</sup>

Gegenstand dieser Arbeit ist die Biosynthese von Oxylinen (Metaboliten, die aus der oxidativen Umsetzung von Fettsäuren resultieren) wie **5** oder **6** in Diatomeen. Es wird gezeigt, dass die Bildung von  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Dienalen in planktonischen Algen weit verbreitet ist und dass die enzymatische Bildung dieser Metaboliten innerhalb von Sekunden nach Verwundung der Algen aktiviert wird. Dieser Mechanismus führt zum schnellen Aufbau von lokal erhöhten Konzentrationen der chemischen Verteidigungsmetaboliten **5** und **6** oder von strukturverwandten Dienalen wie **9**.

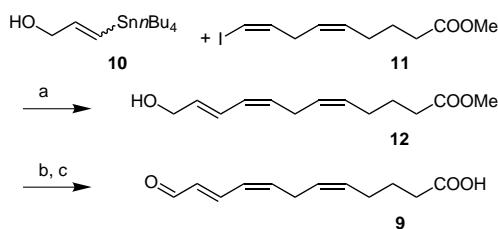
Wir konnten bereits in früheren Untersuchungen zeigen, dass die benthische Diatomee *Gomphonema parvulum*  $C_{20}$ -Fettsäuren oxidativ zu  $C_{11}$ -Kohlenwasserstoffen und (5Z,8Z)-9-Oxonona-5,7-diensäure umsetzen kann.<sup>[2,3]</sup> Diese Säure enthält bemerkenswerterweise das gleiche Strukturelement wie die  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Dienale **5** und **6** aus *T. rotula*, und es ist wahrscheinlich, dass sie eine wichtige Rolle in der Wehrchemie von *G. parvulum* spielt.<sup>[2]</sup> Um zu überprüfen, ob die während Diatomeenblüten häufiger detektierten flüchtigen Kohlenwasserstoffe allgemein als Indikatoren für die simultane Produktion von konjugierten Dienalen gesehen werden können, wird hier die Biosynthese von  $C_8$ -Kohlenwasserstoffen in der planktonischen Süßwasserdiatomee *Asterionella formosa* untersucht. In mechanisch oder durch osmotischen Schock beschädigten Zellsuspensionen dieser Alge lässt sich (3E,5Z)-Octa-1,3,5-trien **8** und (3E)-Octa-1,3-dien **7** nachweisen.<sup>[4,5]</sup> In Analogie zur Biosynthese von  $C_{11}$ -Kohlenwasserstoffen in *G. parvulum*<sup>[2]</sup> könnte (5Z,8Z,10E)-12-Oxododeca-5,8,10-triensäure **9** (12-ODTE) neben **7** und **8** als polares Fragment aus der oxidativen Spaltung der Fettsäuren **1** und **2** hervorgehen (Schema 1).

Durch HPLC/MS können Sekundärmetaboliten aus zellfreien *A. formosa*-Lösungen direkt und ohne aufwändige Extraktions- und Anreicherungsschritte untersucht werden.<sup>[6]</sup>



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus für die oxidative Umsetzung von  $C_{20}$ -Fettsäuren durch mechanisch beschädigte Diatomeen.

Mit dieser Methode konnte die schnelle Bildung einer dominanten mittelpolaren Verbindung verfolgt werden, deren Molekülmasse ( $m/z$  209 [ $M+H^+$ ]), Hauptfragmention ( $m/z$  191 [ $M+H^+-H_2O$ ]) und UV-Absorption ( $\lambda_{max}=279\text{ nm}$ ) mit der postulierten Struktur von 12-ODTE **9** in Einklang steht. Für eine eindeutige Identifizierung von **9**[6] und um genügend Material für Bioassays zur Verfügung zu haben, wurde eine Probe dieser Verbindung synthetisiert (Schema 2).



