

**Beatrix Girmann**

---

**Beiträge zur Isolierung und Strukturaufklärung  
der Viscotoxine aus *Viscum album* L.  
sowie von cytotoxischen Komponenten  
der Gilvocarcin-Reihe aus Streptomyceten**

---



**Cuvillier Verlag Göttingen**

**Beiträge zur Isolierung und Strukturaufklärung der  
Viscotoxine aus *Viscum album* L.  
sowie von cytotoxischen Komponenten  
der Gilvocarcin-Reihe aus Streptomyceten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Beatrix Girmann**

aus

Dernbach

Göttingen 2002

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2002  
ISBN 3-89873-745-4

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck  
Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen  
Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2003

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-745-4

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen von August 1999 bis Dezember 2002 unter Anleitung von Prof. Dr. Axel Zeeck durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Zeeck für die interessante Themenstellung, für seine stete Förderung sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.



---

# Inhaltsverzeichnis

## A. Theoretischer Teil

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Naturstoffe als Antitumorwirkstoffe	1
2. Ansätze für eine selektivere Tumorthherapie	5
<b>II. Aufgabenstellung</b>	<b>8</b>
<b>III. Viscotoxine aus der europäischen Mistel <i>Viscum album</i> L.</b>	<b>10</b>
1. Die Pflanze <i>Viscum album</i> L.	10
1.1. Botanik der Mistel	10
1.1.1. Systematische Stellung und Verbreitung	10
1.1.2. Lebensweise und Wirtsbäume der Mistel	10
1.1.3. Entwicklung und Wachstum	11
1.1.4. Die Sonderstellung der Mistel	12
1.2. Eine heilkräftige Pflanze mit langer Tradition	12
1.3. Viscotoxine und andere Inhaltsstoffe der Mistel	14
1.3.1. Viscotoxine	14
1.3.2. Mistellektine	17
1.3.3. Weitere Inhaltsstoffe	20
2. HPLC-Analytik von Viscotoxinen	21
2.1. Optimierung der HPLC-Analytik mit Referenzsubstanzen	21
2.2. Reproduktion der Referenzsubstanzen mittels HPLC und Massenspektrometrie	23
3. Isolierung der Viscotoxine von verschiedenen Wirtsbäumen	26
3.1. Viscotoxine aus <i>Viscum album</i> ssp. <i>album</i> (Pappel)	27
3.1.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	27
3.1.2. Präparative Isolierung mittels HPLC	28
3.1.3. Massenspektrometrische Analyse der isolierten Substanzen	30
3.1.4. Diskussion der Ergebnisse	32
3.2. Viscotoxin U-PS ( <b>17</b> ) aus <i>Viscum album</i> ssp. <i>austriacum</i> (Kiefer)	34
3.2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	34
3.2.2. Präparative Isolierung mittels HPLC	35

3.2.3. Massenspektrometrische Analyse von Viscotoxin U-PS ( <b>17</b> )	37
4. Zur biologischen Aktivität der Viscotoxine	37
4.1. Übersicht zum Stand der Forschung	37
4.2. Eigene Arbeiten zur biologischen Aktivität	39
5. Versuche zur Stabilität von Viscotoxin A1 ( <b>12</b> ), A2 ( <b>13</b> ), A3 ( <b>14</b> ), B ( <b>15</b> ), 1-PS ( <b>16</b> ), U-PS ( <b>17</b> ) und B2 ( <b>19</b> )	42
6. Phosphatbestimmung	43
6.1. Qualitative Phosphorbestimmung	43
6.2. Quantitative Photometrische Analyse	44
6.3. Diskussion der Ergebnisse	45
7. Primärstrukturanalysen von Viscotoxin A3 ( <b>14</b> ) und Viscotoxin U-PS ( <b>17</b> )	45
7.1. Viscotoxin A3 ( <b>14</b> )	46
7.1.1. Reduktive Carboxymethylierung und tryptischer Verdau	46
7.1.2. Sequenzierung mit Tandem-Massenspektrometrie	49
7.2. Viscotoxin U-PS ( <b>17</b> )	55
7.2.1. N-terminale Sequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau	55
7.2.2. Reduktive Carboxymethylierung und tryptischer Verdau	57
7.2.3. ESI-MS/MS-Analyse	58
7.2.4. Datenbank-Recherche	62
8. Röntgenstrukturanalyse	64
8.1. Röntgenstrukturanalyse von Viscotoxin A3 ( <b>14</b> )	65
8.1.1. Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung	65
8.1.2. Interpretation der Kristallstruktur von Viscotoxin A3 ( <b>14</b> )	66
8.2. Röntgenstrukturanalyse von Viscotoxin B2 ( <b>19</b> )	68
8.2.1. Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung	68
8.2.2. Interpretation der Kristallstruktur von Viscotoxin B2 ( <b>19</b> )	70
9. Ausblick	72
<b>IV. Sekundärmetaboliten der Gilvocarcin-Gruppe</b>	<b>75</b>
1. <i>Streptomyces griseoflavus</i> Stamm Gö 3592/1	75
1.1. Bekannte Sekundärmetaboliten	75
1.2. Variation der Kultivierungsbedingungen	76
1.2.1. Nährmedienvariationen	77
1.2.2. Kultivierungsgefäße	82
1.2.3. Zusatz von Oberflächenmaterialien	84

---

1.3. Identifizierung der Sekundärmetaboliten	85
1.3.1. Gilvocarcin V ( <b>22</b> )	85
1.3.2. Gilvocarcin M ( <b>28</b> )	87
1.3.3. Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat ( <b>23</b> )	88
1.3.4. Ferrioxamin E ( <b>29</b> )	90
2. <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 2471	91
2.1. Bekannte Sekundärmetaboliten	91
2.2. Variation der Kultivierungsbedingungen	92
2.2.1. Nährmedien	92
2.2.2. Kultivierungsgefäße	95
2.2.3. Zusatz von Oberflächenmaterialien	95
2.3. Charakterisierung und Strukturaufklärung	96
2.3.1. Chrysomycin A ( <b>11</b> )	96
2.3.2. Chrysomycin B ( <b>34</b> )	97
2.3.3. Chrysomycin C ( <b>35</b> )	98
2.3.4. Chrysomycin D ( <b>36</b> )	99
2.3.5. Chrysomycin E ( <b>37</b> )	100
2.3.6. Chrysomycin A <sub>2</sub> ( <b>38</b> )	103
2.3.7. Chrysomycin B <sub>2</sub> ( <b>39</b> )	104
2.4. Versuche zur Interaktion des Stammes Tü 2471 mit <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 6024	105
2.4.1. Allgemeines	105
2.4.2. Plattenausstrichmethoden	106
2.4.3. Mischfermentationen	107
2.5. Beurteilung der Biosyntheseleistung der Stämme Gö 3592/1 und Tü 2471	108
2.6. Zur biologischen Aktivität der isolierten Substanzen	109
2.7. Weitere Metaboliten der Gilvocarcin-Reihe	113
<b>V. Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>115</b>



---

## B. Experimenteller Teil

<b>I. Allgemeines</b>	<b>119</b>
1. Verwendete Geräte	119
2. Chromatographische Methoden	121
3. Mikrobiologische Methoden	124
4. Biologische Tests	125
<b>II. Viscotoxine aus der europäischen Mistel <i>Viscum album</i> L.</b>	<b>126</b>
1. Erstellung des HPLC-Viscotoxin-Standards	126
2. Isolierung der Viscotoxine aus <i>Viscum album</i> L.	127
2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials bis zum Viscotoxin-Rohprodukt	127
2.2. Aufreinigung der Viscotoxine aus dem Rohprodukt	128
2.3. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial und Isolierung von U-PS ( <b>17</b> ) aus Kiefernmisteln	133
3. Versuche zur Stabilität der Viscotoxine	135
4. Quantitative photometrische Analyse von Phosphor	135
5. Primärstrukturanalyse von Viscotoxin A3 ( <b>14</b> ) und U-PS ( <b>17</b> )	136
5.1. Reduktion und Carboxymethylierung	136
5.2. Tryptischer Abbau am nativen Mikroprotein	137
5.3. Tryptischer Abbau von reaktiv-carboxymethylierten Mikroproteinen	138
<b>III. Arbeiten an Produzenten der Gilvocarcin-Reihe</b>	<b>144</b>
1. Stammhaltung	144
1.1. Agarplatten	144
1.2. Langzeithaltung in flüssigem Stickstoff	144
2. Nährmedienvariationen und chemisches Screening	144
3. Weitere Variationen der Kultivierungsbedingungen	145
4. <i>Streptomyces griseoflavus</i> Stamm Gö 3592/1	146
4.1. Vorkulturen	146
4.2. Variationen der Hauptkultur	146
4.3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen	147
4.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus Gö 3592/1	147
5. <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 2471	152
5.1. Vorkulturen	152

---

5.2. Variationen der Hauptkultur	152
5.3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen	152
5.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus Tü 2471	153
6. Versuche zur gegenseitigen Beeinflussung von <i>Streptomyces</i> sp. Tü 2471 und <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6024	160
6.1. Agarplatten-Ausstriche	160
6.2. Flüssige Mischkulturen	160

### **C. Anhang**

<b>I. Kristalldaten der Verbindungen (<u>14</u>) und (<u>19</u>)</b>	<b>162</b>
<b>II. Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren</b>	<b>164</b>
<b>III. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>165</b>
<b>IV. Literaturverzeichnis</b>	<b>168</b>



## **A. Theoretischer Teil**

### **I. Einleitung**

Mit nahezu 25 % aller Todesfälle zählt Krebs heute nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit knapp 50 % zur zweithäufigsten Todesursache in Deutschland.<sup>1</sup> In drei von vier Fällen von Krebsneuerkrankungen sind die Betroffenen älter als 60 Jahre und bei einer weiter ansteigenden Lebenserwartung könnte Krebs bald zur häufigsten Todesursache überhaupt werden.<sup>2</sup> Die Tatsache, daß nur die Hälfte der Krebspatienten einen Zeitraum von fünf Jahren nach der Erstdiagnose überlebt, zeigt, wie nötig eine Verbesserung der heutigen Behandlungsmethoden ist. Die Vielschichtigkeit und Komplexität der Krebserkrankungen erschwert deren Therapie erheblich. So gibt es etwa 100 verschiedene bisher identifizierte Arten von Krebs beim Menschen, die es unmöglich machen, von einem einheitlichen Krankheitsbild zu sprechen. Eine entscheidende Schwäche der heutigen Therapieformen ist ein Mangel an Selektivität, so daß neben den außer Kontrolle geratenen Krebszellen auch gesundes Gewebe angegriffen wird. Zudem ist die Anzahl der Faktoren, die für einen Ausbruch und den Verlauf der Krankheit von Bedeutung sind, immens groß und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Diese Vielzahl von Problemen macht deutlich, daß eine effektive Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen nicht allein Gegenstand einer einzelnen wissenschaftlichen Disziplin sein kann, sondern nur durch interdisziplinäre Zusammenarbeit und die Schaffung neuer Forschungsfelder zu bewältigen ist.

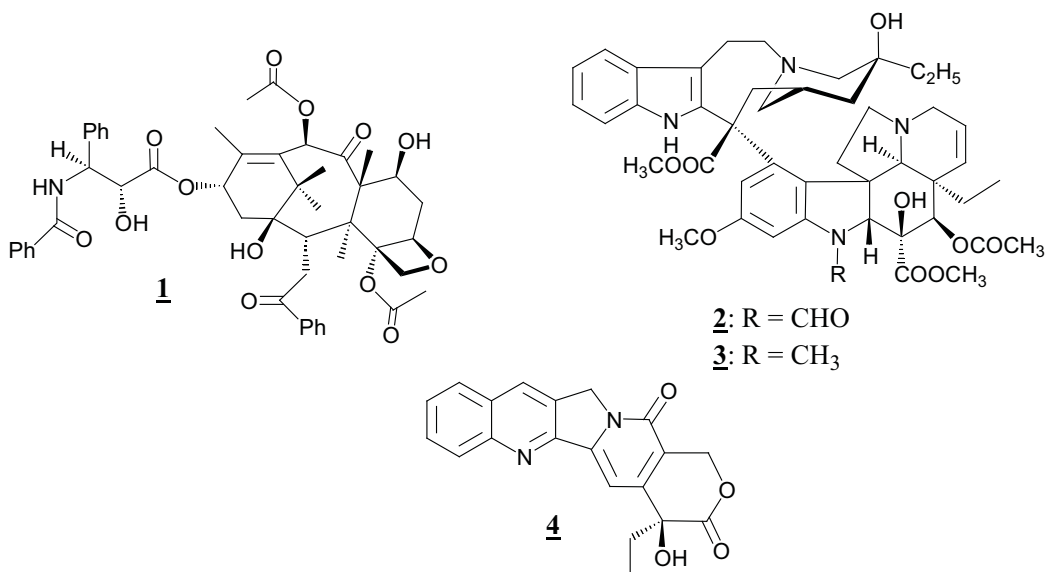
#### **1. Naturstoffe als Antitumorwirkstoffe**

Ein Beitrag, den die Naturstoffchemie leisten kann, ist die Suche nach neuen Leitstrukturen für die medikamentöse Behandlung von Krebs. Naturstoffe nehmen in der Krebstherapie eine herausragende Stellung ein, so waren es denn auch Strukturen natürlichen Ursprungs, die in den letzten 30 Jahren die Hauptstütze der Chemotherapie

gebildet haben.<sup>3</sup> Heute lassen sich über die Hälfte aller zugelassenen Krebsmedikamente auf natürliche Substanzen zurückführen, und kaum eine Entdeckung hat bisher die klinische Onkologie so stark verändert wie die der Vinca-Alkaloide, Podophyllotoxine und der Taxane.

### *Pflanzen als Quelle von Antitumormitteln*

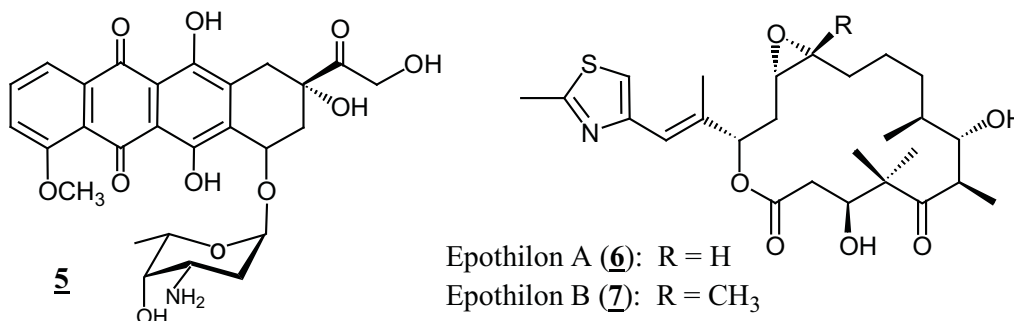
Das wichtigste Krebstherapeutikum aus Pflanzen ist das aus der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isolierte Taxol (**1**), das unter dem Namen Paclitaxel auf dem Markt ist. Dieser Metabolit wurde bei einer Studie des National Cancer Institute (NCI) entdeckt, die in den Jahren 1960 bis 1982 35.000 Pflanzenextrakte auf ihre cytotoxische Aktivität hin untersuchte.<sup>4</sup> Taxol greift durch Blockade der Mitose in die Zellteilung ein und hemmt dabei die Depolymerisation der Mikrotubuli zu Tubulin.<sup>5</sup> Zur Zeit ist Taxol das meistverkaufte Cytostatikum, in den USA erzielte es im Jahr 2000 einen Umsatz von 1.5 Milliarden Dollar. Die aus *Vinca rosea* isolierten Vinca-Alkaloide, Vincristin (**2**) und Vinblastin (**3**), werden ebenfalls als Cytostatika eingesetzt.<sup>6</sup> Sie hemmen den Aufbau der Kernspindel und zeigen damit einen anderen Wirkmechanismus als Taxol.<sup>7</sup> Der Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin (**4**) aus dem chinesischen Zierbaum *Camptotheca accuminata* führte zur Entwicklung der klinisch eingesetzten Derivate Topotecan und Irinotecan.<sup>8</sup> Die Topoisomerase-I ist in die Entpackung der verdrehten DNA vor der Replikation und Transkription involviert, eine Hemmung dieses Enzyms führt zum Absterben der Zellen.



*Antitumormittel aus Mikroorganismen*

Mikroorganismen haben einige Schlüsselverbindungen für die Krebstherapie geliefert. Hierzu gehören unter anderem die Bleomycine und die Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin (**5**). Die Bleomycine gehören zu den Glykopeptid-Antibiotika und stammen wie die Anthracycline aus Streptomyceten. Ihre Wirkung beruht auf der Bildung von freien Radikalen, die irreversible DNA-Strangbrüche erzeugen. Die cytotoxische Wirkung der Anthracyclin-Antibiotika ist besonders ausgeprägt in der S-Phase des Zellzyklus. Sie wirken unter anderem über die Interkalation in die DNA, was ein Ende der DNA-Replikation hervorruft. Wie bei den Bleomycinen kommt es auch hier durch Radikalbildung zu DNA-Strangbrüchen.<sup>9</sup>

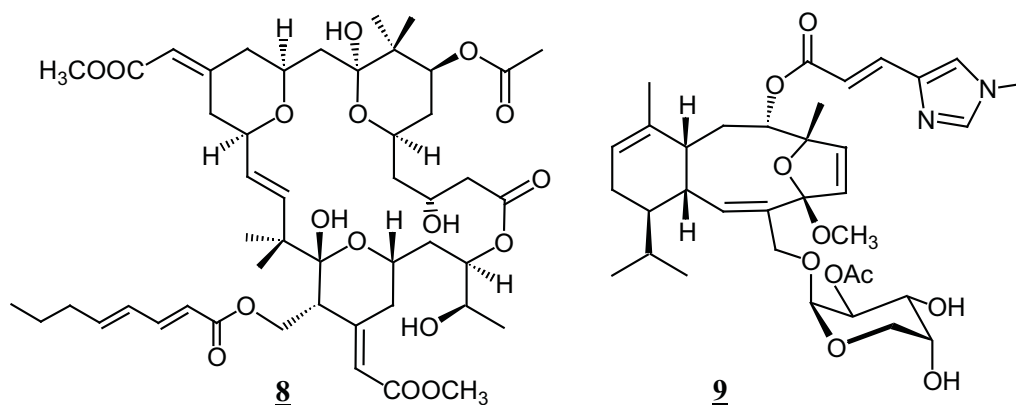
Die aus Myxobakterien isolierten Epothilone (**6**) und (**7**) sind das beste Beispiel einer neuen Klasse von Cytostatika aus Myxobakterien. Sie wurden 1993 erstmals von *Reichenbach* und *Höfle* aus *Sorangium cellulosum* isoliert und 1996 in ihrer Struktur aufgeklärt.<sup>10</sup> Die Wirkungsweise dieser Verbindungen ist ähnlich der Wirkung von Taxol, der Vorteil der Epothilone gegenüber Taxol ist sowohl ihre Wasserlöslichkeit als auch ihre Verfügbarkeit durch Fermentation. Epothilon B und einige Derivate befinden sich in klinischen Studien.<sup>3</sup>

*Cytostatika aus marinen Quellen*

Mitte der 60er Jahre wurden auch marine Organismen als Quelle pharmakologisch aktiver Metaboliten entdeckt. Seitdem sind etwa 10.000 neue Strukturen aus marinen Mikroorganismen, Schwämmen, Seetangen und marinen Invertebraten wie Weichtieren und Seescheiden isoliert worden.<sup>11,12</sup> Von den über 300 in den letzten 30 Jahren als antitumorwirksam patentierten Verbindungen marinen Ursprungs ist bisher keine in die klinische Anwendung gekommen. Zur Zeit befinden sich etwa zehn marine Naturstoffe in klinischen Studien.<sup>13</sup>

Eine vielversprechende Verbindungen unter ihnen ist Bryostatin 1 (**8**), das aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert wurde und sich als wirksam gegen verschiedene Krebsarten erwiesen hat. Der Wirkmechanismus von Bryostatin 1 auf molekularer Ebene ist bisher nicht vollständig verstanden. Es induziert verschiedene zelluläre Antworten, einschließlich der Stimulation des Immunsystems und der Induktion von Apoptose in Tumorzellen. Einige dieser Aktivitäten beruhen auf der Wechselwirkung dieser Substanz mit verschiedenen Proteinkinase C Isoenzymen.<sup>14</sup> Bryostatin 1 befindet sich zur Zeit in fünfzig verschiedenen klinischen Studien, unter anderem zur Behandlung von Melanomen, Leukämie, Brust- und Lungenkarzinom. Bisher konnte in keiner der Studien ein vollständiger Rückgang des Tumorgewebes erzielt werden, jedoch kam es bei einigen Patienten zur Stabilisierung der Krankheit für einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren. Wie bei den meisten anderen marinen Naturstoffen ist die Beschaffung ausreichender Mengen an Bryostatin 1 mit enormen Schwierigkeiten verbunden. So werden aus 1000 kg Moostierchen nur 1.5 g Bryostatin 1 erhalten. Die komplexe Struktur des Naturstoffs verhindert einen ökonomischen totalsynthetischen Zugang zu dieser Verbindung. Zur Zeit werden Struktur-Wirkungsbeziehungen an vereinfachten synthetischen Bryostatin-Analoga durchgeführt.<sup>15</sup>

Die aus Korallen isolierten Sarcodictyine und Eleutherobin (**9**) haben Taxol-ähnliche Eigenschaften. Eleutherobin zeichnet sich in *in vitro*-Tests gegen verschiedene Tumorzelllinien durch eine 50fach stärkere Wirkung als Taxol aus.



## 2. Ansätze für eine selektivere Tumorthherapie

Die Entwicklung und Anwendung der Chemotherapie hat zur Verbesserung der Behandlung von malignen Tumoren beigetragen und eine Vielzahl von nichtlokalisierten Tumoren sowie Metastasen konnten überhaupt erst durch Chemotherapeutika bekämpft werden. Dennoch sind die heute verwendeten Antitumorwirkstoffe nicht oder kaum in der Lage, zwischen normalen und malignen Zellen zu differenzieren. Sie greifen insbesondere stark proliferierendes Gewebe an, welches aber nicht nur in den sich unkontrolliert vermehrenden Tumoren, sondern auch in anderen Funktionseinheiten des Körpers wie z. B. in den Schleimhäuten, den Haarfollikeln und im Knochenmark zu finden ist. Das Resultat sind schwerwiegende Nebenwirkungen wie Störungen des Blutbildes, Haarausfall und schweres Erbrechen, die in einigen Fällen sogar zur Einstellung der Behandlung zwingen. Darüber hinaus kann der unkontrollierte Eingriff der Cytostatika in den Zellzyklus gesunder Zellen zur Schwächung der körpereigenen Abwehr und zu Mutationen führen. Bei längeren Anwendungen kann es außerdem zu Resistenzentwicklungen kommen, bei der Kombination mehrerer Cytostatika auch zu einer "Multidrug-Resistance".

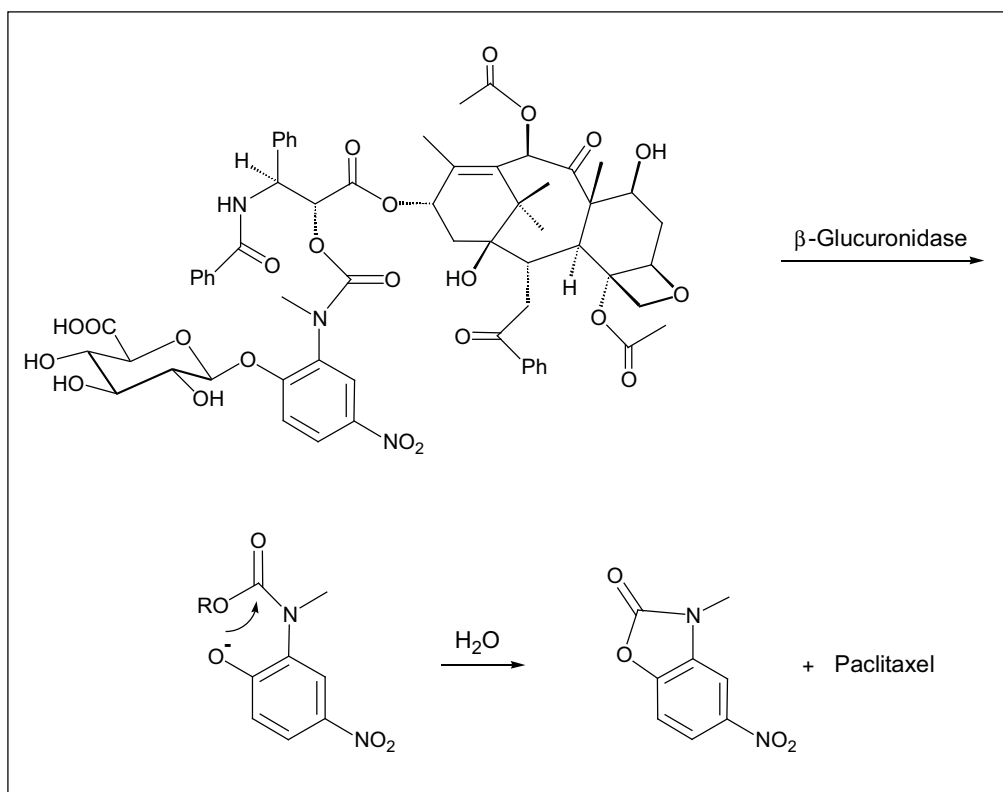
Das zunehmende Verständnis der Pathophysiologie von Krebserkrankungen eröffnet neuartige Ansätze der Antitumorforschung. Ziel muß es sein, Behandlungsmethoden zu finden, die die Tumorzellen direkt erreichen, um das Problem der Toxizität von Antitumormitteln auf normale Gewebezellen zu umgehen.

Eine wichtige Neuentwicklung ist die Erkennung von Krebszellen durch monoklonale Antikörper, die 1975 von *Milstein* und *Köhler* erstmals hergestellt wurden<sup>16</sup> und mittlerweile standardmäßig zugänglich sind. Solche Antikörper können gezielt an Tumorzellen binden, und für die Tumorthherapie ist entscheidend, daß diese Antikörper über kovalente Bindungen mit anderen Molekülen biologischer und chemischer Herkunft verknüpft werden können.

Auf dieser Basis sind in den letzten Jahren verschiedene Ansätze für eine selektive Therapie entwickelt worden.<sup>17</sup> Ein Konzept ist die Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT),<sup>18,3</sup> welche die genotypischen Besonderheiten der Krebszelle ausnutzt. Bei dieser Technik wird der Antikörper mit einem Enzym verbunden, das die chemische Überführung atoxischer Derivate (Prodrugs) in die toxischen Wirkstoffe selektiv am Tumor katalysiert. Weil das Prodrug nur in der Nähe des Tumors durch das Enzymkonjugat aktiviert wird, kann es im ganzen Organismus verteilt sein, ohne Schaden an gesundem Gewebe anzurichten. Da das applizierte Konjugat als



Katalysator fungiert, reichen bei entsprechender Aktivität des Enzyms schon verhältnismäßig kleine Mengen davon am Wirkort aus, um größere Mengen des Toxins freizusetzen. Somit werden auch benachbarte Krebszellen erfaßt, die nicht genug spezifische Antigene präsentieren, um selbst das Konjugat zu binden. Dieser sogenannte "*bystander effect*" ist einer der Hauptvorteile dieses Ansatzes. In Abbildung 1 ist das Paclitaxel-Prodrug dargestellt, welches durch das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase gespalten und damit aktiviert wird.<sup>19</sup> Das Prodrug ist im menschlichem Serum stabil und weist eine deutlich geringere Cytotoxizität auf als das freie Paclitaxel.



**Abbildung 1:** Paclitaxel Prodrug

Weitere derzeit favorisierte Ansatzpunkte für die Entwicklung medikamentöser Tumorbehandlungen sind:<sup>20,21</sup>

- Modifizierung der Signaltransduktion
- Unterdrückung von Hormonwirkungen (antihormonelle Wirkstoffe)
- Zellzyklusmodulation (Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinase)
- Hemmung der Angiogenese
- Hemmung der VEGF Rezeptor Tyrosin Kinase

Jüngere Forschungsergebnisse geben Anlaß zu der Hoffnung, die im Tumorgeschehen außer Kontrolle geratene Zellregulation wiederherstellen zu können und damit eine Heilung in einem umfassenderen Sinn zu erzielen. So sind verschiedene Naturstoffe, unter ihnen das erwähnte Bryostatin 1<sup>14</sup> und die Mistellektine,<sup>22</sup> in der Lage, die Apoptose, der sich Tumorzellen entziehen können, zu induzieren. Obwohl die Mistel seit Jahren einen hohen Stellenwert in der komplementären Krebstherapie einnimmt, war ihr therapeutischer Nutzen lange Zeit umstritten. Inzwischen haben vielfältige Forschungsansätze dazu beigetragen, die wesentlichen Wirkprinzipien der eingesetzten Mistelextrakte zu charakterisieren. Die wichtigsten klinisch belegten Effekte sind das cytotoxische Potential durch Auslösen von Apoptose,<sup>22</sup> immunmodulierende Wirkungen<sup>23</sup> und ein DNA-stabilisierender Effekt.<sup>24</sup> Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt sind, konnte gezeigt werden, daß die Anwendung von Mistelextrakten zur Begrenzung der Nebenwirkungen während der Chemotherapie und damit zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führt. Auch wurden bei Patienten eine verminderte Metastasenrate und eine geringere Rückfallhäufigkeit gefunden.<sup>25</sup>

Verblüffend wenige Untersuchungen liegen bisher zu den Viscotoxinen vor, die neben den Mistellektinen die wichtigste Gruppe cytotoxisch wirksamer Inhaltsstoffe der Mistel darstellen.

## II. Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen an Viscotoxinen (VT), einer Klasse von basischen Mikroproteinen aus der europäischen Mistel *Viscum album* L. Sie besitzen cytotoxische Eigenschaften und sind Bestandteil von Mistelextrakten, die in der Krebstherapie eingesetzt werden.

Ausgangspunkt der Untersuchungen sollte die Ausarbeitung einer zuverlässigen HPLC- und HPLC-MS-Analytik sein, um die verschiedenen Viscotoxin-Isoformen einzeln und im Gemisch eindeutig identifizieren zu können. Hierfür standen Referenzproben aller sechs bisher bekannten Viscotoxine zur Verfügung.<sup>1</sup> Da die Viscotoxine für weitere Untersuchungen nicht in ausreichender Menge und Reinheit verfügbar waren, mußte für die Gewinnung dieser Peptide aus Pflanzenmaterial ein effizientes Isolierungs- und Aufreinigungsverfahren entwickelt werden. Ein solches Verfahren würde es erlauben, die benötigten Mengen an Reinsubstanzen zu gewinnen. Darüber hinaus sollten die Mistelextrakte auf das Auftreten bisher nicht bekannter VT-Isoformen untersucht werden. Dem literaturbekannten Auftreten von Viscotoxin-Phosphatkomplexen sollte nachgegangen werden, insbesondere war geplant, durch Ausschluß von Phosphatpuffern während der Aufreinigung zu klären, ob das Phosphation pflanzlichen Ursprungs ist.

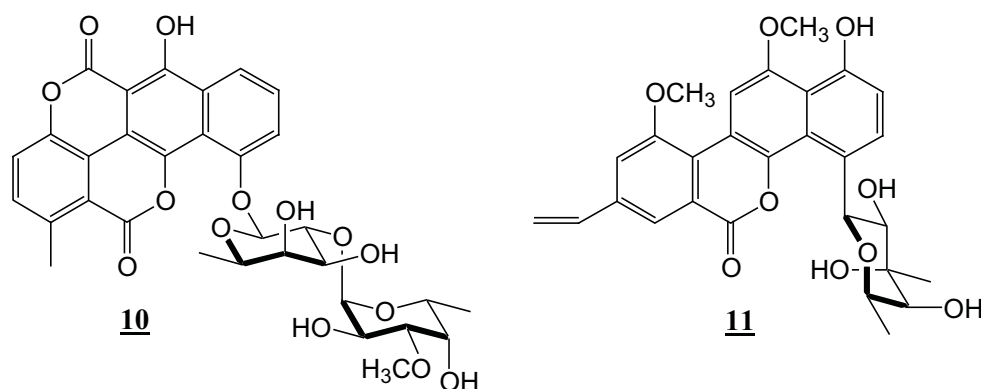
Die cytotoxische Wirkung der Viscotoxine auf molekularer Ebene ist nach wie vor nicht genau verstanden, deshalb sollten strukturbezogene Untersuchungen den Mittelpunkt der Arbeiten an dieser Verbindungsklasse bilden. Da einige der publizierten Aminosäuresequenzen der Viscotoxine mit weniger präzisen Verfahren gewonnen worden waren, schien eine Überprüfung dieser Sequenzvorschläge mit neueren Methoden sinnvoll.<sup>26,27</sup> Darüber hinaus war eine Aufklärung der bisher nicht bekannten Primärstruktur von VT U-PS geplant.<sup>28</sup> Für eine detaillierte Einsicht in die Molekülgeometrie erschien die Kristallisation einzelner Isoformen mit anschließender Röntgenstrukturanalyse attraktiv, da bisher noch keine entsprechenden Untersuchungen an Viscotoxinen durchgeführt worden waren.

---

<sup>1</sup> Die erwähnten Reinsubstanzen und Gemische erhielten wir im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Carl Gustav Carus-Institut in Niefern-Öschelbronn. Herrn Dr. Armin Scheffler und Herrn Sebastian Jäger danke ich für die Überlassung von Viscotoxin-Fraktionen, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und Erfahrungsaustausche.

Mit allen isolierten Viscotoxinen sollten vergleichende Untersuchungen zur Stabilität und zur biologischen Aktivität (Plattendiffusionstests, Einschleusung in Testsysteme) durchgeführt werden.

Den zweiten Teil dieser Arbeit bildet die ausführliche Untersuchung zweier ausgewählter Streptomyceten-Stämme hinsichtlich ihrer Sekundärstoffbildung. Die beiden Stämme Gö 3592/1 und Tü 2471 waren im chemischen Screening<sup>132</sup> durch die Bildung der gelb fluoreszierenden und mit Anisaldehyd-Sprühreagenz intensiv grün anfärbenden Metaboliten der Gilvocarcin-Reihe aufgefallen. Diese Metaboliten besitzen z. T. eine ausgeprägte Hemmwirkung auf Tumorzelllinien. Durch Variation der Kultivierungsbedingungen im Sinne der Ein-Stamm-Viele-Komponenten-Methode (OSMAC-Methode)<sup>135</sup> galt es, ihr Biosynthesepotential auszuschöpfen. Weiterhin war geplant, im Sinne einer Vorläufer-dirigierten Biosynthese, Mischfermentationen mit einem Chartreusin-Produzenten als Fremdstamm durchzuführen. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von Chartreusin (**10**) zu den Metaboliten der Gilvocarcin-Gruppe, wie z. B. Chrysomycin A (**11**), erschien es möglich, durch Akzeptanz der Polyketidsynthese-Produkte des einen Stammes von den post-PKS-Enzymen des jeweils anderen Stammes neue Sekundärstoffe zu erhalten. Die isolierten Metaboliten sollten in ihrer Struktur aufgeklärt und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht werden (Plattendiffusionstests, Bestimmung der Cytotoxizität).



### III. Viscotoxine aus der europäischen Mistel *Viscum album* L.

#### 1. Die Pflanze *Viscum album* L.

##### 1.1. Botanik der Mistel

###### 1.1.1. Systematische Stellung und Verbreitung

*Viscum album* L. gehört nach der systematischen Stellung zur Klasse der Zweikeimblättrigen Bedecktsamer, zur Unterklasse der Rósidae und dort innerhalb der Ordnung der Santaláles zur Familie der Viscáceae.<sup>29</sup> Zu der Ordnung der Santaláles zählen neben Viscáceae unter anderem die Familien Lorantháceae, Santaláceae, Olacáceae sowie Eremolepidáceae. All diesen Familien ist ihr, auf Bäumen wachsend, halbparasitischer Lebensstil gemein.<sup>30</sup>

Die Familie Viscáceae unterteilt sich in sieben Gattungen mit ungefähr 400 Spezies.<sup>31</sup> Die Gattung *Viscum* besteht aus etwa einhundert Arten, wovon der größte Teil in Südafrika (45 Arten), Madagaskar (30 Arten) und Asien (20 Arten) verbreitet ist.<sup>32</sup> In den gemäßigten Zonen Mitteleuropas findet man die beiden *Viscum*-Arten *Viscum album* L. und *Viscum cruciatum* ex. Boiss. Die Verbreitung der weißbeerigen Mistel (*Viscum album* L.) reicht von Nordeuropa bis Nordwestafrika, von Osteuropa über Zentralasien bis hin nach Japan. In Amerika findet man *Viscum album* L. nur in Kalifornien, aus Kultivierungsversuchen stammend.<sup>33</sup>

###### 1.1.2. Lebensweise und Wirtsbäume der Mistel

Die Mistel *Viscum album* L. gehört zu den immergrünen halbparasitischen Blütenpflanzen. Sie ist abhängig von der Wasser- und Mineralstoffversorgung durch den Wirt, kann allerdings selbständig Kohlenhydrate durch Photosynthese produzieren.<sup>34</sup> Von *Sélédzhanu* und *Galan-Fabian* konnte gezeigt werden, daß es zwischen dem Wirt und der Mistel zu keinem signifikanten Transport von organischen Substanzen kommt.<sup>35</sup>

*Tubeuf* beschrieb 1907 erstmals die Wirtsspezifität der weißbeerigen Mistel in Europa. Während demnach *V. album* L. ssp. *album* (= ssp. *platyspermum* Kell.) nur auf Laubbäumen wächst, sieht man *V. album* L. ssp. *abietis* Beck. nur auf der Tanne. Auf Kiefernarten und selten auch auf Fichten und Lärchen findet man *V. album* L. ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollm. (= ssp. *laxum* Fiek).<sup>38</sup> Zu den Laubbäumen, die von

*V. album* L. ssp. *album* bevorzugt werden, gehören u. a. Pappel (*Populus*), Apfelbaum (*Malus*), Esche (*Fraxinus*), Ahorn (*Acer*) und Birke (*Betula*). Dagegen ist die Mistel äußerst selten auf Eichen (*Quercus*) und Ulmen (*Ulmus*) vertreten. Einige Bäume, wie beispielsweise die Buche oder der Buchsbaum, sind resistent gegenüber Mistelansiedlungen.<sup>30</sup> Der einzige bisher entdeckte natürliche Sammelwirt ist der Ginster (*Genista cinerea*), der sowohl *V. album* ssp. *album* als auch *V. album* ssp. *austriacum* tragen kann.<sup>36</sup>

### 1.1.3. Entwicklung und Wachstum

Zu ihrer Vermehrung ist die Mistel auf die Vogelwelt angewiesen, die die Mistelbeeren, welche im Winter reifen, auf zwei Wegen verteilt. Einige Arten, unter ihnen die Misteldrossel, nehmen die gesamte Beere als Nahrung auf und scheiden die Samen mit dem Kot wieder auf einem Ast aus. Andere Arten, wie z. B. die Mönchsgrasmücke, essen nur das Fruchtfleisch der Beere und lassen den Samen zurück. Auf dem Baum bleiben die klebrigen Samen haften und nach Keimung und Ausbildung der Haftscheibe erfolgt die Ausbildung des wurzelartigen Senkers, der bis zum Xylem des Wirtes vordringt. Über diesen erhält die Mistel Zugang zu Wasser und Nährstoffen des Wirtes. Die Keimung erfolgt wie bei allen anderen Pflanzen in den ersten Monaten des Jahres. Im darauffolgenden Frühjahr, ein Jahr nach der Keimung, wachsen dann die ersten zwei kleinen Blättchen aus der Spitze des Keims. Danach folgt wiederum eine einjährige Ruhepause, bevor es zu neuem Blattwuchs kommt. Von dem unverzweigten, mittelachsenbetonten Wachstum tritt die Mistel ab dem vierten bis fünften Lebensjahr in eine zweite Wachstumsphase ein, in der sie sich gabelförmig verzweigt und blüht. Sie gewinnt erst im Laufe vieler Jahre ihre kugelförmige Gestalt.<sup>37</sup> Mistelpflanzen sind zweihäusig, d. h. männliche und weibliche Blüten wachsen getrennt voneinander auf zwei Pflanzen. Die Blütenstände werden im Oktober ausgebildet und blühen zwischen Januar und März. Im Winter des folgenden Jahres gelangt die Frucht dann zur vollen Reife und kann bis in den Frühling hinein am Busch verbleiben. Der Mistelbusch benötigt also von der ersten Blüteninduktion bis zur reifen Frucht ca. 17 Monate, er verhält sich somit im Entwicklungsablauf jahreszeitlich entgegengesetzt zu allen anderen höheren Pflanzen.

#### 1.1.4. Die Sonderstellung der Mistel

Die erste umfangreiche Darstellung von Wachstum und Biologie der Mistel verfaßte Anfang des 20. Jahrhunderts der Botaniker Karl von Tubeuf.<sup>38</sup> Von ihm stammt der vielzitierte Satz: "Nichts an dieser Pflanze ist normal".

Botanisch gesehen unterscheidet sich die Mistel als DNA-reichste Blütenpflanze<sup>39</sup> in vielen Merkmalen von der sonstigen Pflanzenwelt (siehe auch vorheriges Kapitel). Als erstes sei die besondere Beziehung zur Erde genannt, zu der die Mistel keinen direkten Kontakt hat.<sup>40</sup> Im Gegensatz zu anderen höheren Pflanzen zeigt die Mistel negativen Geotropismus und negativen Heliotropismus, d. h. sie orientiert sich während des Wachstums weder in Richtung der Schwerkraft noch neigt sie sich der Sonne zu. Vielmehr bildet die Pflanze einen kugelförmigen Busch, der sich unabhängig von Lichteinfall und Schwerkraft durch dichotome Teilung ausbreitet. Das der Wurzel entsprechende Organ ist bei der Mistel der Senker. Er breitet sich nicht im Baum aus wie Wurzeln in der Erde, sondern wächst mit dem Baum nach außen, in die Peripherie, unabhängig von seiner räumlichen Lage.

Eine weitere Eigenart weisen die Blätter der Mistel auf. Anders als normale Laubblätter besitzen Mistelblätter keine ausgeprägte Ober- bzw. Unterseite. Die Spaltöffnungen zur Kohlendioxid- und Wasseraufnahme sind vielmehr über beide Seiten des Blatts verteilt. Unter höheren Blütenpflanzen mit sekundärem Dickenwachstum zeichnet sich die weißbeerige Mistel durch eine auffallend retardierte Morphologie aus. Ihre Blätter ähneln eher den einfachen Blattstrukturen normaler Pflanzen im Keimstadium. Sie bleiben immer grün, bis sie in ihrem zweiten Lebensjahr abfallen, ohne vorher zu welken. Die Blüten sind eher unscheinbar.

Auch zum Licht hat *Viscum album* L. eine besondere Beziehung. Der grüne Samen ist für sein Überleben auf das Licht angewiesen, das durch die transparente Fruchthülle hindurch scheint. Während andere Pflanzen im Dunkeln in der Erde keimen, braucht die Mistel zum Keimen Licht.<sup>40</sup>

#### 1.2. Eine heilkräftige Pflanze mit langer Tradition

Um die Mistel ranken sich vielerlei Mythen. Die Bedeutung der Mistel in früheren Zeiten wird auch in ihren vielfältigen volkstümlichen Bezeichnungen widerspiegelt. Hier seien nur einige genannt: Drudenfuß, Hexenbesen, Bocksfutter, Elfklatte, Geißkrut etc.<sup>41</sup> Der Glaube an ihre Zauberkraft reicht bis in die Antike zurück. Schon um 300 v. Chr. wurde die Mistel als immergrüne auf Bäumen wachsende Pflanze von

Theophrastos beschrieben.<sup>42</sup> Sie wird von zahlreichen Autoren des Altertums und des Mittelalters als Heilpflanze aufgeführt, so von der hippokratischen Schule, von Plinius, Hildegard von Bingen, Tabernaemontanus u. a.. Vor allem die Epilepsie wurde mit Mistelpräparaten behandelt, außerdem Milzsucht, Brustenge sowie Fertilitäts- und Geburtsstörungen unterschiedlicher Genesen (siehe Tabelle 1). In der Volksmedizin, z. B. bei den Kelten, aber auch regional im Deutschland des 19. Jahrhunderts, wurde die Mistel vielfach als Allheilmittel betrachtet. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts sank die Bedeutung der Mistel stark ab, jedoch stieg Anfang des 20. Jahrhunderts das klinisch-pharmakologische Ansehen aufgrund ihrer blutdrucksenkenden Wirkung erneut. Ebenfalls wurde die Pflanze in dieser Zeit bei degenerativen Gelenkerkrankungen verabreicht.<sup>43</sup>

Die parenterale Gabe von Mistelextrakten zur Krebsbehandlung geht auf den Anthroposophen Rudolf Steiner zurück. Er empfahl 1920 aufgrund der oben dargestellten biologischen Sonderstellung der Mistel den Einsatz als Krebstherapeutikum. Zu diesem Schluß kam Steiner aufgrund der vergleichenden Betrachtung von Mistelwachstum und Tumorentwicklung.<sup>44</sup>

Heute gibt es zahlreiche Mistelpräparate von unterschiedlichen Herstellerfirmen,<sup>45</sup> die sich hinsichtlich des Herstellungsprozesses und der Verwendung verschiedener Mistelarten unterscheiden. Ein Blick in die Literatur zeigt, daß die Mistel derzeit ein weites und interessantes, zum Teil aber auch umstrittenes Forschungsfeld aufweist. Vielfältige Forschungsansätze haben inzwischen dazu beigetragen, wesentliche Wirkprinzipien der Mistelextrakte zu charakterisieren, dazu gehören insbesondere die Immunmodulation und die Cytotoxizität.

**Tabelle 1:** Geschichte der Mistel als Heilpflanze.<sup>42</sup>

5. Jahrhundert v. Chr.	Nierenerkrankungen, Prämenstruelles Syndrom
1. Jahrhundert n. Chr.	Allheilmittel, Gegengift, Unfruchtbarkeit
12. Jahrhundert n. Chr.	Epilepsie, Nieren- und Milzerkrankungen, Unfruchtbarkeit bei Frauen, Ulcus
16. Jahrhundert n. Chr.	Epilepsie, Leber- und Milzerkrankungen
18. Jahrhundert n. Chr.	Epilepsie, Herzschwäche, Ödeme, Lungen- und Lebererkrankungen
19. Jahrhundert n. Chr.	Volksmedizin, Allheilmittel
20. Jahrhundert n. Chr.	Bluthochdruck, Arthrose und Krebserkrankungen



### 1.3. Viscotoxine und andere Inhaltsstoffe der Mistel

Der Gesamtextrakt aus Mistelpflanzen – aus Stengeln, Blättern und Beeren – enthält ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen.<sup>46</sup> Die Zusammensetzung und der Gehalt der einzelnen Inhaltsstoffe variieren innerhalb der drei Subspezies und innerhalb der verschiedenen Laubholzmisteln. Daneben spielt auch das Geschlecht der Mistelpflanze und der Erntezeitpunkt eine Rolle, da der Gehalt einzelner Verbindungen im Jahresverlauf schwankt. Nicht alle Bestandteile sind gleichmäßig in der Pflanze verteilt, manche reichern sich im Stengel an, andere in den Blättern.<sup>47</sup> Diese Erkenntnisse sind für die pharmakologische Anwendung der Mistelextrakte von verschiedenen Wirtsbäumen von großer Bedeutung, da auch die Zusammensetzung der pharmakologisch bedeutsamen Wirkstoffe, der Mistellektine (ML) und Viscotoxine (VT), abhängig von den oben genannten Parametern variiert.<sup>48,28</sup>

Die wichtigsten Komponenten und ihre bisher bekannten Wirkungen werden im Folgenden näher beschrieben.