Schema 2. Synthese von 12-ODTE **9**: a) DMF,  $[(CH_3CN)_2PdCl_2$ ] (0.1 Mol-%), Raumtemperatur, 1.5 Äquiv. **10** ( $E/Z=75/25$ ), **11**,<sup>[17]</sup> 86% **12** ( $5Z/E > 97/3$ ,  $8Z/E > 97/3$ ,  $10Z/E = 5/95$ ); b)  $MnO_2$ ,  $CH_2Cl_2$ , 5 min, Raumtemperatur, 84%; c) PPL (Schweinepankreaslipase), Phosphatpuffer (pH 7), RP-MPLC, 81% **9** ( $5Z/E > 97/3$ ,  $8Z/E > 97/3$ ,  $10Z/E = 5/95$ ; spektroskopische Daten in Lit. [18]).

Nach Zugabe von [ $5,6,8,9,11,12,14,15-^2H_8$ ]Arachidonsäure **1** zur zellfreien Lösung von *A. formosa* entstand sechsfach deuterierte 12-ODTE **9** ( $m/z$  215 [ $M+H^+$ ]). Das intakte C1–C12-Segment des Substrats **1** wird somit in **9** überführt. Daneben wird, wie GC/MS-Messungen ergaben, [ $^2H_2$ ](3E)-Octa-1,3-dien **7** als zweites markiertes Fragment der oxidativen Fettsäurespaltung von [ $^2H_8$ ]**1** gebildet.

Die Bildung von **7** und **8** durch *A. formosa* ist sauerstoff-abhängig.<sup>[4]</sup> Durch Abfangexperimente<sup>[7]</sup> konnte gezeigt werden, dass 12-Hydroperoxyeicosatetraensäure **3** ein Intermediat in der Biosynthese von **7** ist. Diese erfolgt damit höchstwahrscheinlich katalysiert durch eine Lipoxygenase/Hydroperoxid-Lyase. Fettsäureabgeleitete flüchtige Kohlenwasserstoffe, die häufig während Diatomeenblüten detektiert werden, können also tatsächlich als Indikatoren für die simultane Produktion von reaktiven Michael-Acceptoren wie 12-ODTE **9** oder (5Z,7E)-9-Oxonona-5,7-diensäure<sup>[2]</sup> gesehen werden.

Die Biosynthese von Decadienal **5** und Decatrienal **6** durch *T. rotula* erfolgt bemerkenswerterweise auch ausgehend von C<sub>20</sub>-Fettsäuren. Nach Zugabe von [ $^2H_8$ ]Arachidonsäure **1** zu mechanisch beschädigten Zellen von *T. rotula* kommt es zu einer schnellen Bildung von [ $^2H_4$ ]Decadienal **5**.<sup>[8]</sup> Demgegenüber führen analoge Experimente mit Linolsäure (C<sub>18</sub>) zu keiner verstärkten Bildung von Decadienal **5**; diese kann somit nicht als Vorstufe von **5** gelten. Die Nutzung von Eicosanoiden zur Produktion von flüchtigen Aldehyden durch *T. rotula* steht im Kontrast zur Biosynthese dieser Verbindungen durch terrestrische Pflanzen, die im Allgemeinen von C<sub>18</sub>-Fettsäuren ausgeht.<sup>[9]</sup> *T. rotula* folgt damit der bei Algen häufig zu beobachtenden Präferenz von C<sub>20</sub>-Fettsäuren für die Produktion von Oxylipinen.<sup>[10]</sup>

Obwohl zahlreiche Diatomeen ungesättigte Aldehyde und flüchtige Kohlenwasserstoffe produzieren, konnten diese

Fettsäureabbauprodukte nicht in vorsichtig isolierten intakten Algen nachgewiesen werden.<sup>[4, 11]</sup> Unmittelbar nach mechanischer Beschädigung der Zellen ändert sich diese Situation allerdings drastisch. Die Produktion von Aldehyden setzt nach nur wenigen Sekunden ein. Schon nach 1–3 Minuten können bis zu 49 fmol 12-ODTE **9** pro Zelle *A. formosa* (Abbildung 1a) und 4.1 fmol Decatrienal **6** pro Zelle *T. rotula* (Abbildung 1b) nachgewiesen werden.<sup>[11]</sup> Dieser schnelle enzymatische Fettsäureabbau zu den Aldehyden **5** und **6** durch verwundete *T. rotula*-Zellen ist damit ein außerordentlich effizienter Mechanismus der verwundungsaktivierten chemischen Verteidigung.