#### 1.3.1. Viscotoxine

Die Viscotoxine gehören zu den pharmakologisch wichtigen Inhaltsstoffen der Mistel. Erste Experimente zur Anreicherung dieser Peptide wurden 1942 von *Winterfeld*<sup>49</sup> beschrieben, der Begriff "Viscotoxin" wurde allerdings erst im Jahre 1948 von *Winterfeld* und *Bijl*<sup>50</sup> geprägt. Nach mehreren Strukturvorschlägen definierten sie diesen Mistelwirkstoff als ein "Protein, ausschließlich aus Aminosäuren bestehend". Die letale Dosis LD<sub>100</sub> dieser isolierten Substanz betrug 0.8 mg je kg Kaninchen. Die Viscotoxine erwiesen sich in späteren Untersuchungen als eine Klasse basischer, amphiphiler und cysteinreicher Mikroproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 5 kDa. Sie bestehen jeweils aus 46 Aminosäuren und zeigen hinsichtlich der internen Disulfidbrücken und der Primärstruktur Verwandtschaft zur Familie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thionine, einer Gruppe pflanzlicher, hochbasischer Polypeptide mit 3 oder 4 Disulfidbrücken.<sup>51</sup> Thionine spielen wegen ihren vielfältigen biologischen Aktivitäten eine wichtige Rolle bei den Abwehrmechanismen der Pflanze.<sup>52,53</sup> Eine strukturelle Ähnlichkeit haben die Viscotoxine auch zu einigen Schlangengiften, vor allem zu dem Gift der Kobra.<sup>54</sup>

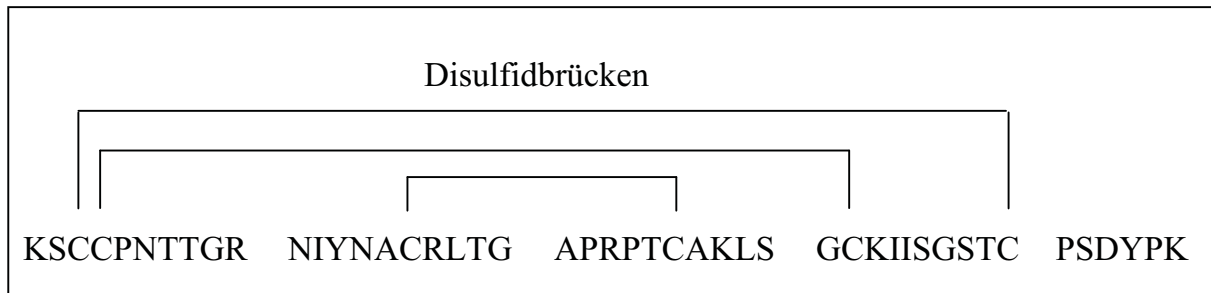
Bislang sind sechs Isoformen der Viscotoxine beschrieben worden, nämlich Viscotoxin A1 (**12**),<sup>28,55</sup> A2 (**13**),<sup>26,55</sup> A3 (**14**),<sup>27</sup> B (**15**),<sup>56</sup> 1-PS (**16**)<sup>57</sup> und U-PS (**17**).<sup>28</sup> Mit Ausnahme der Isoform U-PS wurden Primärstrukturanalysen aller Viscotoxine

publiziert, dargestellt in Abbildung 2. In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheinen jedoch Zweifel an der Richtigkeit dieser Aminosäuresequenzen angebracht (siehe Kapitel A.III.3.1.3).

<b>Viscotoxin A3</b>				(MW 4829.55 Da)
KSCCPNTTGR	NIYNACRLTG	APRPTCAKLS	GCKIISGSTC	PSDYPK
<b>Viscotoxin A2</b>				(MW 4827.45 Da)
KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSRQVCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK
<b>Viscotoxin A1</b>				(MW 4883.55 Da)
KSCCPSTTGR	NIYNTCRLTG	SSRETCAKLS	GCKIISASTC	PSNYPK
<b>Viscotoxin B</b>				(MW 4851.47 Da)
KSCCPNTTGR	NIYNTCRLGG	GSRERCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK
<b>Viscotoxin 1-PS</b>				(MW 4897.54 Da)
KSCCPNTTGR	NIYNTCRFGG	GSREVCARIS	GCKIISASTC	PSDYPK

**Abbildung 2:** Aminosäuresequenzen und die daraus berechneten Molmassen der Viscotoxine.

Die Primärstrukturen der Viscotoxine lassen eine große Ähnlichkeit untereinander erkennen. Sie enthalten eine große Anzahl konservierter Bereiche, an 32 der insgesamt 46 Positionen finden sich gleiche Aminosäuren. Differenzen zeigen vor allem Positionen im zentralen Bereich der Sequenz. N- und C-terminal befindet sich in allen Fällen Lysin. Der hohe isoelektrische Punkt von pH 9-11 ist auf den Gehalt an Lysin und Arginin zurückzuführen. Wie in Abbildung 3 exemplarisch an Viscotoxin A3 gezeigt ist, liegen die drei Disulfidbrücken in allen Isoformen zwischen Cys<sup>3</sup>/Cys<sup>40</sup>, Cys<sup>4</sup>/Cys<sup>32</sup> und Cys<sup>16</sup>/Cys<sup>26</sup>. Sie bilden ein peliculares strukturelles Motif ("concentric motif"),<sup>55</sup> welches für die Stabilität der Struktur mitverantwortlich ist. Viscotoxine zeichnen sich durch hohe Hitzestabilität aus und sind weitgehend resistent gegen Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin.<sup>58,59</sup> Auch konnte an anderen Peptiden mit demselben Motif, wie z. B. an Thioninen und Saponinen, die Fähigkeit zur Interaktion mit der Zellmembran beobachtet werden.<sup>60</sup>



**Abbildung 3:** Primärstruktur und Stellung der Disulfidbrücken von Viscotoxin A3.

Biosynthetisch entstehen die Viscotoxine durch Abspaltung aus hochmolekularen ribosomalen Vorläufern. Diese bestehen aus einer Signal-Sequenz, der Viscotoxindomäne und einer säurebildenden Domäne. Letztere spielt eine wichtige Rolle bei der Unterbindung der toxischen Effekte der Viscotoxine in der pflanzlichen Zelle.<sup>61</sup>

Der Gehalt dieser Mikroproteine innerhalb der Mistel beläuft sich auf 0.1 – 1.0 %.<sup>62</sup> Viscotoxine kommen vor allem in der Peripherie der Pflanze vor, in den Speichervakuolen junger Blätter, Stengel und Beeren. Geringe Mengen findet man ebenfalls im Cytoplasma der Samen. Im Sommer ist der Viscotoxin-Gehalt in der Pflanze am höchsten, ab September beginnt er abzunehmen und ist in den Wintermonaten relativ niedrig.<sup>63</sup> Die Viscotoxine sind bisher ausschließlich in der Mistel nachgewiesen worden, im Gegensatz zu deren anderen Inhaltsstoffen.<sup>64</sup>

Wie bereits in Kapitel A.III.1.1.2 erwähnt wurde, ist das Viscotoxinmuster auch von dem jeweiligen Wirtsbaum abhängig, auf dem der Halbschmarotzer wächst. Während in Laubbaummisteln vor allem VT A2 und VT A3 neben kleineren Mengen VT A1 und VT B vorkommen, sind VT 1-PS und VT U-PS in Misteln dieser Herkunft nicht nachzuweisen. Im Gegensatz dazu enthält die Kiefernmistel überwiegend VT 1-PS und VT U-PS (>70 %), VT A1 tritt dagegen nicht auf, und der Gehalt an VT A2, VT A3 und VT B ist sehr gering. In der Tannenmistel kommen alle Viscotoxine vor, VT A3 zu über 70 %, VT A2 macht den geringsten Anteil aus.<sup>65</sup> Die prozentuale Zusammensetzung der Viscotoxine von Misteln auf verschiedenen Laubbäumen unterscheidet sich nicht, nur der Gesamtgehalt variiert stark. Apfelbaummisteln sind mit 3.2 mg Gesamtviscotoxine pro g Frischgewicht die viscotoxinärmsten, während die Pappel mit 5.8 mg/g Frischgewicht zu den viscotoxinreichsten unter den Laubbaummisteln gehört. Die Viscotoxinmenge in der Tannenmistel entspricht ungefähr der in der Laubbaummistel, in der Kiefernmistel ist sie hingegen auffällig

gering, ca. 1.4 mg/g.<sup>48</sup> Zur biologischen Aktivität dieser Verbindungen siehe Kapitel A.III.4.

### 1.3.2. Mistellektine

Lange glaubte man, daß die Viscotoxine die einzigen toxischen Bestandteile der Mistel seien. Jedoch tragen auch andere Proteine, wie die erst später entdeckten Mistellektine, zur Toxizität dieser Pflanze bei. Die ersten Hinweise auf das Vorkommen von Lektinen in der Mistel wurden 1956 gefunden, aufgrund Agglutination menschlicher Erythrozyten nach Kontakt mit wäßrigen Mistelextrakten.<sup>66</sup> Seit dieser Entdeckung haben zahlreiche Arbeitsgruppen ihre Forschung diesen Inhaltsstoffen gewidmet, was sich in der großen Zahl an Publikationen zur Isolierung, chemischen Struktur und biologischen Wirkung widerspiegelt.<sup>67,68</sup>

Lektine (lat.: legere = sammeln) sind Glykoproteine, welche eine spezifische Bindungsstelle für Zucker aufweisen.<sup>69</sup> Sie kommen nicht nur in der Mistel, sondern auch in Viren, Bakterien, Pilzen, Tieren und im Menschen vor. Das erste Lektin überhaupt wurde 1888 von *Stillmark* beschrieben. Es handelte sich dabei um das hochtoxische Ricin aus der Ricinusstaude, welches mit den Mistellektinen sowohl strukturell als auch in seiner biologischen Wirkung eng verwandt ist.<sup>70</sup>

*Viscum album* L. enthält drei Gruppen von N-glykosylierten Isolektinen, die Mistellektine ML-I, ML-II und ML-III. Die Mistellektine gehören zu den toxischen Glykoproteinen mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 11 %. Sie binden an Glykokonjugate, die D-Galactosyl- oder N-Acetyl-D-Galactosaminy-Reste enthalten (siehe Tabelle 2). Von den drei identifizierten Lektinen ist ML-I das häufigste und das am stärksten cytotoxische. Es besteht wie die beiden anderen Lektine aus zwei Untereinheiten, einer A-Kette und einer B-Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Für beide Untereinheiten wurden Primärsequenzen publiziert, und für die A-Kette sind verschiedene Isoformen beschrieben worden.<sup>71,72</sup> Im Gegensatz zu ML-II und ML-III liegt ML-I in höheren Konzentrationen als Dimer vor, wobei die Monomere durch hydrophobe Wechselwirkungen der B-Ketten miteinander verbunden sind.<sup>73</sup>

**Tabelle 2:** Ausgewählte Eigenschaften der Mistellektine.<sup>43,46</sup>

Lektin	Molmasse [Da]	Kohlenhydrat-spezifität	Anzahl der Ketten	Molmasse der Ketten A/B [Da]
ML-I	115 000	D-Galactose	4	29 000 / 34 000
ML-II	60 000	D-Galactose/ N-Acetyl-D-Galactosamin	2	27 000 / 32 000
ML-III	60 000	N-Acetyl-D-Galactosamin	2	25 000 / 30 000

Die B-Kette der Mistellektine fungiert als Haptomer, sie besitzt mehrere Zuckerbindungsstellen mit Spezifität für D-Galactose oder N-Acetyl-D-Glucosamin. Durch Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten wirkt die B-Kette von ML-I stimulierend auf das Immunsystem.<sup>74,75</sup> Die A-Kette wirkt als Effektor und ist die cytotoxische Komponente im Lektinmolekül. Ihre Wirkung beruht einerseits auf der Stimulation der Lymphozyten zur Zytokinfreisetzung und andererseits auf der Hemmung der Proteinbiosynthese auf ribosomaler Ebene, was zur Apoptose führt.<sup>76,77</sup> Bewirkt wird diese Hemmung durch die RNA-N-Glykosidase-Aktivität der A-Kette, die Adenin aus der 28S-rRNA der eukaryontischen Ribosomen freisetzt.<sup>78</sup> Beide Ketten sind nur in Kombination cytotoxisch, da die B-Kette an Glykokonjugate mit terminalen D-Galactosyl-Resten auf der Targetzelle bindet und hierdurch die endozytotische Aufnahme der A-Kette in die Zelle ermöglicht.

*In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen bestätigen, daß die Mistellektine eine wesentliche Rolle für die biologische Aktivität der Mistelextrakte spielen.<sup>79</sup> ML-I ist für verschiedene immunmodulatorische Eigenschaften der Mistelextrakte verantwortlich. Nicht-toxische Dosen von ML-I (1 ng/kg Körpergewicht) verursachen einen signifikanten Anstieg der Zahl natürlicher Killer- und T-Helfer-Zellen.<sup>80,81</sup> Darüber hinaus verstärkt die Gabe von ML-I die phagozytotische Aktivität von Granulozyten und Monozyten sowie die Expression von Interleukin (IL)-2-Rezeptoren auf T-Lymphozyten. Ein hierdurch signalisierter Anstieg der Aktivität nicht-spezifischer Abwehrmechanismen könnte eine klinisch vorteilhafte Bedeutung für die Krebstherapie haben.<sup>74,82</sup> Neben seiner immunmodulatorischen Wirkung verursacht ML-I auch einen Anstieg der  $\beta$ -Endorphinkonzentration im Plasma.<sup>83</sup> In verschiedenen Tumorzelllinien wirkt das Gesamtmolekül ML-I durch Apoptoseinduktion stark

cytotoxisch.<sup>78,84</sup> In Leukämie-L1210-Zellen beträgt die ED<sub>50</sub> 3.2 ng/mL. Ähnliche Resultate findet man auch in anderen Tumorzelllinien. Bei Hepatomzellen der Ratte (HTC) ist allerdings eine einhundertmal stärkere Konzentration nötig, um den gleichen Effekt zu erzielen.<sup>70</sup> Eine Zusammenfassung der biologischen Eigenschaften von Mistellektin I zeigt Tabelle 3.

**Tabelle 3:** Biologische Eigenschaften von Mistellektin I sowie von dessen A- und B-Kette.<sup>46</sup>

Biologische Aktivität	ML-I	A-Kette	B-Kette
Agglutination von Zellen	+	-	+
Hemmung der Proteinbiosynthese			
1. auf zellulärer Ebene	+	-	-
2. auf ribosomaler Ebene			
Zellfreies System	+	+	-
Zellsystem	+	+	-
Aktivierung von Makrophagen	+	-	+
Steigerung der Phagozytoseaktivität von Leukozyten	-	-	+
Mitogener Effekt	-	+	-
Hemmung der Allergen-induzierten			
Histaminfreisetzung	+	-	+
Lymphokinfreisetzung	nb	(+)	+
Potentieller Bestandteil von Immuntoxinen	nb	+	-
Cytotoxizität	+	(+)	-

nb = nicht bestimmt

Inzwischen wurde durch Klonierung des Mistellektin-Gens von *Viscum album* ein rekombinantes Mistellektin (rML) hergestellt. Dieses trägt jedoch keine Kohlenhydratbausteine mehr, die bei den natürlichen Mistellektinen die Wirkung modulieren.<sup>85,86</sup>

Im Unterschied zu den Viscotoxinen sind die Mistellektine überwiegend in den Zellvakuolen der Kurztriebe und im Senker der Pflanze angereichert. Den höchsten ML-Gehalt weist die Mistel von November bis Januar auf. Wie bei den Viscotoxinen hängt auch bei den Mistellektinen das Auftreten und die Konzentration einzelner Isoformen stark von der Subspezies und der Art des Wirtsbaums ab. Kiefernmisteln enthalten ausschließlich ML-III und haben insgesamt den geringsten Lektin-Gehalt. Zu

den lektinreichsten unter den Laubbaummisteln gehören die Pappel- und Lindenmisteln mit 400-800 µg/g Frischgewicht, wobei hier das ML-I überwiegt.<sup>62</sup>

### 1.3.3. Weitere Inhaltsstoffe

Neben den Viscotoxinen und Mistellektinen gibt es noch eine Reihe weiterer Inhaltsstoffe (siehe Tabelle 4), welche verschiedene toxische und immunstimulierende Wirkungen entfalten können. Ungewöhnliche Anreicherungen zeigt die Mistel bei Proteinen, Thiolen, Arginin, Kalium und Phosphat. Sie enthält mehr als 600 verschiedene Proteine bzw. Peptide<sup>47</sup> und einen erheblichen Anteil an freien Aminosäuren. Hier sei auf das auffallend hohe Vorkommen von Arginin (ca. 38 % aller Aminosäuren) hingewiesen, was sich auch in der Primärstruktur der Viscotoxine widerspiegelt (siehe Abbildung 2). Es scheint eine Besonderheit der Mistel zu sein, Arginin als Stickstoffspeicher zu verwenden.<sup>87</sup> Ebenfalls bemerkenswert ist der hohe Thiolgehalt, zu 90 % in Form von Glutathion.<sup>88</sup>

**Tabelle 4:** Inhaltsstoffgruppen der Mistel.<sup>46,62</sup>

Stoffklasse	charakteristische Beispiele	Anzahl Bemerkungen	Menge [% TS]
DNA		DNA-reichste Blütenpflanze	-
Proteine		> 600	10-25
- Glykoproteine	Lektine	> 20, 4 Gruppen	0.003-0.6
- Enzyme	Sorbitoldehydrogenase	> 100	-
- Thionine	Viscotoxine	> 6	0.1-1.0
freie Aminosäuren	L-Arginin, L-Cystein	> 15	0.05-12
Thiole	Glutathion	> 3	0.5-11
Amine	Cholin, Tyramin	> 6	-
Polysaccharide	Arabinogalaktane	> 6	10-35
lösliche Zucker	Saccharose	> 5	0.5-5
Cyclitole	Mannitol, Pinitol	> 5	0.5-5
Lipide	Triacylglyceride	> 10	20-50
Phytosterole	β-Sitosterol, Stigmasterol	> 4	-
Triterpene	Oleanolsäure, Betulinsäure	5	-
Flavonoide	Quercetinderivate, Rhamnazin	> 20	-
Phenylpropanoide	Kaffeesäure, Sinapinsäure	> 15	-

In der Mistel lassen sich verschiedene Flavonoide nachweisen, z. B. Quercetin und seine Derivate.<sup>41</sup> Quercetin weist eine anti-proliferative Wirkung auf. In kultivierten Leukämie- und Tumorzellen sowie in Lymphozyten induziert es Apoptose.<sup>89</sup> Für die Cytotoxizität der Mistelextrakte haben die Flavonoide nur eine geringe Bedeutung, da ihre Wirkung durch die des ML-I überlagert wird. Weitere pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe sind die Phenylpropanoide, Lignane und die Amine, welche kardiovaskuläre Effekte aufweisen.<sup>90,91</sup> Die immunmodulierende Wirkung von Mistelextrakten beruht nicht nur auf ihren cytotoxischen Komponenten (ML und VT), sondern auch auf verschiedenen Oligo- und Polysacchariden. Diese bewirken ebenfalls die Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen<sup>46</sup> und zeigen zudem eine synergistische Wechselwirkung mit anderen Mistel-Inhaltsstoffen, u. a. den Mistellektinen.<sup>92,93</sup>

## 2. HPLC-Analytik von Viscotoxinen

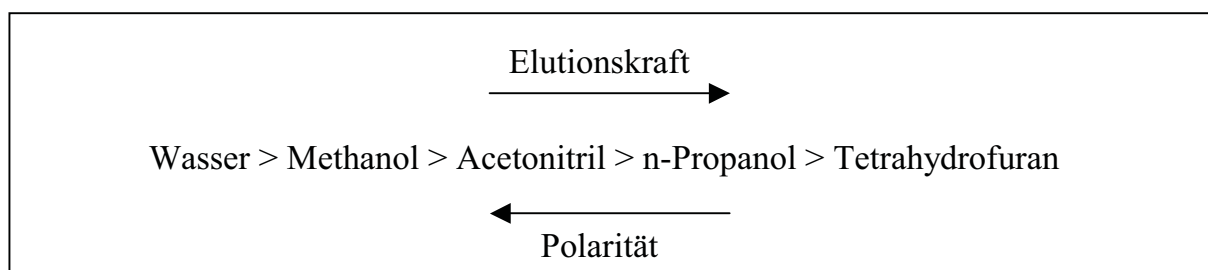
### 2.1. Optimierung der HPLC-Analytik mit Referenzsubstanzen

Zur Analyse von Mistelextrakten und um die benötigten Mengen einzelner Isoformen der Viscotoxine für spätere Untersuchungen isolieren zu können, sollte eine zuverlässige HPLC-Analytik für diese Substanzklasse eingerichtet und optimiert werden. Dies war notwendig, um Viscotoxine einzeln und im Gemisch eindeutig identifizieren zu können. Ausgangspunkt bildete eine Reihe reiner Referenzviscotoxine (VT A1, VT A2, VT A3, VT B, VT 1-PS und VT U-PS) sowie mehrere Viscotoxin-Gemische unterschiedlicher Herkunft und eine bisher nicht literaturbekannte Verbindung **18** mit Viscotoxin-artigen Eigenschaften.<sup>1</sup>

Da es sich bei den Viscotoxinen um Peptide handelt, ist die Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) für analytische und präparative Trennungen dieser Verbindungen die Methode der Wahl.<sup>94</sup> Bei der RPC findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wäßrigen Lösungsmittel statt. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines polaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Molekül um Bindungsstellen an der stationären Phase konkurriert. Es wurden verschiedene stationäre RPC-Phasen mit Alkylketten unterschiedlicher Länge (C<sub>8</sub> und C<sub>18</sub>) getestet. Mit der Länge dieser Kohlenwasserstoffketten steigt der hydrophobe Charakter der stationären Phase solcher Säulen. Typisch für Peptidtrennungen ist die Verwendung von C<sub>18</sub>-Säulen,



allerdings konnten bei der Auftrennung der Viscotoxine mit C<sub>8</sub>-Säulen in Rahmen dieser Arbeit bessere Ergebnisse erzielt werden.<sup>95</sup> Als organisches Lösungsmittel wurde Acetonitril gewählt, das im Unterschied zu Methanol bis zu 200 nm UV-durchlässig ist und damit den Nachweis von Peptidbindungen mit einem Absorptionsmaximum von 195 nm erlaubt. Ein Nachweis auf der Basis der aromatischen Tyr/Trp-Seitenketten bei 280 nm ist dagegen sehr unempfindlich. In Abbildung 4 ist die Elutionskraft und die Polarität von Acetonitril im Vergleich zu anderen gängigen Lösungsmitteln dargestellt.



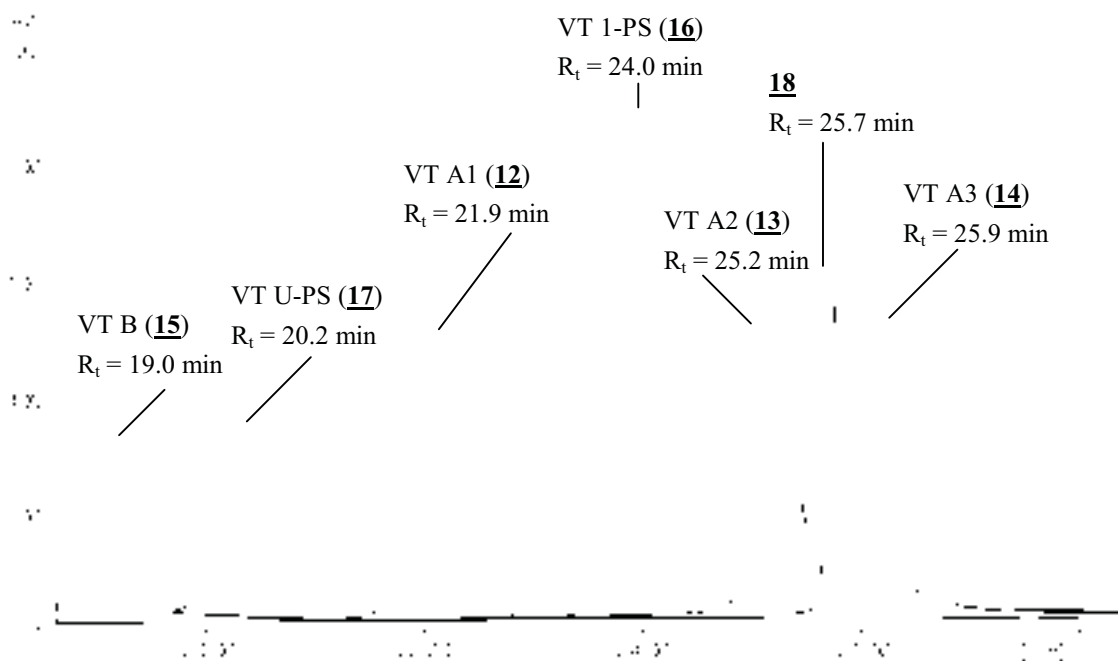
**Abbildung 4:** Elutionskraft und Polarität von Acetonitril im Vergleich zu weiteren HPLC-Lösungsmitteln.

Eine Möglichkeit, die Trennleistung in der RPC zu verbessern, ist der Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien. Diese binden als Gegenionen an die geladenen Seitenketten der zu trennenden Peptide und nehmen damit Einfluß auf deren hydrophoben Charakter. Auf diese Weise werden Retention und Trennleistung verbessert. Trifluoressigsäure (TFA) ist als Ionenpaar-Reagenz vorteilhaft, da es bis 205 nm UV-durchlässig und zudem leicht flüchtig ist.<sup>94</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde daher allen HPLC-Lösungsmitteln TFA in einer Konzentration von 0.1% zugesetzt.

Von allen getesteten Säulen lieferte die *Bischoff* Prontosil-Säule die beste Trennleistung. So konnte mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten (0.1 % TFA enthaltend, pH 2.2) eine gute Trennung mit einer hohen Auflösung erreicht werden. Diese Säule wurde daraufhin als Standardsäule für alle weiteren analytischen Trennungen verwendet. Ebenso fand die Säule Anwendung bei den in Kapitel A.III.7 beschriebenen LC/MS-Experimenten.

## 2.2. Reproduktion der Referenzsubstanzen mittels HPLC und Massenspektrometrie

Unter Verwendung der Standardsäule wurden die oben aufgeführten Referenzviscotoxine vermessen und mit diesen Daten ein Viscotoxin-Standard-Chromatogramm (siehe Abbildung 5) mit den folgenden Retentionszeiten erstellt: VT A3 (**14**) (25.9 min), VT A2 (**13**) (25.2 min), VT 1-PS (**16**) (24.0 min), VT A1 (**12**) (21.9 min), VT U-PS (**17**) (20.2 min), VT B (**15**) (19.0 min). Als externe Referenz diente bei jeder Messung VT A3 (**14**). Die Probe **18** wird weiter unten erwähnt.



**Abbildung 5:** Viscotoxin-Standardchromatogramm. Die Viscotoxine wurden in der Konzentration 1 mg/mL in bidestilliertem Wasser gelöst.

Um die Referenzviscotoxine eindeutig zu identifizieren, wurden alle Substanzen einer massenspektrometrischen Analyse an einem Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS) unterzogen. Es wurde für jedes Mikroprotein im positiven Ionenstrom die zu erwartende Masse gefunden, mit Ausnahme von VT U-PS (**17**). Dieses Peptid wird in der Literatur zwar erwähnt,<sup>28</sup> allerdings ist bis heute weder eine Primärsequenz veröffentlicht worden noch ist die Molmasse bekannt. Eigene Messungen an diesem Peptid ergaben durch Auswertung der mehrfach geladenen Ionen eine Masse von 4759 Da, wie in Abbildung 6 dargestellt ist. Zur Bestätigung der

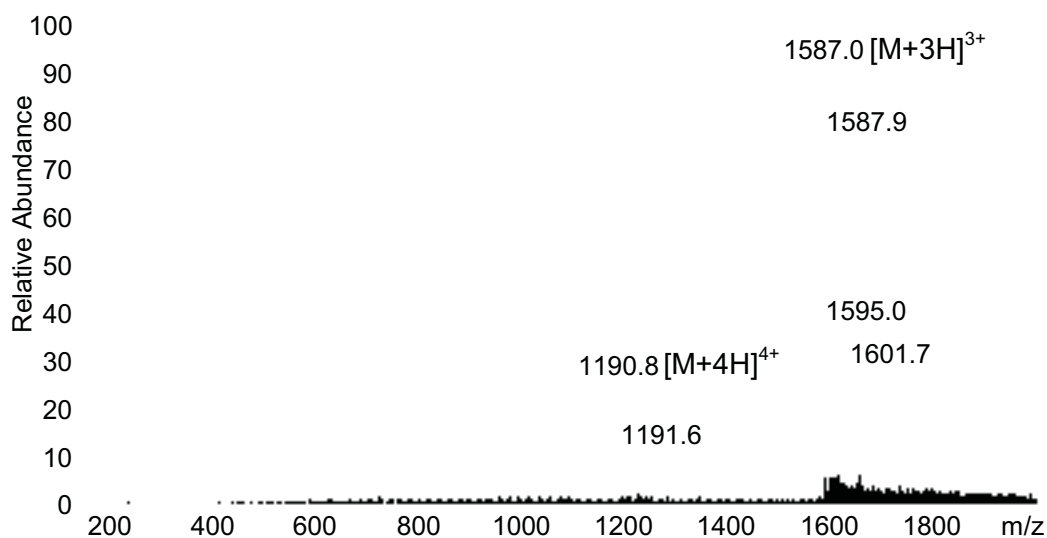
Masse wurde ein MALDI-TOF-Experiment<sup>II</sup> angeschlossen, dieses lieferte eine monoisotopische Masse von 4756.02 Da. Für ausgewählte Substanzen wurde die monoisotopische Masse durch MALDI-TOF<sup>II</sup> bzw. ESI-FT-ICR<sup>III</sup> bestimmt. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der in der Massenanalytik gefundenen Werte sowie die anhand der Primärsequenzen berechneten Durchschnittsmassen.

**Tabelle 5:** Molekulargewichte der Referenzsubstanzen.

Referenzsubstanzen	ESI-MS		zusätzliche MS-Messungen [Da]
	Durchschnittsmasse [Da]		
	gefunden	berechnet <sup>96</sup>	gefunden
VT A1 ( <b>12</b> )	4884.1	4883.6	-
VT A2 ( <b>13</b> )	4828.4	4827.5	4824.18823 E <sup>a</sup>
VT A3 ( <b>14</b> )	4829.9	4829.6	4826.13 M
VT B ( <b>15</b> )	4851.5	4851.5	-
VT 1-PS ( <b>16</b> )	4897.2	4897.6	4894.07 M
VT U-PS ( <b>17</b> )	4758.5	-	4756.02 M

M = MALDI-TOF, E = ESI-FT-ICR

<sup>a</sup>Die Abweichung von der berechneten monoisotopischen Masse von **13** beträgt 2.5 ppm.

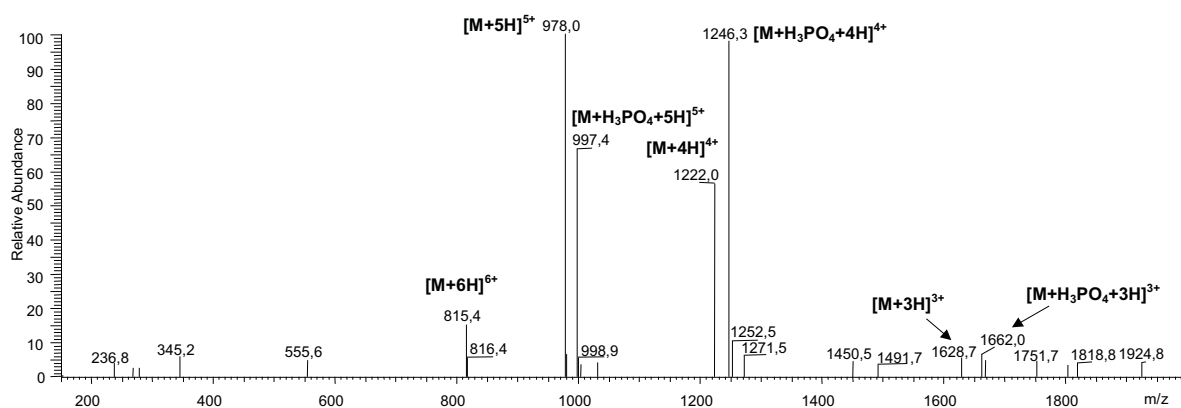


**Abbildung 6:** ESI-Massenspektrum von Viscotoxin U-PS (**17**).

<sup>II</sup> Für die Durchführung der MALDI-TOF-Experimente danke ich Herrn Dr. Bernhard Schmidt, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen.

<sup>III</sup> Herrn Dr. Jens Fuchser von der Firma *Bruker* in Bremen danke ich für die Durchführung der ESI-FT-ICR-MS-Experimente und für die zahlreichen Diskussionen.

In allen ESI-Massenspektren, außer dem von VT U-PS wurde neben dem Hauptpeak noch ein weiterer Massenpeak mit einer Differenz von + 98 Da beobachtet, wie in Abbildung 7 am Beispiel des Massenspektrums von VT A1 (**12**) zu sehen ist. Die HPLC-Chromatogramme hatten in keinem Fall Hinweise auf das Vorhandensein einer zweiten Verbindung gegeben. Bei dieser Verbindung handelt es sich in allen Fällen um das nicht-kovalent gebundene Phosphataddukt der Viscotoxine, welches bereits in der Literatur erwähnt wird, dessen Herkunft aber nicht geklärt werden konnte.<sup>55,97</sup> Da die untersuchten Proben unter Verwendung von Phosphatpuffern erhalten worden waren, kann in diesem Fall eine Phosphateinlagerung während der Isolierung nicht ausgeschlossen werden. Näher wird auf das Phosphataddukt der Viscotoxine in Kapitel A.III.6 eingegangen.



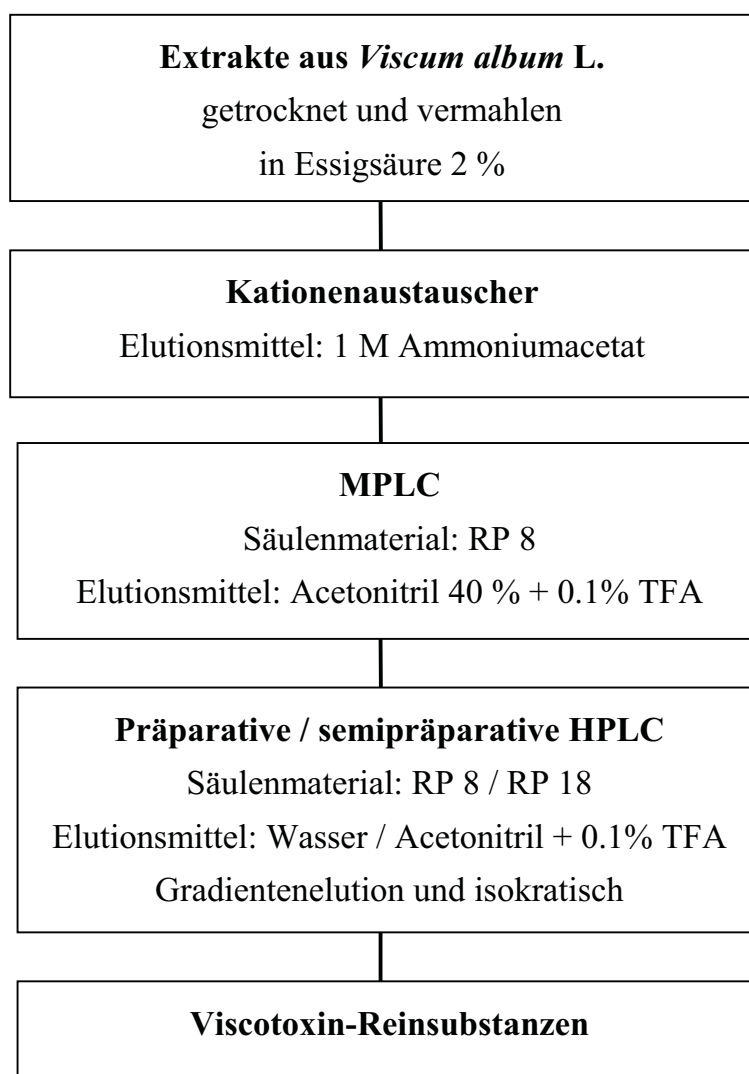
**Abbildung 7:** ESI-Massenspektrum von Viscotoxin A1 (**12**) und dessen Phosphataddukt.

Die unbekannte Probe **18** wurde am Carl Gustav Carus-Institut aus Tannenmisteln isoliert. Nach Chromatographie an der *Bischoff* Prontosil-Säule konnte der Substanz eine Retentionszeit von 25.7 min zugeordnet werden (siehe Abbildung 5). Das ESI-MS-Experiment lieferte eine Molekülmasse von 4895.5 Da, die monoisotopische Masse von 4892.29422 Da wurde durch ein ESI-FT-ICR-Experiment<sup>IV</sup> bestimmt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu den Viscotoxinen (Verhalten bei der Isolierung, in der Massenspektrometrie und in der HPLC) wurde **18** dieser Klasse von Mikroproteinen zugerechnet. Ein entsprechendes Phosphataddukt zu **18** wurde jedoch nicht beobachtet. Wegen Substanzmangel konnten keine weiteren Versuche mit dieser Verbindung unternommen werden. In den nachfolgend beschriebenen Isolierungen wurde dieses Peptid nicht wiedergefunden. Allerdings erfolgte in diesen Fällen keine Isolierung aus Tannenmisteln.

<sup>IV</sup> Die Messung am ESI-FT-ICR erfolgte an der University of Cambridge in England.

### 3. Isolierung der Viscotoxine von verschiedenen Wirtsbäumen

Die Isolierung von Viscotoxinen aus *Viscum album* L. im eigenen Labor schien aus mehreren Gründen unumgänglich. Zum einen wurden größere Substanzmengen für die geplante Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von VT A3 (**14**) durch Röntgenstrukturanalyse benötigt, zum anderen konnte zur Aufklärung von Widersprüchen in den Retentionszeiten und Massenspektren die Genese einzelner, aus Kooperationen erhaltener Viscotoxinproben nicht nachvollzogen werden. Darüber hinaus war nur durch eine eigene Aufarbeitung eine nachträgliche Phosphateinlagerung in die Viscotoxine auszuschließen. Für die Ausarbeitung einer präparativen Isolierung der Viscotoxine konnte auf mehrere Literaturangaben<sup>28,55,98</sup> zurückgegriffen werden, die weiter modifiziert und optimiert wurden. Das hieraus abgeleitete Aufarbeitungsprotokoll ist in Abbildung 8 aufgeführt.<sup>97</sup>



**Abbildung 8:** Aufarbeitungsschema für Viscotoxine aus Misteln.

### 3.1. Viscotoxine aus *Viscum album* ssp. *album* (Pappel)

#### 3.1.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

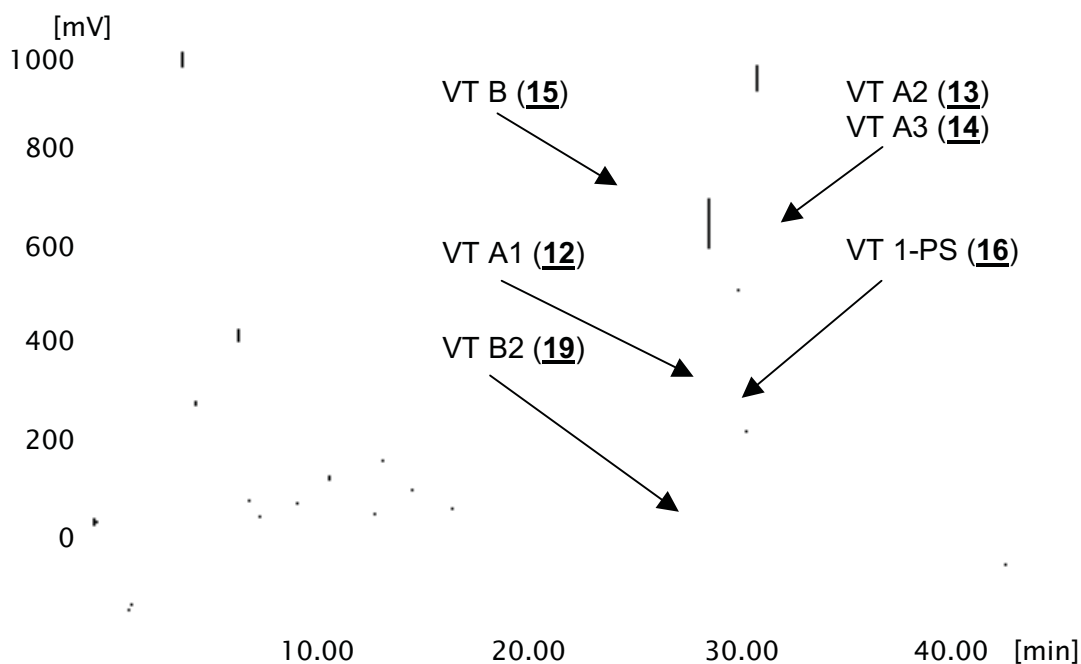
Zur Isolierung der Viscotoxine A1 (**12**), A2 (**13**), A3 (**14**), B (**15**) wurde die Pappelmistel gewählt, da sie zu den viscotoxinreichsten Misteln gehört.<sup>48,65</sup> Es sollte eine Methode entwickelt werden, die die ubiquitären Bestandteile der Pflanzenbiomasse effizient ausschließt und zugleich die Isolierung von Viscotoxinen in hochreiner Form ermöglicht. Ferner sollte ausgeschlossen werden, daß ein Phosphataddukt als Artefakt der Aufarbeitung entsteht, indem jeder Kontakt mit Phosphationen während der Aufarbeitung vermieden wurde. Die Pflanzenbiomasse stellt eine komplexe Matrix dar, welche eine Vielzahl an Komponenten enthält, darunter Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide und Sekundärmetaboliten.<sup>94</sup> Im Regelfall benötigt eine Aufreinigung von Peptiden aus solch einer Matrix daher mehrere Schritte.

Die Mistelbüsche wurden nach dem Pflücken<sup>V</sup> mit einer Schere zerkleinert und anschließend bei 60 °C 5 Tage getrocknet, um die Pflanzenteile zu konservieren und einem enzymatischen Abbau der Mikroproteine bei der weiteren Aufarbeitung vorzubeugen. 2 kg getrocknete Misteln wurden dann in einer Planetenmühle zu 1.7 kg zermahlen. Da es sich bei den Viscotoxinen um intrazelluläre Peptide handelt, war ein Aufschluß der Pflanzenzellen nötig. Dieser wurde jeweils an 100 g Portionen durch Inkubation in 2%iger Essigsäure bei 4 °C für 24 h und anschließende Behandlung im Ultraschallbad erreicht. Das nach Abtrennung der unlöslichen Materialien erhaltene Filtrat enthielt die freigesetzten, wasserlöslichen Viscotoxine und wurde über eine Säule mit einem starken Kationenaustauscher gegeben. Die Ionenaustausch-Chromatographie ist eine der Standardmethoden in der Protein- und Peptidaufreinigung<sup>94,99</sup> und wird in diesem Fall zur Anreicherung der Viscotoxine genutzt. Die Elution der adsorbierten Peptide erfolgte durch Erhöhung der Salzkonzentration der mobilen Phase von zunächst 0.02 M auf 1.0 M Ammoniumacetat. Die resultierende Fraktion enthielt neben den Viscotoxinen eine hohe Konzentration an Ammoniumacetat, welches durch Mitteldruck-Chromatographie (LiChroprep RP-8-Säule) mit einem Wasser/Acetonitril-Stufen-Gradienten entfernt wurde. Die Zusammensetzung des aufgereinigten Viscotoxin-Rohproduktes VE-P wurde anschließend durch analytische HPLC (siehe Abbildung 9) und HPLC-ESI-MS untersucht. Es waren alle vier erwarteten Viscotoxine VT A1 (**12**),

---

<sup>V</sup> Für die Beschaffung der Mistel vom Wirtsbaum Pappel danke ich Dr. Ralph Krätzner, Universität Göttingen.

VT A2 (**13**), VT A3 (**14**), und VT B (**15**) im Rohprodukt (VE-P) vertreten. Wie für das Viscotoxinspektrum von Laubbaummisteln vorhergesagt worden war, konnte VT U-PS (**17**) nicht beobachtet werden, überraschenderweise jedoch VT 1-PS (**16**). Zusätzlich gab es einen unbekannt Peak, die dazugehörige Substanz (**19**) wurde ebenfalls isoliert.



**Abbildung 9:** Analytisches HPLC-Chromatogramm des Viscotoxin-Rohproduktes (VE-P).

### 3.1.2. Präparative Isolierung mittels HPLC

Nach der Identifizierung von **12**, **13**, **14**, **15** und **16** im Rohprodukt erfolgte die weitere Fraktionierung und Aufreinigung mittels präparativer bzw. semi-präparativer HPLC (Isolierungsschema siehe Abbildung 65, S. 129). Dazu wurden je nach Bedarf drei verschiedene Säulen eingesetzt, die sich in der stationären Phase oder in dem Säulendurchmesser unterschieden. In Abbildung 10 sind die aufeinanderfolgenden präparativen Isolierungschromatogramme von Viscotoxin A3 (**14**), ausgehend vom VT-Rohprodukt (VE-P), mit der jeweiligen Säule und dem verwendeten Programm aufgeführt.