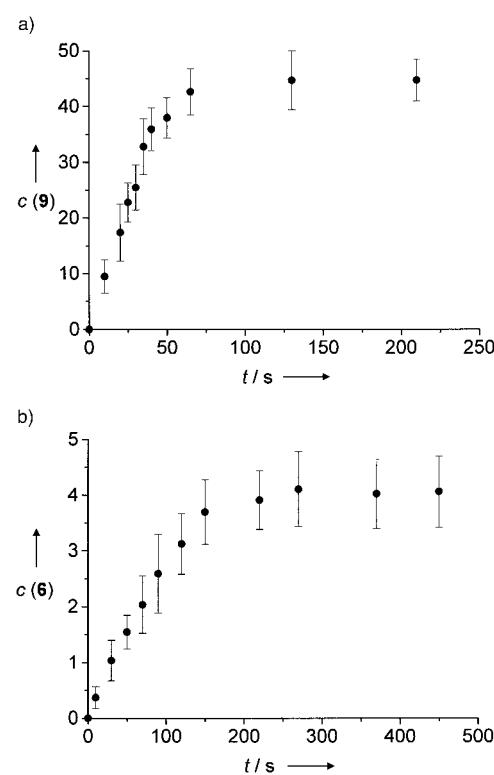


Abbildung 1. Kinetik der Produktion von  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyden nach mechanischer Beschädigung von planktonischen Diatomeen. a) 12-ODTE(**9**)-Produktion [fmol pro Zelle] nach mechanischer Beschädigung von *A. formosa*. b) Decatrienal(**6**)-Produktion [fmol pro Zelle] nach mechanischer Beschädigung von *T. rotula*. Nicht beschädigte Algen enthalten keine nachweisbaren Mengen der Aldehyde **9** bzw. **6**.

Während die Rolle von Decadienal **5** und Decatrienal **6** in der Wehrchemie von *T. rotula* bereits beschrieben ist,<sup>[1]</sup> muss die ökologische Bedeutung von 12-ODTE **9** und anderen strukturverwandten  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Dienalen noch genauer untersucht werden. Erste Versuche deuten darauf hin, dass **9** und (5Z,7E)-9-Oxonona-5,7-diensäure eine fungizide Wirkung gegen *Schizophyllum commune* und *Aspergillus nidulans* aufweisen.<sup>[12]</sup> Die ökologische Bedeutung dieses Befunds muss allerdings noch in Experimenten mit spezialisierten parasitären Pilzen, die oft während Frühjahrsblüten von *A. formosa* auftreten,<sup>[13]</sup> überprüft werden. (5Z,7E)-9-Oxonona-5,7-diensäure übt darüber hinaus bereits in niedrigen Konzentrationen fraßhemmende Wirkung auf die herbivoren marinen Amphipoden *Amphitoe longimana* aus.<sup>[14]</sup>