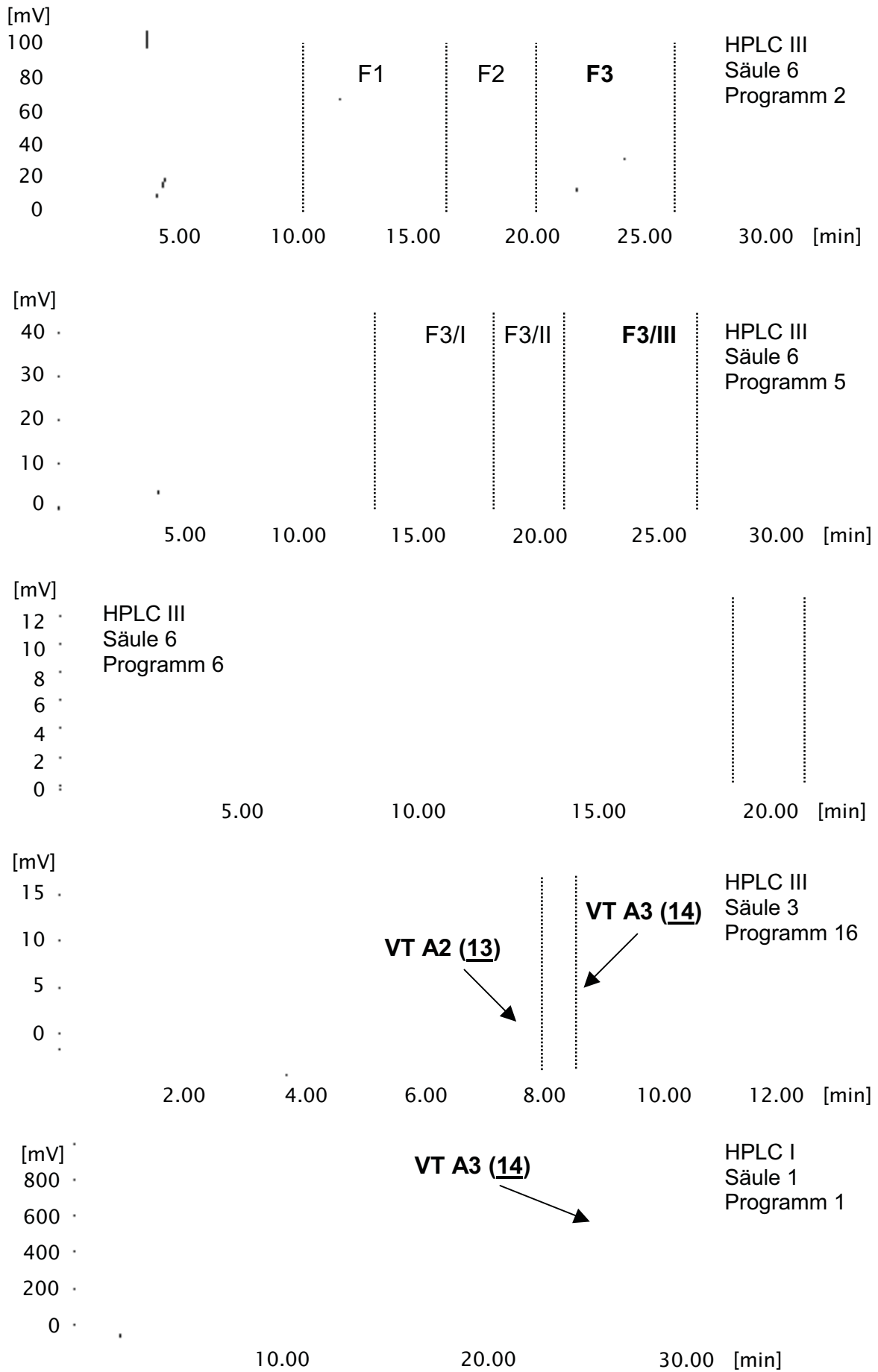
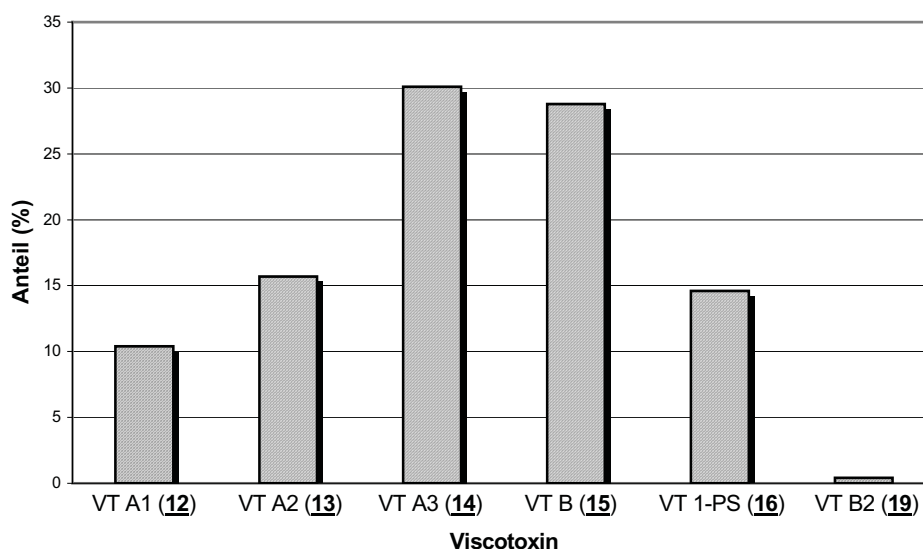


Abbildung 10: HPLC-Chromatogramme der präparativen Aufreinigung von VT A3 (14).



Neben den erwarteten Mikroproteinen **12** bis **16** wurde auch die unbekannte Substanz (**19**) als Reinsubstanz erhalten. Der Gehalt je Viscotoxin im Viscotoxin-Rohprodukt betrug für **12** 10.4%, **13** 15.7%, **14** 30.1%, **15** 28.8%, **16** 14.6% und **19** 0.4%. Pro 100 g Mistelpulver betrug die Ausbeute im Durchschnitt 5 mg **12**, 8 mg **13**, 15 mg **14**, 14 mg **15**, 7 mg **16** und 0.2 mg **19**. Jedoch sind diese Werte abhängig von der Auflösung der jeweiligen Peaks im HPLC-Chromatogramm und von dem verwendeten Schnittmuster. Alle sechs Reinsubstanzen wurden routinemäßig an der analytischen HPLC I anhand ihrer Retentionszeiten (siehe Tabelle 6) überprüft.



**Abbildung 11:** Verteilung der Viscotoxin-Isoformen in dem untersuchten Pappelmistel-Extrakt (VE-P).

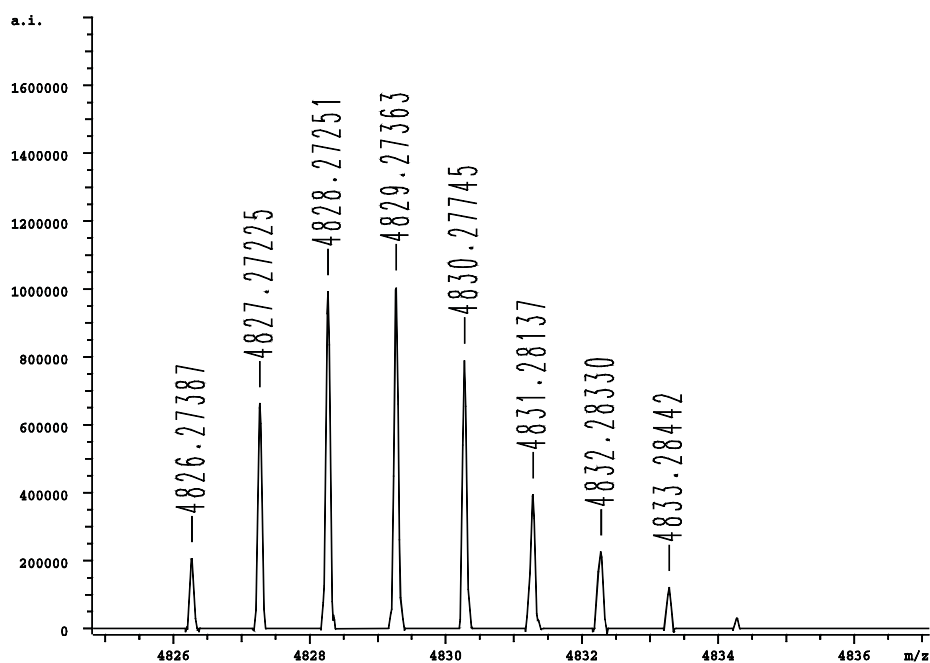
### 3.1.3. Massenspektrometrische Analyse der isolierten Substanzen

VT A1 (**12**), VT A2 (**13**), VT A3 (**14**), VT B (**15**), VT 1-PS (**16**) und **19** wurden einem ESI-MS-Experiment unterzogen. Im positiven Ionenstrom wurde für jede Probe eine Reihe an mehrfach geladenen Ionen beobachtet und nach Auswertung der Massenspektren wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Molekulargewichte erhalten. Zur Bestätigung der in der Literatur postulierten Summenformeln (Kapitel A.III.1.3.1) wurden **12**, **13**, **14**, **15**, **16** und **19** an einem ESI-FT-ICR-Massenspektrometer<sup>III</sup> bei Bruker in Bremen vermessen. Die Ergebnisse nach Dekonvolution der mehrfach geladenen Ionen sind neben den berechneten Werten ebenfalls in Tabelle 6 aufgeführt. Alle Werte sind auf die fünfte Stelle nach dem Komma gerundet, Abweichungen sind in ppm angegeben. Die gefundenen Abweichungen zu den theoretischen Werten

schließen die in der Literatur postulierten Summenformeln, mit Ausnahme der von **14**, mit Sicherheit aus (siehe Kapitel A.III.3.1.4).

**Tabelle 6:** Gefundene und berechnete Molekulargewichte der isolierten Komponenten.

Viscotoxin-Isoform	HPLC I R <sub>t</sub> [min]	ESI-MS Molmasse [Da]	ESI-FT-ICR-MS <sup>III</sup>		
			Molmasse [Da]		Abweichung [ppm]
			gefunden	berechnet <sup>96</sup>	
A1 ( <b>12</b> )	21.9	4884.1	4881.29732	4880.25940	213
A2 ( <b>13</b> )	25.2	4827.6	4824.21780	4824.17575	8.7
A3 ( <b>14</b> )	25.9	4829.3	4826.27387	4826.26416	1.9
B ( <b>15</b> )	18.9	4851.4	4848.26065	4848.20810	10.8
1-PS ( <b>16</b> )	24.0	4896.4	4894.28273	4894.22888	11.0
<b>19</b>	20.3	4853.0	4849.24387	-	-

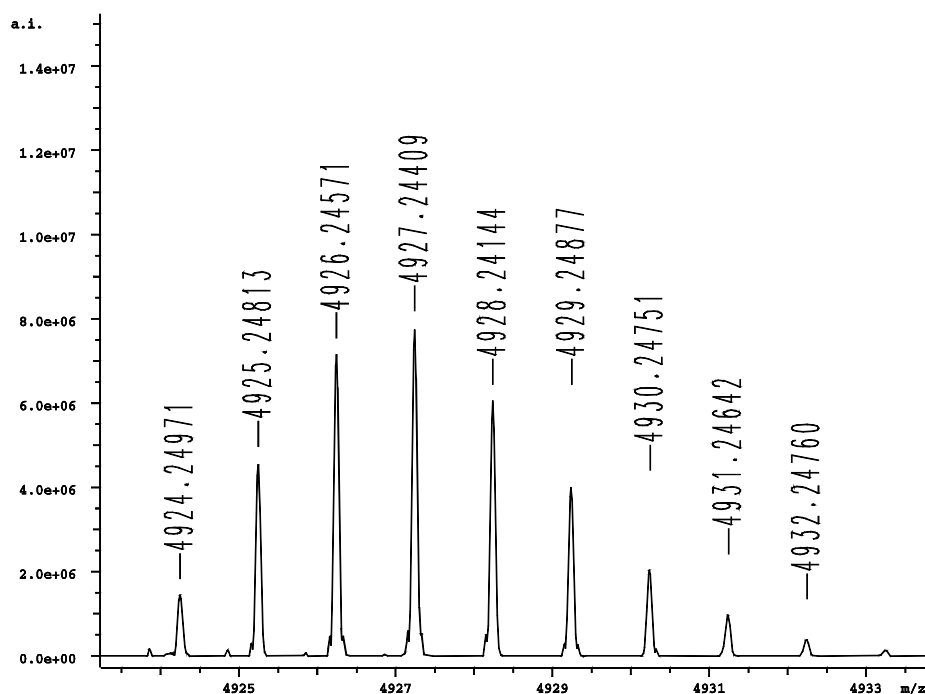


**Abbildung 12:** Positives ESI-FT-ICR-Dekonvolutionsspektrum von Viscotoxin A3 (**14**), dargestellt ist  $[M]^0$ .

In allen Proben, inclusive **19**, konnte das entsprechende Phosphataddukt, ohne vorherige Hinweise aus den HPLC-Chromatogrammen, sowohl in den ESI-MS- als auch in den ESI-FT-ICR-Experimenten nachgewiesen werden (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Gefundene und berechnete Molekulargewichte der Viscotoxin-Phosphataddukte.

Viscotoxin-Isoform	HPLC I $R_t$ [min]	ESI-MS Molmasse [Da]	ESI-FT-ICR-MS <sup>III</sup>		
			Molmasse [Da]		Abweichung [ppm]
			gefunden	berechnet <sup>96</sup>	
A1 ( <b>12</b> )	21.9	4982.1	4979.27307	4978.23639	208
A2 ( <b>13</b> )	25.2	4924.6	4922.19397	4922.15262	8.4
A3 ( <b>14</b> )	25.9	4926.2	4924.24971	4924.24100	1.8
B ( <b>15</b> )	18.9	4947.9	4946.23747	4946.18494	10.6
1-PS ( <b>16</b> )	24.0	4994.5	4992.26547	4992.20572	11.9
<b>19</b>	20.3	4948.9	4947.22000	-	-

**Abbildung 13:** Positives ESI-FT-ICR-Dekonvolutionspektrum des Viscotoxin A3-Phosphatadduktes (**14**), dargestellt ist  $[M]^0$ .

### 3.1.4. Diskussion der Ergebnisse

Abbildung 8 zeigt, daß neben den für die Pappel typischen Viscotoxinen VT A1 (**12**), VT A2 (**13**), VT A3 (**14**) und VT B (**15**) auch das nur für Kiefern- und Tannenmisteln typische VT 1-PS (**16**)<sup>48</sup> im Rohprodukt (VE-P) enthalten war. Daneben wurde eine unbekannte Substanz **19** nachgewiesen. Der Gesamtgehalt an Viscotoxinen liegt niedriger als der in der Literatur beschriebene. Betrachtet man das Verhältnis der einzelnen Viscotoxine untereinander, fällt der hohe Gehalt (28.8 %) an **15** auf. Dies ist

ebenfalls untypisch für Laubbaummisteln (typisch: 6-12%). Die Mengen der Viscotoxine **12**, **13** und **14** stehen in einem normalen prozentualen Verhältnis zueinander, wobei **14** am häufigsten auftritt. **16** und **19** kommen nur in sehr geringen Mengen vor.

In einer ersten Analyse mittels HPLC und ESI-Massenspektrometrie ließen sich die gefundenen Viscotoxine **12** - **16** scheinbar eindeutig den Referenzsubstanzen und den publizierten Viscotoxinen zuordnen. Erst die hochaufgelösten Molekülmassen der in dieser Arbeit isolierten Viscotoxine zeigen, mit Ausnahme von VT A3 (**14**) signifikante Abweichungen (8.7 – 213 ppm) zu denen der publizierten Peptidsequenzen (Tabelle 6). Ein direkter Vergleich aller drei Analyseparameter kann zwischen dem isolierten VT A2 (**13**) und der Referenzsubstanz VT A2 angestellt werden. Obwohl beide Verbindungen im HPLC-Chromatogramm nicht unterscheidbar sind und auch im ESI-MS-Spektrum die gleiche Masse aufweisen, zeigen die hochaufgelösten Massenspektren eindeutig, daß es sich um zwei verschiedene Peptide handelt. Obwohl die genaue Genese von dem Referenz-Viscotoxin A2 nicht bekannt ist, kann die Isolierung aus Pappelmisteln mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Beide Substanzen wurden somit aus Misteln verschiedener Wirtsbäume isoliert. Ein Vergleich zwischen den hochaufgelösten Massenspektren der anderen isolierten Mikroproteine, gemessen am ESI-FT-ICR, und den Referenzsubstanzen, gemessen am MALDI-TOF, ist aufgrund der Ungenauigkeit (bis zu 50 ppm) des MALDI-Massenspektrometers nicht möglich.

Ursache für die gefundenen Diskrepanzen könnten geringfügige strukturelle Abweichungen der isolierten Substanzen gegenüber den literaturbeschriebenen sein. So könnte z. B. die Sequenz der jeweiligen Isoform innerhalb der nicht-konservierten Bereiche in Abhängigkeit von dem Wirtsbaum minimal variieren. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß die in den 70er Jahren vorgeschlagenen Primärsequenzen, die teilweise in jüngerer Zeit korrigiert wurden, nach wie vor nicht fehlerfrei sind. Trotz der sehr hohen Genauigkeit der ESI-FT-ICR-Messungen (Fehler unter 3 ppm), ist es nicht möglich, aus der monoisotopischen Masse Aussagen über die Primärstruktur abzuleiten. Betrachtet man die konservierten Aminosäurebereiche innerhalb des Peptides als gesichert und sucht nach möglichen Kombinationen für die nichtkonservierten Aminosäuren, erhält man eine zu große Zahl an Treffern.

Die vorgestellten Massenabweichungen wurden erst gegen Ende dieser Arbeit entdeckt. Zur Klärung dieses Befundes bedarf es weiterer Untersuchungen, die jedoch nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Die Verbindung **19** wurde ebenfalls den Viscotoxinen zugerechnet. Gründe dafür sind das Auftreten im Viscotoxinrohprodukt, die Bildung mehrfach geladener Ionen in den ESI-MS-Experimenten, die ähnliche Molmasse sowie die Bildung eines Phosphatadduktes. Diese Hinweise werden in Kapitel A.III.8.2 durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt, aufgrund der chromatographischen Ähnlichkeit zu VT B (**15**) wurde die Verbindung **19** Viscotoxin B2 genannt.

### 3.2. Viscotoxin U-PS (**17**) aus *Viscum album* ssp. *austriacum* (Kiefer)

In Laubbaummisteln ist, wie bereits in Kapitel A.III.1.3.1 erwähnt, Viscotoxin U-PS (**17**) in der Regel nicht zu finden. Da jedoch für eine Primärsequenzanalyse sowie für die weitere Analytik größere Mengen an **17** nötig waren, wurde **17** aus Kiefernmisteln isoliert. Dabei konnte auf die Erfahrungen aus der Verarbeitung von Pappelmisteln zurückgegriffen werden.

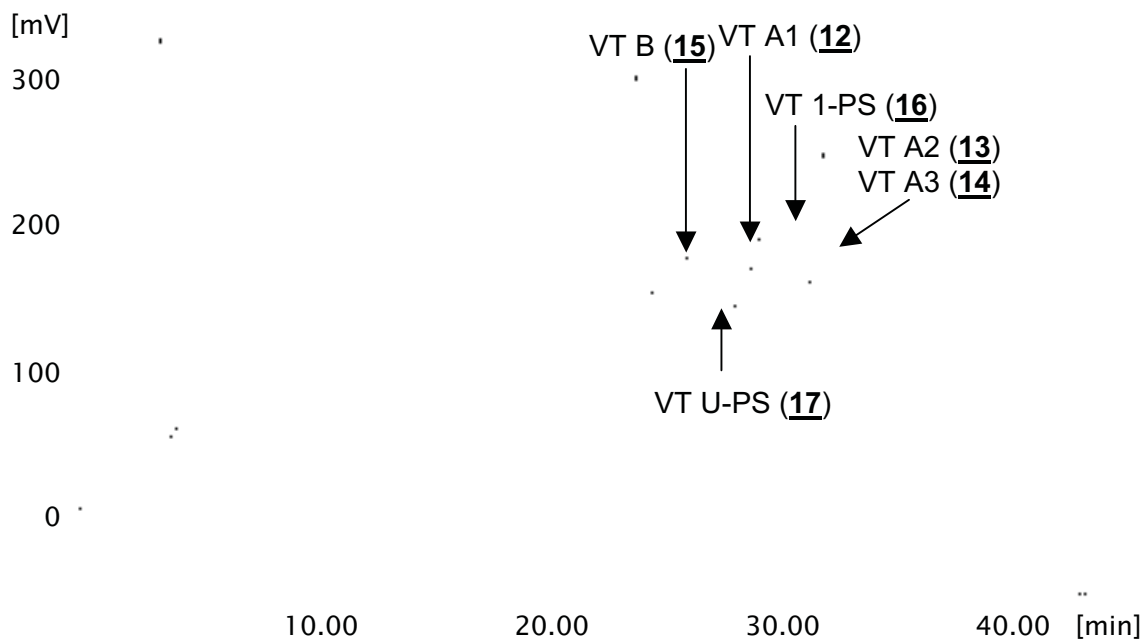
#### 3.2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Insgesamt wurden 2 kg Kiefernmisteln<sup>VI</sup> gesammelt und analog zur Verarbeitung der Pappelmisteln 5 Tage bei 60 °C getrocknet. Nach anschließender Pulverisierung in der Planetenmühle wurden 760 g Mistelpulver erhalten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in 100 g Portionen analog zu dem unter A.III.3.1.1 beschriebenen Verfahren und wie in Abbildung 8 auf S. 26 gezeigt.

In der HPLC-Analyse des VT-Rohproduktes (VE-K) (Abbildung 14) konnten neben VT U-PS (**17**) auch VT A1 (**12**), VT A2 (**13**), VT A3 (**14**), VT B (**15**) und VT 1-PS (**16**) nachgewiesen werden, was mit den bisherigen Literaturangaben nur z. T. übereinstimmt, dort wird **12** nur aus Laubbaum- oder Tannenmisteln beschrieben.<sup>48,65</sup> Der Befund konnte durch LC/MS-gekoppelte Massenspektrometrie gesichert werden.

---

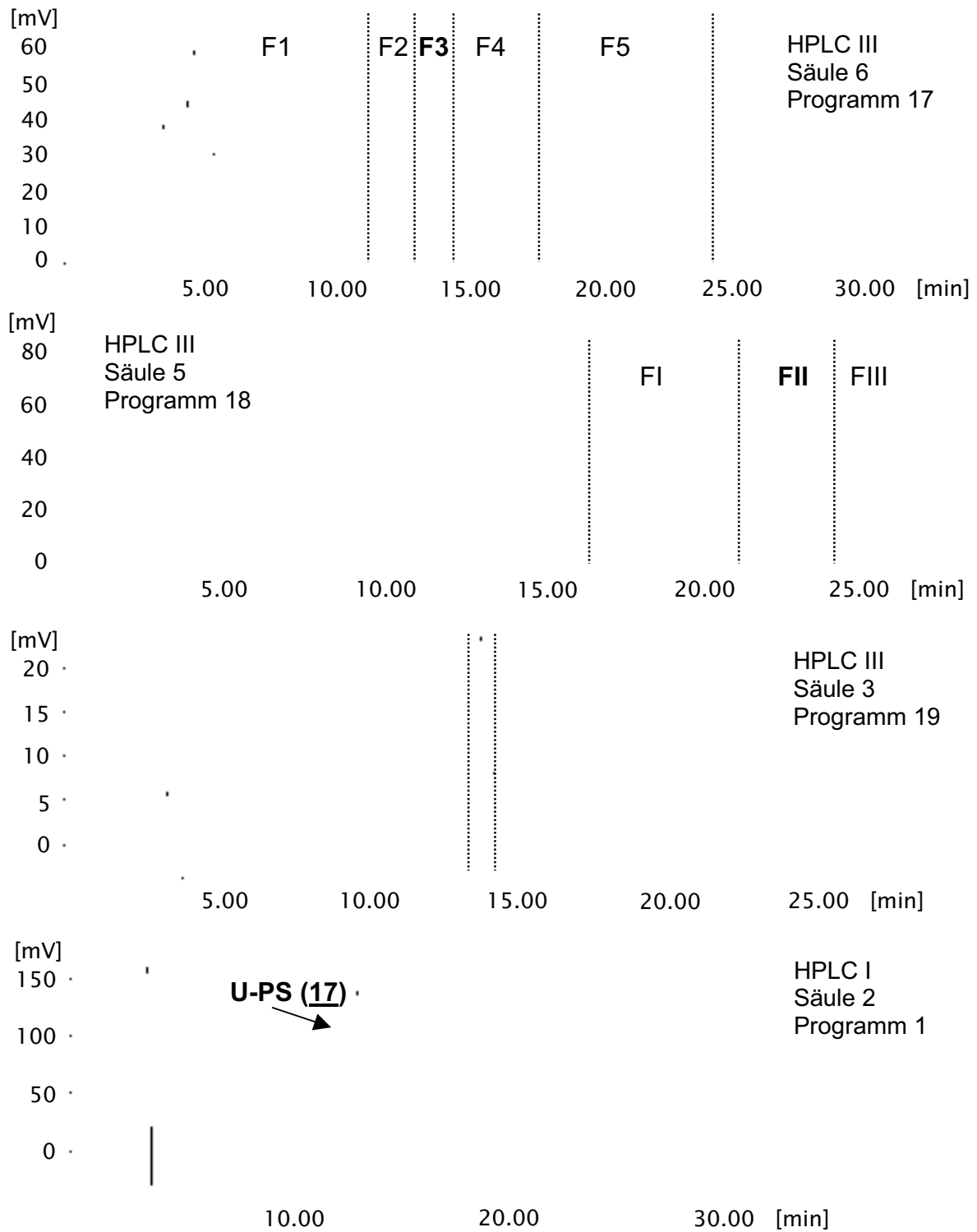
<sup>VI</sup> Für die Ernte und das Trocknen der Kiefernmisteln danke ich der Fa. *Helixor* (Rosenfeld), insbesondere Frau Marion Zeeck für ihre Unterstützung.



**Abbildung 14:** HPLC-Chromatogramm des Viscotoxinrohprodukts (VE-K) aus Kiefernmisteln.

### 3.2.2. Präparative Isolierung mittels HPLC

Die Isolierung von 17 erfolgte durch semi-präparative HPLC (Abbildung 66, S. 134) unter Verwendung von zwei Säulen mit unterschiedlichem Trägermaterial. Das Rohprodukt wurde zunächst durch zweimalige Chromatographie an einer semi-präparativen Nucleosil-C<sub>8</sub>-Säule mit zwei unterschiedlichen Wasser/Acetonitril-Gradienten vorgereinigt und anschließend an einer semi-präparativen Aqua-C<sub>18</sub>-Säule in reiner Form erhalten. Die aufeinanderfolgenden Reinigungsschritte, ausgehend von dem Rohprodukt (VE-K) bis zum reinen 17, sind in Form von Chromatogrammen in Abbildung 15 dargestellt. Die Ausbeute an 17 betrug 2.5 mg pro 100 g Mistelpulver. Auf die Aufreinigung der Fraktionen, die 12, 13, 14, 15 und 16 enthielten, wurde verzichtet.



**Abbildung 15:** HPLC-Chromatogramme der präparativen Aufreinigung von 17.

### 3.2.3. Massenspektrometrische Analyse von Viscotoxin U-PS (17)

Im positiven Ionenstrom des Elektronenspray-Massenspektrometers konnte die Molekülmasse von 4760 Da für die Verbindung **17** bestimmt werden. Zur Bestätigung wurde ein hochaufgelöstes ESI-FT-ICR-Massenspektrum<sup>IV</sup> aufgenommen, das ein dreifach positiv geladenes Ion mit einer Masse von 1586.64947 Da ergab. Die Dekonvolution des Wertes ergab eine monoisotopische Molmasse von 4756.92493 Da. Es wurde kein dazugehöriges Phosphataddukt angezeigt.

## 4. Zur biologischen Aktivität der Viscotoxine

### 4.1. Übersicht zum Stand der Forschung

Lektine und Viscotoxine sind in vielen Eigenschaften, darunter ihre pharmakologischen Wirkungen, gegensätzlicher Natur.<sup>100</sup> Wie die Mistellektine wirken auch die Viscotoxine cytotoxisch, jedoch verursachen die Viscotoxine einen nekrotischen Zelltod, während die Mistellektine eine Apoptose induzieren (siehe Kapitel A.III.1.3.2).

Die Cytotoxizität von Viscotoxin-Extrakten, VT A2, A3 und B enthaltend, wurde an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Die Yoshida Sarcoma Zelllinie zeigte dabei eine höhere und selektivere Empfindlichkeit gegenüber dem Extrakt ( $ED_{50} = 0.7 \mu\text{g/mL}$ ) als die Leukämie Zelllinien K562 ( $ED_{50} = 2.3 \mu\text{g/mL}$ ) und MOLT-4 ( $ED_{50} = 15.2 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>101</sup> An ersteren wurde erstmals eine vergleichende pharmakologische Studie der verschiedenen Viscotoxin-Isoformen durchgeführt, die große Toxizitätsunterschiede innerhalb der einzelnen Isoformen erkennen läßt (Tabelle 8).<sup>28</sup>



**Tabelle 8:** Cytotoxizität verschiedener VT-Isoformen in Yoshida Sarcoma Zelllinien.<sup>28</sup>

Viscotoxin-Isoform	ED <sub>50</sub> [µg/mL]
A1	0.87
A2	1.08
A3	0.31
B	4.58
1-PS	0.44
U-PS	4.04

ED<sub>50</sub>: Effektive Dosis, die den <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau in die Zelle um 50% inhibiert.

Nach Inkubation humaner Lymphozyten bzw. MOLT-4-Zellen mit Viscotoxinen kommt es zur raschen Zellmembran-Permeabilisierung, Schwellung der Mitochondrien mit Verlust ihrer Christae und Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten innerhalb weniger Minuten bzw. Stunden.<sup>102,103,104</sup> Anders als in Granulozyten wird die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten in Lymphozyten und Tumorzellen scheinbar nicht mehr von den zellulären Redoxsystemen wie z. B. Glutathion kompensiert.

α- und β-Thionine sind als membran-aktive Peptide bekannt. Sowohl *in vitro*-Studien an Targetzellen als auch Untersuchungen an Modellmembranen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen der Toxizität von Thioninen und ihrer Fähigkeit, Membran-Permeabilisierung zu induzieren. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Nach *Hughes et al.* bilden Thionine Ionenkanäle innerhalb der Plasmamembran,<sup>105</sup> wohingegen *Thevissen et al.* von einer Peptid-induzierten Destabilisierung sprechen.<sup>106</sup> Studien zur Wechselwirkung zwischen VT A3 und Modellmembranen, aufgebaut aus Phosphatidylcholin oder Phosphatidylserin, weisen darauf hin, daß VT A3 Membranversteifung und Membrandestabilisierung induziert und daß dabei elektrostatische Kräfte eine wichtige Rolle spielen.<sup>107</sup>

Viscotoxine zeigen auch immunmodulierende Wirkungen. *Stein et al.* konnten nachweisen, daß Viscotoxine die Phagozytose opsonierter *Escherichia coli*- und CD8<sup>+</sup>-Zellen durch humane Granulozyten stimulieren.<sup>108</sup> Neueste *in vitro*-Untersuchungen zeigen, daß die Viscotoxine VT A1 (85 nM), VT A2 (18 nM) und VT A3 (8 nM) in nicht-toxischen Konzentrationen die Natürliche Killerzell-(NK)-vermittelte Cytotoxizität gegenüber Tumorzellen (K562-Tumorzelllinie) steigern. Dabei werden die NK-Zellen nicht direkt von den Viscotoxinen aktiviert, vielmehr

wirken diese auf die NK-Tumorzellkonjugate. Nichttarget-Zellen in direkter Umgebung bleiben dabei von der NK-vermittelten Cytolyse verschont.<sup>109</sup>

In niedriger Konzentration führen Viscotoxine zu Blutdruckabfall, Bradykardie und negativer Inotropie des Herzens.<sup>110</sup> Mit negativ geladener DNA bilden die positiv geladenen Mikroproteine Komplexe ionischer Natur und schützen damit die native Doppelhelix vor Hitzedenaturierung, ähnlich der Wirkung von Histonen.<sup>111</sup>

#### 4.2. Eigene Arbeiten zur biologischen Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thioninen wird in mehreren Publikationen beschrieben.<sup>51</sup> Es ist darüber hinaus bekannt, daß innerhalb dieser Gruppe von Verbindungen die biologische Aktivität einzelner Vertreter variiert.<sup>107</sup>

Mit den isolierten Viscotoxinen **12** bis **17** und **19** wurden Plattendiffusionstests bezüglich ihrer Wirkung gegen die Testkeime *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* durchgeführt. Keine dieser Verbindungen zeigte bei einer Konzentration von 1 mg/mL eine Aktivität gegen diese Bakterien bzw. den Pilz.

Da die Cytotoxizität der einzelnen Isoformen in Tumorzelllinien nur in wenigen Fällen vergleichend untersucht worden ist,<sup>28</sup> wurden die Mikroproteine **12** bis **17** und **19** von *W. Beil*<sup>VII</sup> auf cytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HEPG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) gemäß den NCI-Richtlinien<sup>112</sup> getestet. Daneben wurden auch die Viscotoxin-Rohprodukte, isoliert sowohl aus Pappelmisteln (VE-P) als auch aus Kiefernmisteln (VE-K), den Tests unterzogen.

Die verschiedenen Viscotoxin-Isoformen und die beiden Rohprodukte VE-P und VE-K wiesen erhebliche Unterschiede in ihren Aktivitäten sowohl untereinander als auch gegenüber den einzelnen Tumorzelllinien auf. Die Viscotoxine **12**, **13**, **14**, **15**, **16** und **19** zeigen eine gute Wirkung gegen die HM02-Zelllinie (Tabelle 9), wobei Viscotoxin A2 (**13**) das aktivste darstellt, gefolgt von Viscotoxin A3 (**14**). In den beiden anderen Zelllinien (Tabelle 10 und Tabelle 11) fällt die Wirkung dieser Substanzen schwächer aus, hier ist jeweils **14** das Toxin mit der höchsten Aktivität. Von den Reinsubstanzen zeigt **19** in allen drei Tumorzelllinien die geringste Wirkung, wohingegen VT U-PS (**17**) bei keiner der drei Zelllinien eine Hemmung bewirkt. VE-K hat in allen Zelllinien einen sehr geringen TGI-Wert, während bei VE-P das Ausmaß

---

<sup>VII</sup> Herrn Prof. Dr. W. Beil (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Allgemeine Pharmakologie) danke ich für die Durchführung der Cytotoxizitätstests.

der Aktivität in der Reihenfolge HM02-, MCF7- und HEPG2-Zelllinie abnimmt. Diese Divergenz zwischen VE-P und VE-K zeigt eindeutig eine Abhängigkeit der Cytotoxizität einzelner Mistelextrakte von deren Herkunft und Zusammensetzung. Die Werte für VE-P folgen insbesondere aus der Aktivität der beiden Hauptinhaltsstoffe VT A3 (**14**) und VT B (**15**). Die Hauptinhaltsstoffe von VE-K aus der Kiefernmistel sind die weniger aktiven Viscotoxine 1-PS (**16**) und U-PS (**17**). Dies führt dazu, daß die Kiefernmistel die viscotoxinärmste unter den drei Unterarten sowie die mit der geringsten Toxizität ist.<sup>48</sup>

**Tabelle 9:** Zelllinie HM02 (Magenadenocarcinom)

Viscotoxin-Isoform	GI <sub>50</sub> (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)
A1 ( <b>12</b> )	0.30	0.95	>1
A2 ( <b>13</b> )	0.05	0.15	0.42
A3 ( <b>14</b> )	0.10	0.21	0.41
B ( <b>15</b> )	0.21	0.70	>1
1-PS ( <b>16</b> )	0.18	0.55	0.85
U-PS ( <b>17</b> )	> 10 (0)	> 10 (0)	> 10 (0)
B2 ( <b>19</b> )	2.1	>10 (86)	>10
VE-P	1.2	2.5	5.0
VE-K	>10 (39)	>10	>10

GI<sub>50</sub> = Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

TGI = Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

LC<sub>50</sub> = Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt, d. h. die 24 h nach Aussaat die vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.

Werte in Klammern: % Hemmung bei angegebener Konzentration.

**Tabelle 10:** Zelllinie HEPG2 (Lebercarcinom)

Viscotoxin-Isoform	GI <sub>50</sub> (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)
A1 ( <b>12</b> )	0.58	9.9	>10
A2 ( <b>13</b> )	0.24	1.6	8.0
A3 ( <b>14</b> )	0.14	0.38	>1
B ( <b>15</b> )	1.0	3.2	>10
1-PS ( <b>16</b> )	1.2	3.2	>10
U-PS ( <b>17</b> )	> 10 (0)	> 10 (0)	> 10 (0)
B2 ( <b>19</b> )	9.8	>10	>10
VE-P	>10 (37)	>10	>10
VE-K	>10	>10	>10

**Tabelle 11:** Zelllinie MCF7 (Mammacarcinom)

Viscotoxin-Isoform	GI <sub>50</sub> (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC <sub>50</sub> (µg/mL)
A1 ( <b>12</b> )	0.022	>1 (86)	>1
A2 ( <b>13</b> )	0.052	>1 (81)	>1
A3 ( <b>14</b> )	0.075	0.60	0.95
B ( <b>15</b> )	0.33	>1 (70)	>1
U-PS ( <b>17</b> )	> 10 (0)	> 10 (0)	> 10 (0)
1-PS ( <b>16</b> )	0.85	>1 (75)	>1
B2 ( <b>19</b> )	9.6	>10	>10
VE-P	0.70	7.5	>10
VE-K	1.7	>10 (68)	>10

Mit **14** und VE-P wurden Zellzyklusanalysen<sup>VIII</sup> an MCF7-Tumorzelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Dargestellt ist der Prozentsatz an Zellen, die sich in der SubG1- (apoptotische Zellen), G1- (Ruhephase), S- (DNA-Replikation) und G2/M-Phase (Ruhephase vor der Zellteilung) befinden. **14** und VE-P waren in ihrer Aktivität gleich und bewirkten den direkten Zelltod. Zellen, die sich in der G1- bzw. G2/M-Phase befanden, wurden direkt in den Zelltod getrieben. Eine Arretierung der Zellen in einen bestimmten Zellzyklus wurde nicht beobachtet. Dies steht in Einklang mit der Fähigkeit der Viscotoxine, Zellmembranen zu permeabilisieren.<sup>107</sup>

**Tabelle 12:** Zellzyklusanalysen von **14** und VE-P.

	SubG1 (Apoptose)	G1	S	G2/M
Kontrolle <sup>a</sup>	6.6 ± 2.1%	58 ± 1.5%	16.1 ± 0.60%	19 ± 0.50%
<b>14</b> <sup>b</sup>	29.7 ± 1.7%*	40 ± 3.5%*	18.2 ± 0.75%	12.2 ± 1.2%*
VE-P <sup>c</sup>	26 ± 3.0%*	44 ± 1.0%*	18.2 ± 0.75%	12.7 ± 0.80%*

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten;

\*p<0.05 (t-Test), <sup>a</sup>Lösungsmittelkontrolle

Konzentrationen: <sup>b</sup>0.5 µg/mL, <sup>c</sup>5.0 µg/mL, Inkubationszeit je 24 h.

Untersuchungen zur Wechselwirkung der isolierten Viscotoxin **12** - **19** mit der Plasmamembran von Frosch-Oozyten sind noch nicht abgeschlossen.

<sup>VIII</sup> Für die Durchführung der Zellzyklusanalysen danke ich Herrn Prof. Dr. W. Beil (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Allgemeine Pharmakologie).

## 5. Versuche zur Stabilität von Viscotoxin A1 (12), A2 (13), A3 (14), B (15), 1-PS (16), U-PS (17) und B2 (19)

Die Stabilität von Viscotoxinen gegenüber verschiedenen Faktoren, u. a. Hitze und Proteasen, ist bekannt und für einige Isoformen untersucht.<sup>109</sup> Entsprechende Untersuchungen wurden mit allen in dieser Arbeit behandelten Viscotoxinen durchgeführt, darunter auch die neuen Verbindungen 17 und 19. Zur Bestimmung der Stabilität wurde eine Lösung des jeweiligen Viscotoxins bekannter Konzentration unter sauren und basischen Bedingungen sowie unter UV-Bestrahlung und bei erhöhter Temperatur untersucht. Der Zersetzungsgrad der Viscotoxinproben wurde anschließend anhand von HPLC-Chromatogrammen (relative Peakfläche) im Vergleich zur unbehandelten Vergleichsprobe bestimmt (siehe Tabelle 13).

Die Proben von 12 - 17 und 19 verhielten sich unter Hitze-Behandlung und UV-Bestrahlung annähernd gleich, alle Isoformen wiesen geringe Zersetzung auf. Unter sauren Bedingungen war 17 die labilste Verbindung, 12 - 16 und 19 blieben nahezu unverändert. Unter basischen Bedingungen zersetzte sich VT U-PS (17) vollständig. VT A1 (12) und VT A2 (13) zeigten ebenfalls eine deutliche Instabilität. Deutlich stabiler waren VT B (15), VT 1-PS (16) und VT B2 (19), am beständigsten unter Einfluß von Natronlauge erwies sich VT A3 (14).

**Tabelle 13:** Ergebnisse der Stabilitätstests an Viscotoxinen.

Behandlung	relative Peakfläche (%) <sup>a</sup>						
	VT A1	VT A2	VT A3	VT B	VT 1-PS	VT U-PS	VT B2
keine	100	100	100	100	100	100	100
Hitze (80 °C, 2 h)	83	83	85	82	85	91	70
UV-Bestrahlung (254 nm, RT, 2 h)	90	80	79	81	95	82	85
1.1 M Salzsäure (RT, 12 h)	98	98	99	99	98	78	98
0.5 M NaOH (RT, 12 h)	11	31	73	49	45	0	47

<sup>a</sup> relative Peakfläche von 100% bedeutet keine Zersetzung.

## 6. Phosphatbestimmung

In den Massenspektren der isolierten Viscotoxine **12**-**16** und **19** trat neben dem Molekülpeak noch eine Minderkomponente mit einer Massendifferenz von + 98 Da auf (siehe Kapitel A.III.3.1.3). Dieses Phänomen ist 1997 erstmals für Viscotoxine in der Literatur<sup>55</sup> beschrieben worden. Durch reduktive Carboxymethylierung und anschließende MS-Analytik konnte gezeigt werden, daß es sich um ein nicht-kovalent gebundenes Phosphataddukt handelt. Kristallisationsstudien von  $\alpha$ -<sup>113</sup> und  $\beta$ -Purothioninen<sup>114</sup> weisen ebenfalls auf die Anwesenheit eines Phosphatanions in der Thioninstruktur hin, jedoch klärt keine dieser Publikationen die Herkunft des Phosphations. Da bei den Aufarbeitungen der beschriebenen Mikroproteine Phosphatpuffer jeweils zugegen war, wurde das Phosphataddukt als Artefakt der Isolierung angesehen. Bei der Isolierungen der Viscotoxine in dieser Arbeit wurden keine phosphathaltigen Reagenzien verwendet, dennoch konnten Phosphataddukte von **12**, **13**, **14**, **15** und **16** sowohl durch MS-Analytik als auch durch zwei weitere unabhängige Experimente nachgewiesen werden.

### 6.1. Qualitative Phosphorbestimmung

Die Vermutung, daß es sich bei der oben beschriebenen Minderkomponente der Viscotoxine um deren Phosphataddukt handelt, konnte durch ein <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der Probe **12** bestätigt werden (siehe Abbildung 16). Es wurde ein Phosphorsignal bei  $\delta = 2.03$  ppm gefunden, das gegenüber dem externen Phosphorsäurestandard tieffeldverschoben und damit für ein gebundenes Phosphatanion typisch ist.

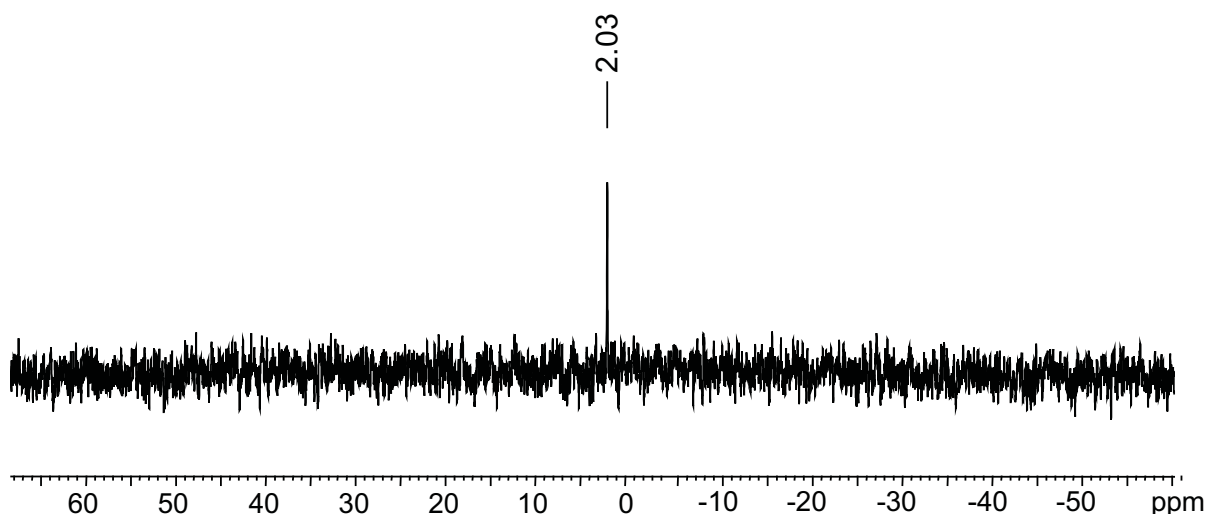


Abbildung 16: <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum von VT A1 (**12**).

## 6.2. Quantitative Photometrische Analyse

Da von den relativen Intensitäten der ESI-MS-Peaks nicht auf das Verhältnis Viscotoxin / Phosphataddukt geschlossen werden kann, wurde eine quantitative photometrische Analyse zur Bestimmung des Phosphorgehaltes in den Proben von VT A1 (**12**), VT A2 (**13**), VT A3 (**14**), VT B (**15**) und VT 1-PS (**16**) durchgeführt. Die Bestimmung basiert auf der Bildung eines Phosphormolybdänblau-Komplexes, dessen Farbintensität bei einer Wellenlänge von 715 nm mit einem Photometer gemessen wird.<sup>115</sup> Zu Beginn der Versuchsreihe wurde das unbehandelte Viscotoxinmolekül eingesetzt, jedoch schlug der Phosphatnachweis hier fehl. Eine Reduktion der Viscotoxine zur Freisetzung des gebundenen Phosphations kam nicht in Frage, da das Reduktionsmittel den Phosphornachweis erheblich stört. Die Mikroproteine wurden daher unter basischen Bedingungen hydrolysiert. Anschließend wurde die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert, mit Ascorbinsäure angesäuert und darauf mit dem Molybdat-Reagenz versetzt. Nach einer 15 minütigen Einwirkzeit wurden die Proben an einem kalibrierten Photometer vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 14 in Massenprozent Phosphor dargestellt. Ausgehend von den publizierten Sequenzen wurde für jedes Addukt der Gehalt an Phosphor in Massenprozent berechnet und damit der Anteil des Phosphataddukts an der jeweiligen Isoform erhalten.

**Tabelle 14:** Phosphatgehalt der einzelnen Viscotoxin-Proben sowie berechneter Adduktanteil.

Viscotoxin-Isoform	Phosphorgehalt (%)		Berechneter Adduktanteil
	gefunden	berechnet für Addukt	
A1 ( <b>12</b> )	0.03	0.62	5 %
A2 ( <b>13</b> )	0.03	0.63	5 %
A3 ( <b>14</b> )	0.03	0.63	5 %
B ( <b>15</b> )	0.02	0.63	3 %
1-PS ( <b>16</b> )	0.086 <sup>a</sup>	0.62	14 %

<sup>a</sup>nach Zentrifugation

VT A1 (**12**), VT A2 (**13**), VT A3 (**14**) und VT B (**15**) weisen einen nahezu identischen Phosphorgehalt von 0.02 - 0.03 % auf. VT 1-PS (**16**) dagegen weicht von diesen Ergebnissen stark ab und liegt bei 0.086 %. Für **19** konnte der Phosphorgehalt aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht bestimmt werden.

### 6.3. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Aufreinigung von **12** - **16** wurde kein phosphathaltiges Reagenz verwendet. Somit kann ein Artefakteinschluß dieses Ions aus Reagenzien ausgeschlossen werden, vielmehr muß das Phosphat pflanzlicher Herkunft sein. Die Tatsache, daß das Addukt trotz der Entsalzungsschritte bei der Aufreinigung erhalten wurde, sowie die Notwendigkeit der Denaturierung oder Hydrolyse des Peptids für den Nachweis des Phosphorgehaltes belegen die feste Einbindung des Phosphations in die Struktur der Viscotoxine. Ein molekulares Verständnis hierfür liefert die Röntgenstruktur von VT A3 (**14**), die eine positiv geladene Bindungstasche für Phosphationen erkennen läßt. (siehe Kapitel A.III.8.1.2)

Das untersuchte Phosphation liegt in einem sehr geringen Anteil in den Viscotoxin-Proben von **12**, **13**, **14** und **15** vor. Lediglich jedes zwanzigste Viscotoxinmolekül bildet ein Phosphataddukt. Viscotoxin 1-PS (**16**) enthielt dagegen mit 14 % einen etwa dreifach höheren Anteil an Phosphataddukt. Dies konnte schon an der intensiveren Blaufärbung nach Zugabe des Molybdat-Reagenzes zur Lösung von **16** erkannt werden. Gleichzeitig bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Unvollständige Abtrennung könnte durch Trübung der Lösung zu einem erhöhten Meßwert geführt haben.