Durch die schnelle Umsetzung von Fettsäuren nach Beschädigung der Zellen sind *A. formosa* und *T. rotula* in der Lage, sehr hohe lokale Konzentrationen der Verteidigungsmetaboliten **5** und **6** oder strukturverwandter Michael-Acceptoren wie **9** aufzubauen. Diese enzymatischen Mechanismen führen dazu, dass die reaktiven Aldehyde direkt gegen die jeweiligen Fraßfeinde gerichtet sind, die durch ihre Tätigkeit die Verteidigung der Diatomeen aktivieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die fettsäureabbauenden Enzyme auch noch im Verdauungstrakt der jeweiligen Fraßfeinde aktiv sind.<sup>[15]</sup> Durch derartige Mechanismen könnten sogar die hohen Konzentrationen von ca. 10 µM **5** oder **6** aufgebaut werden, die zur effektiven Verringerung des Bruterfolgs von Copepoden nötig sind.<sup>[1]</sup>

In den hier untersuchten Diatomeen werden damit die zellulären Ressourcen in die Produktion von C<sub>20</sub>-Fettsäuren investiert, die nur bei Bedarf für die chemische Verteidigung aktiviert werden. Die energieaufwändige Produktion von Sekundärmetaboliten zur konstitutiven Verteidigung kann damit verringert werden, und gleichzeitig ist das Risiko der Selbstvergiftung durch aggressive Metaboliten minimiert. Die Erforschung von chemischen Verteidigungsmechanismen in planktonischen Mikroorganismen ist noch in den Anfängen, und die hier vorgestellte dynamische Verteidigungsstrategie kann zu einem genaueren Verständnis der komplexen Prozesse in diesem Lebensraum beitragen.

## Experimentelles

Allgemeines: *A. formosa* (SAG, Universität Göttingen) wurde wie beschrieben kultiviert;<sup>[5]</sup> *T. rotula* (von S. Poulet, Roscoff, Frankreich) wurde in künstlichem Seewasser<sup>[16]</sup> als stehende Kultur bei 19 °C (Tag:Nacht 14:10) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation konzentriert. Alle Versuche wurden mit konzentrierten Zellsuspensionen im Kulturmedium durchgeführt. Die zellfreien Extrakte wurden wie beschrieben hergestellt.<sup>[2]</sup>

Eingegangen am 7. Juni 2000 [Z15234]

- [1] A. Miraldo, G. Barone, G. Romano, S. A. Poulet, A. Ianora, G. L. Russo, I. Buttino, G. Mazzarella, M. Laabir, M. Cabrini, M. G. Giacobbe, *Nature* **1999**, *402*, 173–176.
- [2] G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10073–10082.
- [3] M. Hombeck, G. Pohnert, W. Boland, *Chem. Commun.* **1999**, 243–244.
- [4] T. Wendel, F. Jüttner, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1445–1449.
- [5] M. Hombeck, W. Boland, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11033–11042.
- [6] 20 µL des zellfreien Extraktes von *A. formosa* wurden direkt oder nach Zugabe von 6 µg mL<sup>-1</sup> [<sup>3</sup>H]<sub>5</sub>Arachidonsäure **1** (Sigma, Deisenhofen) RP-HPL-chromatographisch untersucht (Detektion: Finnigan LCQ mit Finnigan-LC/MS-APCI-Interface, Vaporizer 460 °C). Die spektroskopischen und chromatographischen Eigenschaften des *A.-formosa*-Metaboliten stimmen mit denen von synthetischem **9** überein.
- [7] Abfangexperimente wurden wie beschrieben durchgeführt,<sup>[2]</sup> und die Identität des Intermediats wurde durch Vergleich der HPLC/MS-Eigenschaften mit denen reiner 12-Hydroxyeicosatetraensäure (SIGMA, Deisenhofen) überprüft.
- [8] **5** und **6** wurden durch Festphasenmikroextraktion (SPME; D. Spitteler, G. Spitteler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 595–597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 583–585) aus zellfreien Extrakten von *T. rotula* mit und ohne 6 µg mL<sup>-1</sup> [<sup>3</sup>H]<sub>5</sub>Arachidonsäure **1** angereichert und mit GC/MS analysiert.
- [9] a) E. Blee, *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 33–72; b) S. Tahara, S. Kasai, M. Inoue, J. Kawabata, J. Mizutani, *Experientia* **1994**, *50*, 137–141.