Möglicherweise besitzt der Peptid-Phosphat-Komplex eine Bedeutung für die Cytotoxizität der Viscotoxine. Für Viscotoxin A3 ist eine Bindung an die Phospholipidgruppen von Modellmembranen und eine dadurch induzierte Membranpermeabilisierung beobachtet worden.<sup>109</sup> Damit könnte das gebundene Phosphation ein Hinweis auf eine aktive Bindungsstelle innerhalb des Viscotoxinmoleküls sein. Im Falle der Purothionine haben NMR-Studien belegt, daß unter Verwendung kleiner Phospholipidanaloga die anorganische Phosphatgruppe aus der Bindungsstelle verdrängt wird.<sup>113</sup>

## 7. Primärstrukturanalysen von Viscotoxin A3 (**14**) und Viscotoxin U-PS (**17**)

Die Kenntnis der Primärstruktur eines Peptids ist von essentieller Bedeutung. Die Aminosäuresequenz bildet die Grundlage für die Faltung und damit für die Sekundär- und Tertiärstruktur, und ist somit auch für die Funktion des Peptids verantwortlich.<sup>116</sup> Zur Aufklärung der Primärstruktur von Peptiden werden in der Regel der klassische

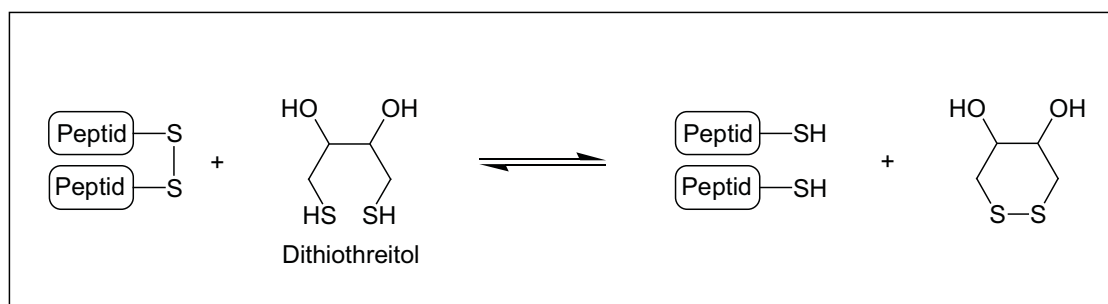


Abbau nach Edman und Tandem-Massenspektrometrie eingesetzt. Immer häufiger finden auch molekularbiologische Methoden wie die Erstellung von cDNA-Bibliotheken Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand der bekannten Verbindung VT A3 (**14**) die massenspektrometrische Peptidsequenzierung von Viscotoxinen optimiert werden, um im Anschluß daran die Primärstrukturanalyse des unbekanntes Viscotoxins U-PS (**17**) zu erleichtern. Das Konzept basiert darauf, daß nach Kenntnis des Peptid-„fingerprints“ eines bekannten Viscotoxins unbekanntes Viscotoxine anhand der konservierten Bereiche schneller zu erkennen sind und die Sequenzanalyse dieser Verbindungen weniger komplex ausfällt. Bei der Sequenzanalyse von **17** wurde neben Massenspektrometrie auch der Edman-Abbau eingesetzt.

## 7.1. Viscotoxin A3 (**14**)

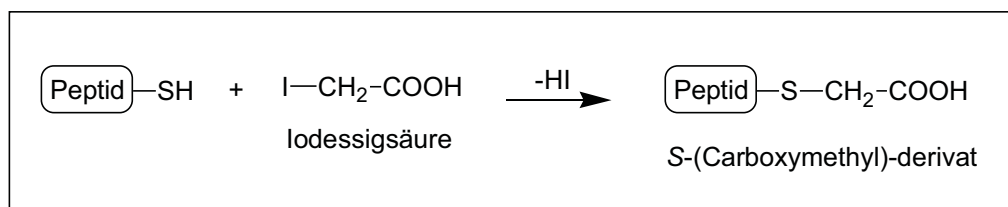
### 7.1.1. Reduktive Carboxymethylierung und tryptischer Verdau

Die massenspektrometrische Peptidsequenzierung von VT A3 (**14**) konnte wegen der Größe und der Stabilität des Moleküls nicht am nativen Peptid durchgeführt werden. Deshalb sollte das Mikroprotein zuvor einer enzymatischen Proteolyse unterzogen werden. Native Peptide und Proteine sind aufgrund ihrer kompakten Sekundär- und Tertiärstruktur häufig resistent gegen Proteasen jeglicher Art und Disulfidbrücken sind oft eine Ursache für diese Stabilität. Da von den Viscotoxinen bereits bekannt war, daß sie sich wegen ihrer drei Disulfidbrücken der enzymatischen Spaltung widersetzen, wurden diese Brücken in **14** reduktiv gespalten. Dithiothreitol (DTT) ist aufgrund seiner hohen Reaktivität gegenüber Cystin ein gängiges Reagenz für solche Spaltungen.



**Abbildung 17:** Reduktion von Disulfiden mit Dithiothreitol.

Nach Umsetzung von **14** in wäßriger Lösung konnte anschließend das reduzierte VT A3 (**14**) durch HPLC-MS nachgewiesen werden. Das UV-Chromatogramm zeigte einen Peak bei einer Retentionszeit von 15.7 min, dessen Massenspektrum (ESI), die für das reduzierte Mikroprotein erwartete Masse von 4835.4 Da lieferte. Um unerwünschte Rückfaltungen zu vermeiden, wurden die freien Thiolgruppen durch Alkylierung mit Iodessigsäure modifiziert und damit stabilisiert.

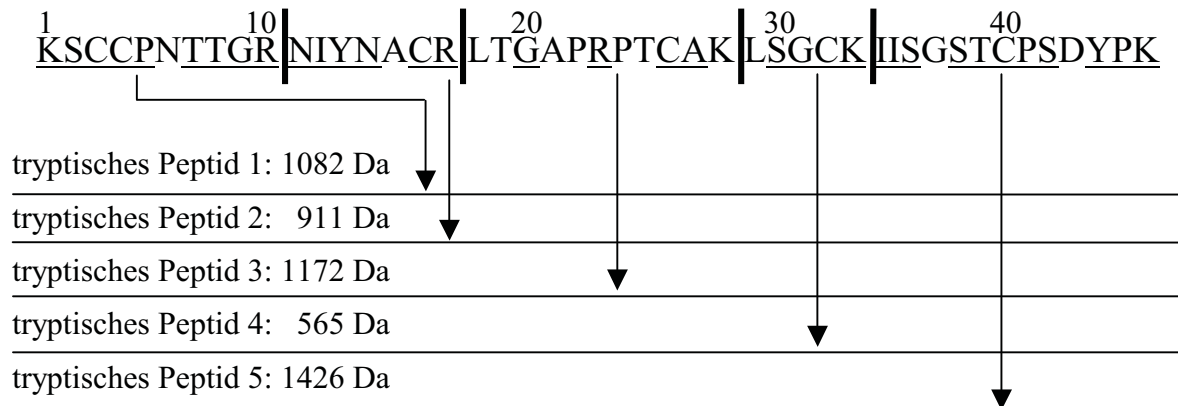


**Abbildung 18:** Carboxymethylierung von freien Thiolgruppen mit Iodessigsäure.

Das entstandene Produkt wurde ebenfalls durch HPLC-MS analysiert. Im UV-Chromatogramm wurde ein Peak bei einer Retentionszeit von 14.9 min beobachtet, dessen dazugehörige Masse von 5184.6 Da der sechsfach carboxymethylierten Form von reduziertem **14** entspricht. Das so vorbereitete VT A3 wurde anschließend im Verdauungsexperiment mit Trypsin eingesetzt. Da sowohl die enzymatische Spaltung von Peptiden als auch die nachfolgende massenspektrometrische Charakterisierung hohe Anforderungen an die Reinheit der Peptidsubstrate stellen, wurde das VT A3-Derivat vorher an der HPLC aufgereinigt.

Das Vorgehen bei der Fragmentierung eines Peptids hängt einerseits von der Zielsetzung ab, die mit der Fragmentierung erreicht werden soll, andererseits von den Informationen, die über das Peptid erhältlich sind. Im Fall von VT A3 waren für die massenspektrometrische Analyse möglichst kleine Peptidfragmente erwünscht. Betrachtet man die Aminosäuresequenz von **14** (Abbildung 19), fällt das häufige Vorkommen von Arginin und Lysin auf, was Trypsin als geeignetes Enzym erscheinen läßt. Auch sind in der Literatur tryptische Spaltungen von Viscotoxinen bereits beschrieben worden.<sup>55</sup> Trypsin ist eine gut charakterisierte Serinprotease mit einer hohen Spezifität für die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Das pH-Optimum der Endopeptidase liegt bei 8 - 9.<sup>94</sup> In Abbildung 19 sind die zu erwartenden Spaltstellen in **14** und die Molmassen der entstehenden tryptischen Peptide dargestellt. Da Trypsin eine Endopeptidase ist, sollte es zu keiner Abspaltung der Aminosäure Lys<sup>1</sup> kommen und folglich sollte die erste

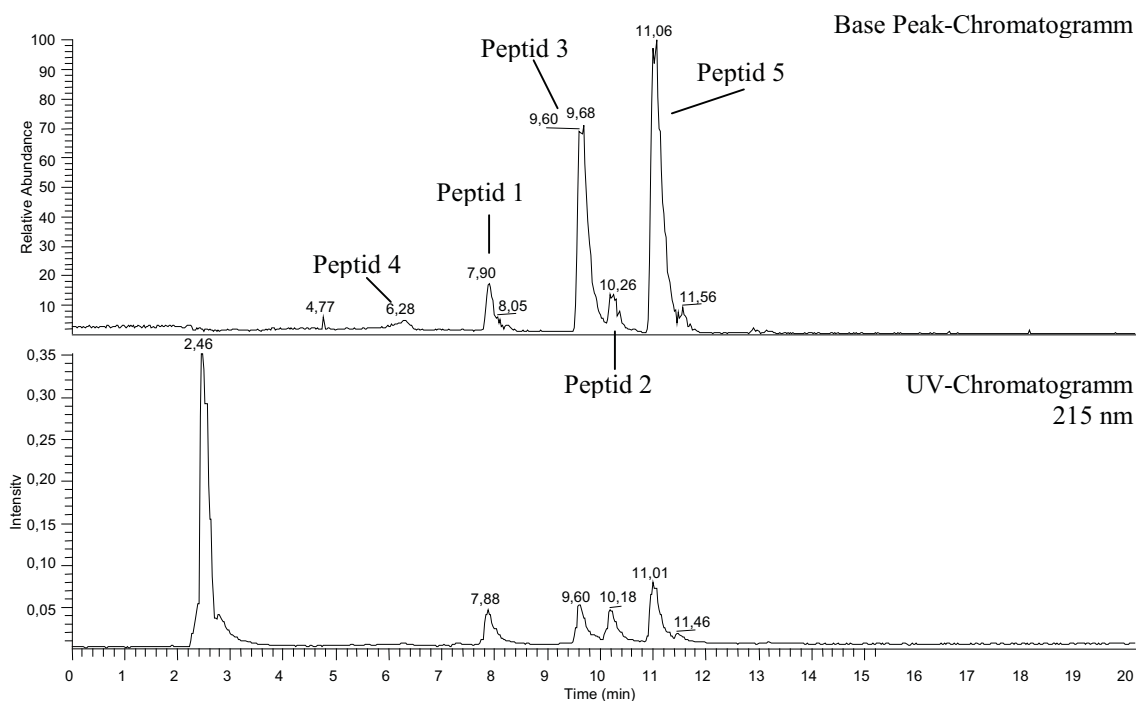
Spaltstelle nach Arg<sup>11</sup> auftreten. Eine Sonderstellung in einer Peptidstruktur nimmt Prolin ein, indem es als sekundäres Amin innerhalb von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern Abweichungen von der Idealkonformation induziert.<sup>116</sup> Diese Sonderstellung spiegelt sich auch im Spaltverhalten von Trypsin wieder. Befindet sich C-terminal von Arginin bzw. Lysin ein Prolin, kommt es zu keiner Spaltung durch die Serinprotease,<sup>117</sup> daher wird innerhalb von **14** keine Fragmentierung nach der Aminosäure Arg<sup>23</sup> erwartet.



**Abbildung 19:** Für **14** erwartete Spaltstellen und die Molekulargewichte der dazugehörigen tryptischen Peptide [M+H<sub>2</sub>O]. Konservierte Aminosäuren sind unterstrichen. Die Molmassen sind für carboxymethylierte Cysteine berechnet.

Viscotoxine sind in allen wässrigen Medien sehr gut löslich, daher wurde die tryptische Spaltung des VT A3-Derivates in Lösung vorgenommen. Die tryptischen Peptide wurden anschließend an der HPLC-ESI-MS analysiert. Im UV- und Total-Ionenstrom-Chromatogramm (TIC) konnten fünf tryptische Peptide nachgewiesen werden. Die MS<sup>1</sup>-Spektren dieser Fragmente zeigten die nach Abbildung 19 erwarteten Molmassen.

Das Spaltverhalten eines Peptids unter konstanten Bedingungen ist für jedes Peptid charakteristisch und sehr gut reproduzierbar. Die Auftrennung der tryptischen Peptide an der HPLC führte somit zu einem charakteristischen Peptidmuster („fingerprint“, „peptide map“) für **14** (Abbildung 20).



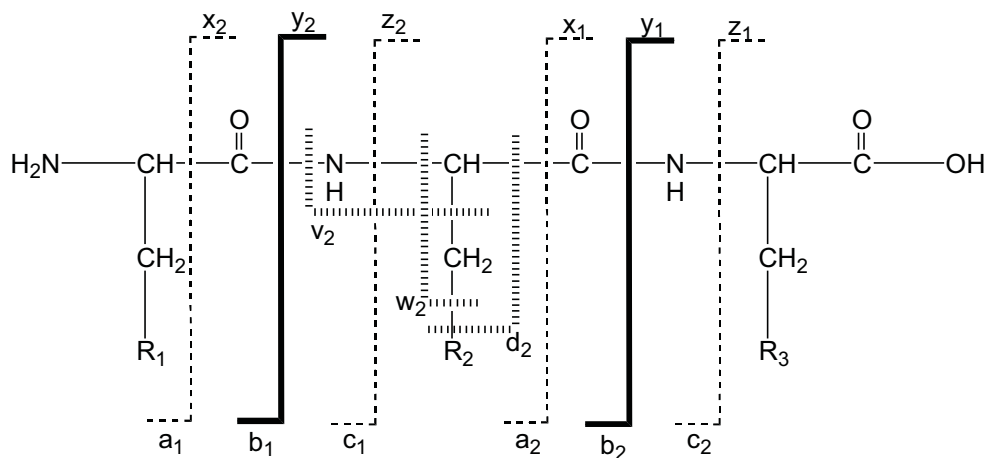
**Abbildung 20:** Fingerprint von VT A3 (**14**): Auftrennung und Massenanalyse.

### 7.1.2. Sequenzierung mit Tandem-Massenspektrometrie

Nach proteolytischer Spaltung von Polypeptiden und Proteinen kann ohne vorherige präparative Auftrennung des Spaltgemisches die Aminosäuresequenz kleiner Peptide durch kontrollierte Fragmentierung mit massenspektrometrischen Techniken wie CID (collision induced dissoziation) bestimmt werden. Die Tochterionen-Analyse ist in der Proteinchemie die am häufigsten verwendete MS/MS-Methode. Sie macht von der Möglichkeit Gebrauch, Muttermolekülonen zu fragmentieren und die Tochterionen anschließend zu analysieren. Der Verbleib der Ladung und die bevorzugte Fragmentierungsstelle sind von der Zusammensetzung und der Abfolge der einzelnen Aminosäuren eines Peptids abhängig. Das Fragmentierungsmuster ist somit eine individuelle Eigenschaft eines Peptids.

Für jedes tryptische Peptid von Viscotoxin A3 (siehe vorheriges Kapitel) wurde das intensivste Molekülon aus dem MS<sup>1</sup>-Experiment durch gezielte Anregung in seine Tochterionen aufgespalten (MS<sup>2</sup>-Experiment). Aus den daraus resultierenden CID-Spektren konnte die Sequenz der tryptischen Peptide bestimmt werden. Anhand der tryptischen Peptide 3 und 1 sollen die Aufklärung der Primärstruktur von Viscotoxin A3 (**14**) sowie einige Besonderheiten, die bei massenspektrometrischen

Sequenzanalysen hilfreich sind, erläutert werden. Die Ergebnisse für die Peptide 2, 4 und 5 sind dem experimentellen Teil zu entnehmen.

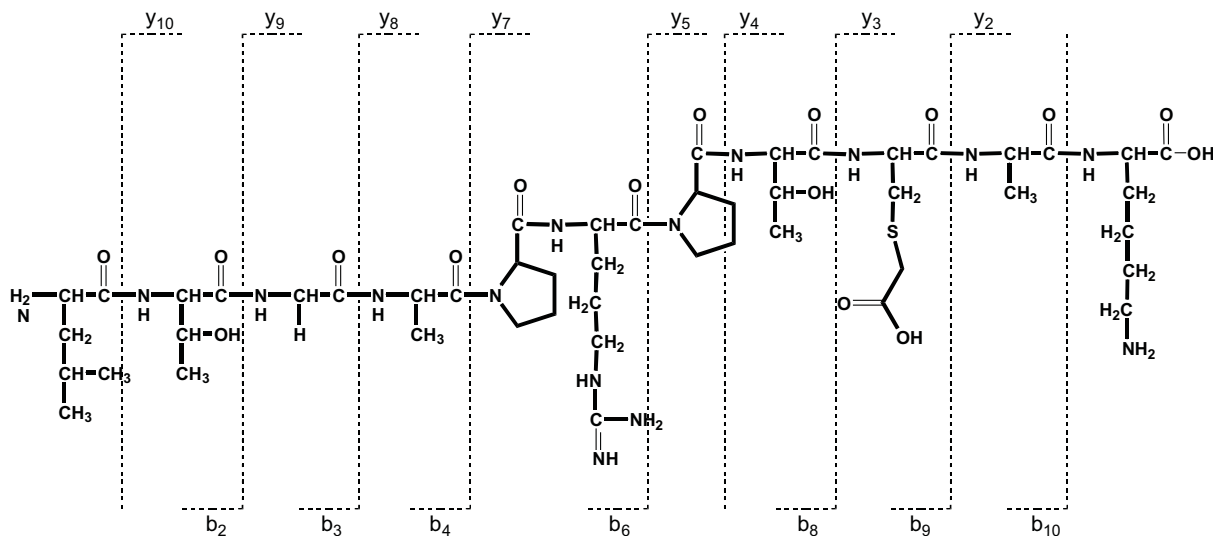


**Abbildung 21:** Nomenklatur der bei ESI-MS<sup>2</sup> auftretenden Peptidfragmente.

Bei einem MS<sup>2</sup>-Experiment können unterschiedliche Spaltungen entlang der Peptidbindungen auftreten, wie in Abbildung 21 veranschaulicht ist.<sup>118</sup> Verbleibt bei der Fragmentierung die Ladung an den Fragmenten der N-terminalen Serie, so werden die entsprechenden Fragmente je nach gespaltener Bindung mit a, b und c benannt, verbleibt die Ladung dagegen an den Fragmenten der C-terminalen Serie, werden sie mit x, y und z bezeichnet. Ein zusätzlicher tiefgestellter Index gibt die Zahl der in dem Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste an, daher läuft dieser Index für die a-, b- und c-Serie in umgekehrter Reihenfolge zu der x-, y- und z-Serie. Bei höheren Kollisionsenergien treten zusätzliche Fragmentationen (d, v und w) auf, die durch Fragmentierungen in der Seitenkette der Aminosäure gebildet werden. Ist der Bindungsbruch von einer Wasserstoffübertragung begleitet, so wird jedes übertragene H-Atom mit einem Strich symbolisiert, und zwar auf der linken Seite des Symbols für einen Verlust, auf der rechten Seite des Symbols für ein zusätzliches H-Atom. Ein y<sub>n</sub>"-Fragment ist daher ein y-Fragment, das zwei zusätzliche H-Atome trägt.

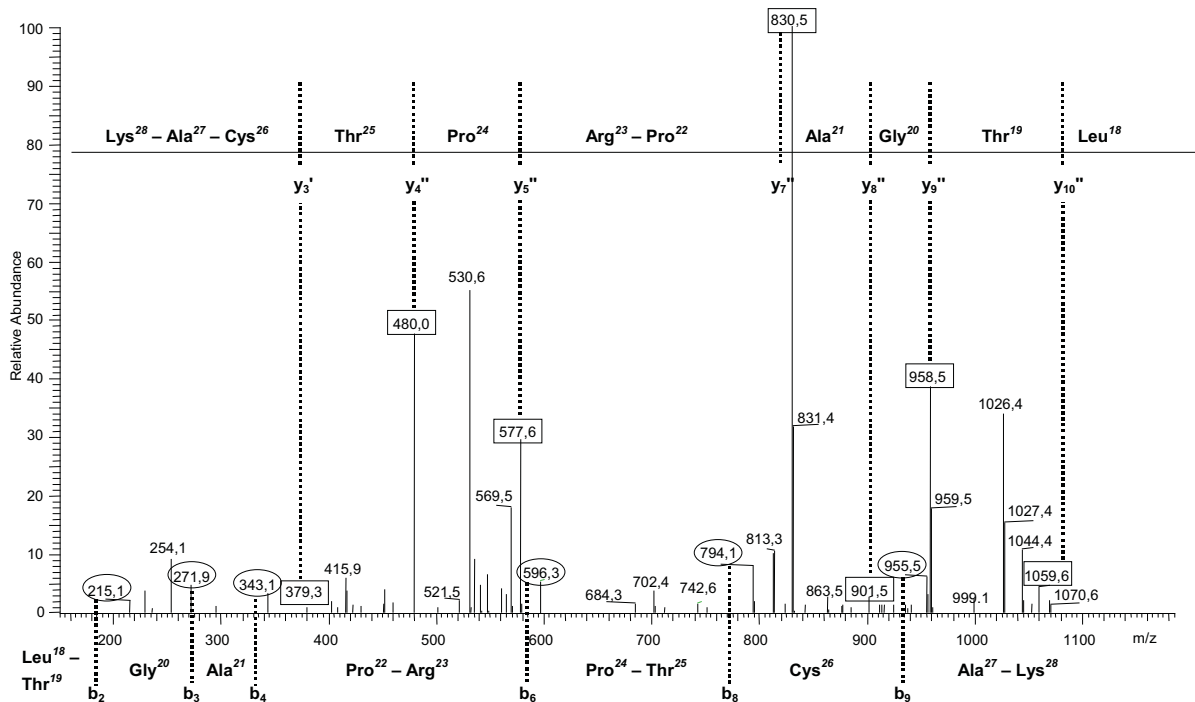
Das tryptische Peptid 3 (Leu<sup>18</sup> → Lys<sup>28</sup>, siehe Abbildung 22) zeigt im MS<sup>1</sup>-Massenspektrum ein [M+H]<sup>+</sup>-Ion von 1172.8 Da mit einer relativen Intensität von 15 % und das [M+2H]<sup>2+</sup>-Ion von 587.4 Da mit einer relativen Intensität von 100 %. Im MS<sup>2</sup>-Experiment wurde das [M+2H]<sup>2+</sup>-Ion von Peptid 3 durch gezielte Anregung zerstoßen und das in Abbildung 23 dargestellte positive Tochterionenspektrum erhalten. Aus dem doppelt geladenen Muttermolekül-Ion entstanden dabei vorwiegend einfach geladene Fragmente. Es wurden hauptsächlich Ionen der y- und b-Serie erhalten, d.h. nach der Kollisionsaktivierung waren die Peptide bevorzugt

zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidkette zerfallen (vgl. Abbildung 21).