- [10] a) W. H. Gerwick, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1211*, 243–255; b) W. Boland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 37–43.
- [11] Nach Konzentration der Zellen durch Zentrifugation wurde die Bildung von Lyaseprodukten durch Einstellen von pH 1 mit 2 N HCl verhindert. Bei pH 1 entstand 12-ODTE **9** nicht; 96% an **9** konnten nach analoger Behandlung einer synthetischen Referenzprobe bei pH 1 wiedergefunden werden. Die konzentrierte Zellsuspension ( $6.4 \times 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup>) wurde mit Ultraschall behandelt (eine lichtmikroskopische Beurteilung zeigt, dass 80% der Zellen zerstört sind), zentrifugiert und mit HPLC/MS untersucht. Keine nachweisbare Menge an **9** wurde in intakten Zellen gefunden. Kinetische Versuche wurden nach Behandlung der Zellen mit Ultraschall (siehe oben) im neutralen Medium durchgeführt. Die Produktion von **9** wurde für die kinetischen Messungen zum jeweiligen Zeitpunkt durch Einstellung von pH 1 der Proben gestoppt. Für kinetische Messungen mit *T. rotula* wurden **5** und **6** mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und per GC/MS quantifiziert.
- [12] Die fungizide Wirkung wurde nach Standardmethoden (S. Ohta, M. Makino, K. Nagai, H. Zenda, *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 308–310) bestimmt. 12-ODTE **9** wies gegenüber *Aspergillus nidulans* etwa ein Zehntel der Aktivität von Benzalkoniumchlorid auf.
- [13] E. van Donk, J. Ringelberg, *Freshwater Biol.* **1983**, *13*, 241–251.
- [14] I. Schnitzler, G. Pohnert, M. E. Hay, W. Boland, *Oecologia* **2001**, im Druck.
- [15] a) G. V. Wolfe, M. Steinke, G. O. Kirst, *Nature* **1997**, *387*, 894–897; b) G. V. Wolfe, *Biol. Bull.* **2000**, *198*, 225–244.
- [16] H. Müller, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **1972**, *38*, 399–484.
- [17] K. C. Nicolaou, J. Y. Ramphal, Y. Abe, *Synthesis* **1989**, 898–901.
- [18] P. H. Naccache, Y. Leblanc, J. Rokach, P. Patrignani, B. F. de Laclos, P. Borgeat, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1133*, 102–106.

## Kombinatorische Festphasensynthese von multivalenten cyclischen Neoglycopeptiden\*\*

Valentin Wittmann\* und Sonja Seeberger

Professor Horst Kessler gewidmet

Die molekulare Erkennung von Kohlenhydraten durch Kohlenhydrat-bindende Proteine (Lectine) ist die Basis zahlreicher interzellulärer Erkennungsprozesse.<sup>[1]</sup> Hochaffine Lectinliganden sind von großem medizinischem Interesse in der Diagnostik und Manipulation solcher Prozesse.<sup>[2]</sup> Individuelle Kohlenhydratepitope (in der Regel Mono- bis Pentasaccharide) werden von Lectinen allerdings meist nur mit niedriger Affinität (Dissoziationskonstanten im milli- bis mikromolaren Bereich) und zum Teil geringer Spezifität gebunden.<sup>[3]</sup> Da viele membranständige Lectine mehrere

[\*] Dr. V. Wittmann, Dipl.-Chem. S. Seeberger  
Institut für Organische Chemie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt (Deutschland)  
Fax: (+49) 69-798-29148  
E-mail: wittmann@chemie.uni-frankfurt.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken Prof. Joachim W. Engels für seine Unterstützung und der Degussa-Hüls AG für Aminosäurespenden. Verwendete Abkürzungen werden in Lit. [25] erwähnt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können vom Autor angefordert werden.