**Abbildung 22:** Primärstruktur des tryptischen Fragments 3 (Leu<sup>18</sup> → Lys<sup>28</sup>).

Grundlage der Interpretation eines MS<sup>2</sup>-Spektrums ist die richtige Zuordnung der Fragment-Ionen zu den abc- oder zu den xyz-Serien. Behilflich sind dazu einige empirische Regeln. Massendifferenzen können erste Hinweise auf bestimmte Ionenserien bzw. auf spezifische Aminosäuren geben. Eine Massendifferenz von 28 Da weist zum Beispiel auf das Auftreten von a- und b-Serien hin. Weitere typische MS-Differenzen sind 18 Da, welche für eine Wasserabspaltung (symbolisiert durch einen hochgestellten Kreis, y<sub>n</sub><sup>°</sup>) bei Serin und Threonin spricht, und 17 Da, was auf die Abspaltung von Ammoniak (symbolisiert durch einen hochgestellten Stern, y<sub>n</sub><sup>\*</sup>) bei Arginin hindeutet. In einigen Fällen, so auch bei Fragment 3, zeigt schon das MS<sup>1</sup>-Spektrum das y<sub>n-1</sub>-Ion, 1059 Da (y<sub>10</sub>), was aufgrund der MS-Differenz von 113 Da zur Molekülmasse die Aminosäure Leu an Position 18 bestätigt. Wäre die Primärstruktur nicht bereits bekannt, käme auch Ile an Position 18 in Frage. Hier spiegelt sich ein Nachteil der MS/MS-Sequenzanalyse wider. Aminosäuren mit gleicher Molmasse können nicht unterschieden werden. Neben Leucin und Isoleucin trifft dies ebenso für die Unterscheidung der Aminosäuren Lysin und Glutamin (beide 146.2 Da) zu.

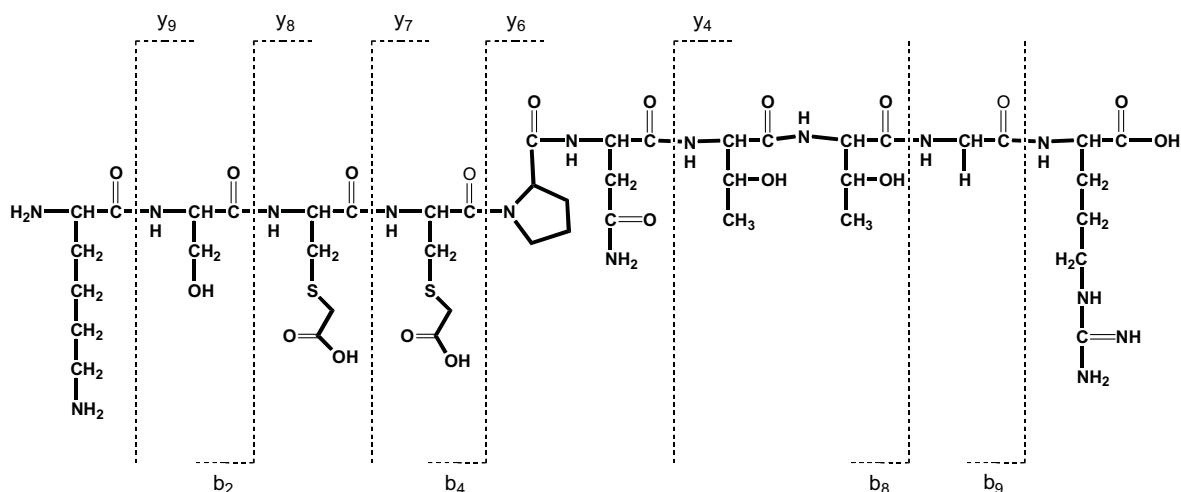


**Abbildung 23:** Positives Tochterionen-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions ( $m/z = 587.4$  Da) des Peptids 3 ( $\text{Leu}^{18} \rightarrow \text{Lys}^{28}$ ) mit den markierten Ionen der b- und y-Serie.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, treten bei der Fragmentierung von Fragment 3 durch die bevorzugte Anlagerung des Protons an basische Aminosäuren, hier  $\text{Arg}^{23}$  und  $\text{Lys}^{28}$ , fast ausschließlich C-terminale Fragmente (y-Serie) als intensivste Ionen auf, Ionen der b-Serie erweisen sich als weniger intensiv. Von der b- und y-Ionenserie konnte ein nahezu kompletter Satz von Fragmentationen beobachtet und deren MS-Differenzen den Aminosäuren zugeordnet werden. Daß die Fragmentationen  $b_5$  und  $y_6''$  nicht zu sehen sind, ist dadurch zu erklären, daß es bei Tandem-MS-Experimenten selten zu Spaltungen am C-terminalen Ende von Prolin kommt. Da jedoch die Ionen  $y_5''$  bei 577 Da und  $y_7''$  bei 830 Da vorhanden sind, kann anhand der MS-Differenz von 253 Da auf  $\text{Pro}^{22}$ - $\text{Arg}^{23}$  geschlossen werden. Weitere Dipeptidalternativen treten bei einer Masse von 253 Da nicht auf. Anders sieht es bei dem Fragmentation  $y_3''$  mit einer Masse von 379 Da aus. Dipeptidkombinationen (minus  $\text{H}_2\text{O}$ ) mit dieser Molmasse existieren nicht, somit muß es sich mindestens um ein Tripeptid handeln. Nach Spaltung mit Trypsin muß am C-terminalen Ende des tryptischen Peptids entweder die Aminosäure Lysin oder Arginin auftreten. Zur Bestimmung des Tripeptids wurden jeweils sowohl die Massen einer dieser beiden Aminosäurereste als auch die einer Hydroxylgruppe (17 Da, C-terminales Ende) und zweier Protonen von 379 Da subtrahiert und man erhielt eine Differenz von 232 Da nach Subtraktion von Lysin bzw. von 204 Da nach Abzug von Arginin. Als Dipeptid (minus  $\text{H}_2\text{O}$ ) mit einer

Molmasse von 204 Da kommen Gly-Phe oder Tyr-Cys in Betracht. Letzteres kann ausgeschlossen werden, da im vorliegenden Fall die Cysteine carboxymethyliert sind. Sowohl Cys-Glu als auch CMC-Ala besitzen als Dipeptide (minus H<sub>2</sub>O) eine Masse von 232 Da. Auch hier kann die erste Alternative aufgrund der Carboxymethylierung ausgeschlossen werden. Durch das Vorhandensein des b<sub>9</sub>-Ions bei m/z = 956 wird das Dipeptid (minus H<sub>2</sub>O) CMC-Ala und die Reihenfolge der beiden Aminosäuren bestätigt. Anhand der y-Ionenserie konnte die Sequenz H-Leu<sup>18</sup>-Thr<sup>19</sup>-Gly<sup>20</sup>-Ala<sup>21</sup>-Pro<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup>-Pro<sup>24</sup>-Thr<sup>25</sup>-Cys<sup>26</sup>-Xaa<sup>27</sup>-Xaa<sup>28</sup>-OH erhalten werden. Die Ionen der b-Serie ergaben die Aminosäuresequenz H-Leu<sup>18</sup>-Thr<sup>19</sup>-Gly<sup>20</sup>-Ala<sup>21</sup>-Pro<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup>-Pro<sup>24</sup>-Thr<sup>25</sup>-Cys<sup>26</sup>-Ala<sup>27</sup>-Lys<sup>28</sup>-OH, wobei für die kursiv gedruckten Dipeptide die Zuordnung nicht als gesichert gelten kann, da weitere Alternativen in Frage kommen. Die Masse des b<sub>2</sub>-Fragments von 215 Da spricht nach Subtraktion eines Protons der N-terminalen Seite neben Leu-Thr auch für die Dipeptide (minus H<sub>2</sub>O) Ile-Thr bzw. Val-Asp. Das b<sub>7</sub>-Ion konnte im MS<sup>2</sup>-Spektrum nicht detektiert werden. Die Differenz zwischen dem b<sub>6</sub>- und b<sub>8</sub>-Ion ergibt 198 Da, was neben dem Dipeptid Pro-Thr auch durch das Peptid Val-Val (jeweils minus H<sub>2</sub>O) erfüllt wird. Durch Kombination der Ergebnisse nach Auswertung der b- und y-Serie konnte somit die bekannte Primärstruktur des dritten tryptischen Peptids von **14** bestätigt werden.

Um spätere Vergleiche mit Viscotoxin U-PS zu ermöglichen, soll nun kurz auf das Fragmentierungsmuster des tryptischen Fragmentes 1 (Lys<sup>1</sup> → Arg<sup>10</sup>) eingegangen werden (siehe Abbildung 24).

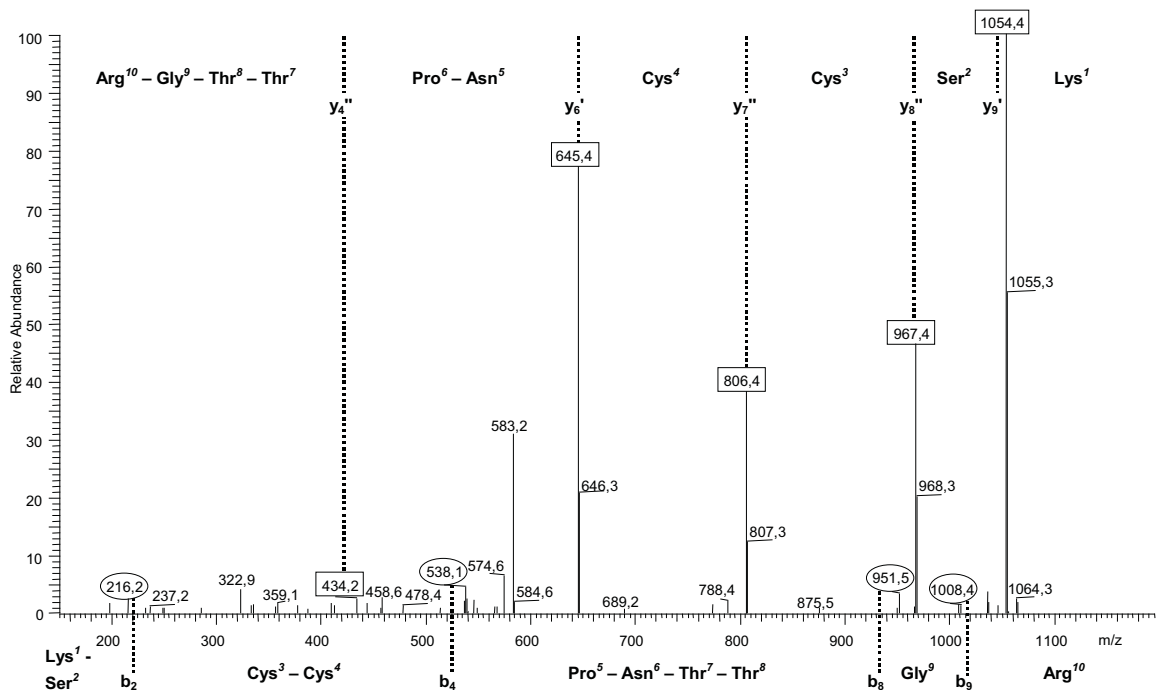


**Abbildung 24:** Primärstruktur des tryptischen Peptids 1 (Lys<sup>1</sup> → Arg<sup>10</sup>).

Das MS<sup>1</sup>-Spektrum zeigte ein [M+H]<sup>+</sup>-Ion bei 1182.6 Da und das [M+2H]<sup>2+</sup>-Ion bei 592.2 Da. Ebenfalls konnte im full-scan-MS<sup>1</sup>-Spektrum das y<sub>9</sub>-Ion bei einer Masse



von 1054.5 Da beobachtet werden, was auf Lysin oder Glutamin an 1-Position hinweist. Im MS<sup>2</sup>-Experiment wurde das zweifach geladene Ion zerstoßen und man erhielt im Tochterionen-Spektrum (siehe Abbildung 25) wiederum überwiegend einfach geladene Ionen. Neben einigen Vertretern der x- Serie konnten hauptsächlich b- und y-Serien nachgewiesen werden. Die Ionen der y-Serie waren auch hier die intensivsten, da nach Zerfall der Molekül-Ionen die Ladung bevorzugt am Arginin verbleibt, welches am C-terminalen Ende der Sequenz sitzt. Das Spektrum zeigte Massen für die y-Ionen y<sub>4</sub><sup>+</sup> (434.2 Da), y<sub>6</sub><sup>+</sup> (645.4 Da), y<sub>7</sub><sup>+</sup> (806.4 Da), y<sub>8</sub><sup>+</sup> (967.4 Da) und y<sub>9</sub><sup>+</sup> (1054.4 Da). Das y<sub>5</sub><sup>+</sup>-Ion konnte durch die Differenz von y<sub>4</sub><sup>+</sup> und y<sub>6</sub><sup>+</sup> ermittelt werden, da die erhaltene Masse von Δ 211 Da nur vom Dipeptid Pro-Asn (minus H<sub>2</sub>O) erfüllt wird. Die Tatsache, daß die Aminosäure Prolin selten am C-terminalen Ende durch MS/MS fragmentiert wird, läßt auf die oben genannte Reihenfolge der beiden Aminosäuren schließen. Letztendlich ließ sich die Sequenz H-Lys<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>4</sup>-Pro<sup>5</sup>-Asn<sup>6</sup>-Xaa<sup>7</sup>-Xaa<sup>8</sup>-Xaa<sup>9</sup>-Xaa<sup>10</sup>-OH aus der y-Ionenserie ableiten, die Aminosäuren 7 bis 10 konnten aus den y-Fragmentionen nicht ermittelt werden. Aus der b-Reihe wurden im MS<sup>2</sup>-Spektrum b<sub>2</sub> (216.2 Da), b<sub>4</sub> (538.1 da), b<sub>8</sub> (951.5 Da) und b<sub>9</sub> (1008.4 Da) erhalten. In Verbindung mit den Resultaten aus der y-Serie konnte die komplette Primärstruktur des tryptischen Peptids 1 abgeleitet und bestätigt werden.



**Abbildung 25:** Positives Tochterionen-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions ( $m/z = 592.2$  Da) des Peptids 1 (Lys<sup>1</sup> → Arg<sup>10</sup>) mit den markierten Ionen der b- und y-Serie.

Das Peptid 1 besteht mit Ausnahme der Aminosäure Asn<sup>6</sup> nur aus konservierten Aminosäuren. Diese Tatsache kann eine Hilfe bei weiteren Sequenzanalysen unbekannter Viscotoxine sein. Unter der Annahme, daß an Position 6 des Viscotoxins U-PS (**17**) weder Arginin noch Lysin gebunden sind, muß durch tryptischen Verdau ein Fragment erhalten werden, das eine Masse im MS<sup>1</sup>-Spektrum aufweist, die sich aus dem Molekulargewicht des Peptids 1 (1183 Da) abzüglich der Molmasse von Asparagin plus der Masse der unbekanntes Aminosäure an 6-Position berechnet. Ferner müßten im Tochterionen-Spektrum der unbekanntes tryptischen Peptide von **17** einige Ionen der b- und y-Serie von Viscotoxin A3 / Peptid 3 nachzuweisen sein. Aufgrund der Konserviertheit der Aminosäuren Lys<sup>1</sup> bis Pro<sup>5</sup> innerhalb der Sequenz, müßten die Ionen b<sub>2</sub> (216 Da), b<sub>3</sub> (377 Da) und b<sub>4</sub> (539 Da) im MS-Spektrum beobachtbar sein, sowie angesichts der konservierten Aminosäuren Thr<sup>7</sup> → Arg<sup>10</sup> die Ionen y<sub>2</sub>" (232 Da), y<sub>3</sub>" (333 Da) und y<sub>4</sub>" (435 Da). Genauso wie Peptid 1 bestehen die tryptischen Peptide 2, 4 und 5 von Viscotoxin A3 überwiegend aus konservierten Bereichen, hier kann es ebenfalls nur zu einer Variation von 1 bis 2 Aminosäuren kommen, wie in Abbildung 19 zu sehen ist. Die Kenntnis der „peptide map“ und des enzymatischen Fragmentierungsmusters von Viscotoxin A3 (**14**) sollte die Primärstrukturaufklärung des unbekanntes Viscotoxins U-PS (**17**) damit erheblich vereinfachen.

## 7.2. Viscotoxin U-PS (**17**)

### 7.2.1. N-terminale Sequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau

Der erste Ansatz, der zur Bestimmung der Primärstruktur von Viscotoxin U-PS (**17**) verfolgt wurde, war eine Sequenzierung durch Edman-Abbau.<sup>119</sup> Dieser beginnt N-terminal und erfolgt in einem automatischen Proteinsequenzer mit einem Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäureanalysator.<sup>IX</sup> Letzterer identifiziert die PTH-Aminosäuren chromatographisch durch einen Retentionszeitvergleich mit den PTH-Derivaten aller proteinogenen Aminosäuren. Entscheidend für die Anzahl der möglichen Abbauschritte ist die maximal erreichbare Ausbeute (repetitive Ausbeute) pro Schritt. Die Gesamtausbeute nimmt progressiv mit fortschreitendem Abbau ab, und wenn die Menge der neu abgebauten Aminosäure unter 15 % der eingesetzten Peptidmenge liegt, kann die Sequenz nicht mehr entschlüsselt werden.<sup>94</sup> Erst durch die

---

<sup>IX</sup> Für die Durchführung und Auswertung der N-terminalen Sequenzierung danke ich Herrn Dr. Bernhard Schmidt, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen.

Automatisierung des Edman-Abbaus wurden repetitive Ausbeuten von über 90 % ermöglicht, was zu durchschnittlich erreichbaren Sequenzlängen von 20 - 40 Aminosäuren führt.

Durch Einsatz von 50 – 100 pmol des HPLC-aufgereinigten und reduzierten Peptids **17** konnten mit diesem Verfahren die ersten 32 N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden, was einer repetitiven Ausbeute von über 94 % entspricht. Die erhaltene Sequenz ist in Abbildung 26 gezeigt. Bei den kursiv gedruckten Aminosäureresten der Primärstruktur ist die Zuordnung der jeweiligen Aminosäure nicht eindeutig gesichert. Cysteine können ohne vorherige Derivatisierung nicht in den PTH-Chromatogrammen nachgewiesen werden und wurden somit den Positionen zugeordnet, für die kein PTH-Aminosäuresignal im PTH-Chromatogramm erkennbar war. Für die restlichen kursiv gedruckten Aminosäuren war die Zuordnung der Signale aus dem PTH-Chromatogramm schwierig, so daß für diese Positionen eine gewisse Unsicherheit bleibt.



**Abbildung 26:** Durch Edman-Abbau ermittelte N-terminale Teilsequenz (32 Aminosäuren,  $m/z = 3307$  Da) von **17**.

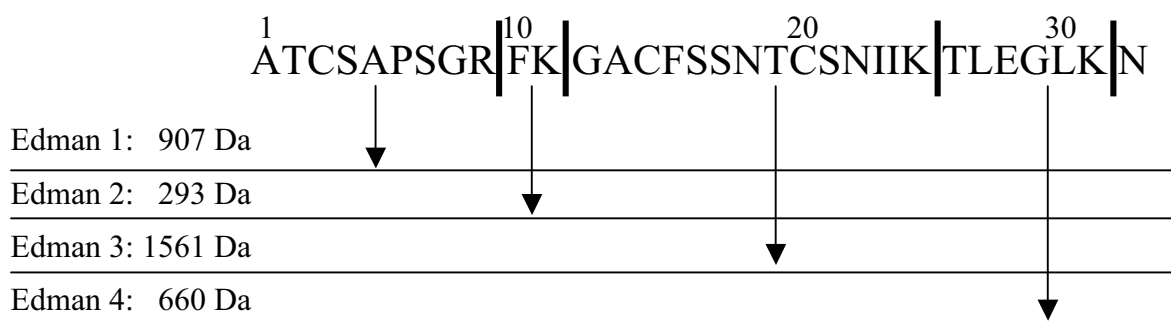
Vergleicht man die erhaltene Primärstruktur von VT U-PS (**17**) mit den Primärstrukturen der bereits beschriebenen Viscotoxine,<sup>28,55-57</sup> findet man keine Übereinstimmung zu deren konservierten Aminosäuren. Während alle Viscotoxinprimärstrukturen N-terminal mit den fünf Aminosäuren Lys<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>4</sup>-Pro<sup>5</sup> beginnen, weist **17** an dieser Stelle die Aminosäuresequenz Ala<sup>1</sup>-Thr<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup> auf, und zeigt damit keinerlei Ähnlichkeit zu den Viscotoxinen. Weiterhin besitzen Viscotoxine in den Positionen 3, 4, 16, 26, 32 und 40 jeweils die Aminosäure Cystein, wohingegen bei VT U-PS (**17**) Cysteine in den Positionen 3, 14 und 20 gefunden wurden. Es muß also davon ausgegangen werden, daß es sich bei **17** um kein zu der Viscotoxin-Familie gehöriges Mikroprotein handelt, und die Bezeichnung Viscotoxin für das Peptid **17** in der Literatur zu Unrecht verwendet wird. Folglich ist auch nicht gesichert, daß **17** aus 46 Aminosäuren besteht. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur Identifizierung der nicht bestimmten C-terminalen Sequenz von **17** wurden ESI-Tandem-MS-Experimente durchgeführt, die im nächsten Unterkapitel besprochen werden.

### 7.2.2. Reduktive Carboxymethylierung und tryptischer Verdau

U-PS (**17**) wurde analog zu **14** vor der Durchführung einer Tandem-MS-Analyse mit Dithiothreitol reduziert, mit Iodessigsäure carboxymethyliert und anschließend tryptisch fragmentiert. Die LC-MS-Bestimmung der reduzierten Verbindung zeigte im positiven Total-Ionenstrom-Chromatogramm einen Peak bei einer Retentionszeit von 19.7 min und mit einer Masse von 4767.4 Da gegenüber 4760 Da für **17**, was auf die Spaltung von 3 bis 4 Disulfidbrücken bzw. auf eine Anlagerung von 7 bis 8 Protonen hinweist. Diese Beobachtung konnte durch die Massenbestimmung der reaktiv carboxymethylierten Verbindung präzisiert werden. Es wurden 8 freie Thiolgruppen durch die Reaktion mit Iodessigsäure besetzt, was aus der Differenz von 472 Da ( $8 \times 59$  Da) zur Masse der nativen Verbindung **17** ersichtlich ist.

Die enzymatische Fragmentierung der derivatisierten und HPLC-aufgereinigten Probe ergab fünf tryptische Peptide (A - E), für die im MS<sup>1</sup>-Experiment folgende Massen nachgewiesen wurden: Peptid A 907.4 Da, Peptid B 660.3 Da, Peptid C 1608.5 Da, Peptid D 2361.9 Da und Peptid E 1957.6 Da. Die Summe der Fragmentmassen ergab deutlich mehr als die Molmasse der carboxymethylierten Verbindung (5232.6 Da). Dies deutet darauf hin, daß die enzymatische Fragmentierung nicht homogen abgelaufen war.

Ein Vergleich mit den berechneten Molmassen der formal tryptisch gespaltenen Peptide aus der durch Edman-Abbau ermittelten Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 27) zeigt Übereinstimmung zwischen Peptid A und Edman 1 ( $\text{Ala}^1 \rightarrow \text{Arg}^9$ ) und zwischen Peptid B und Edman 4 ( $\text{Thr}^{26} \rightarrow \text{Lys}^{31}$ ).



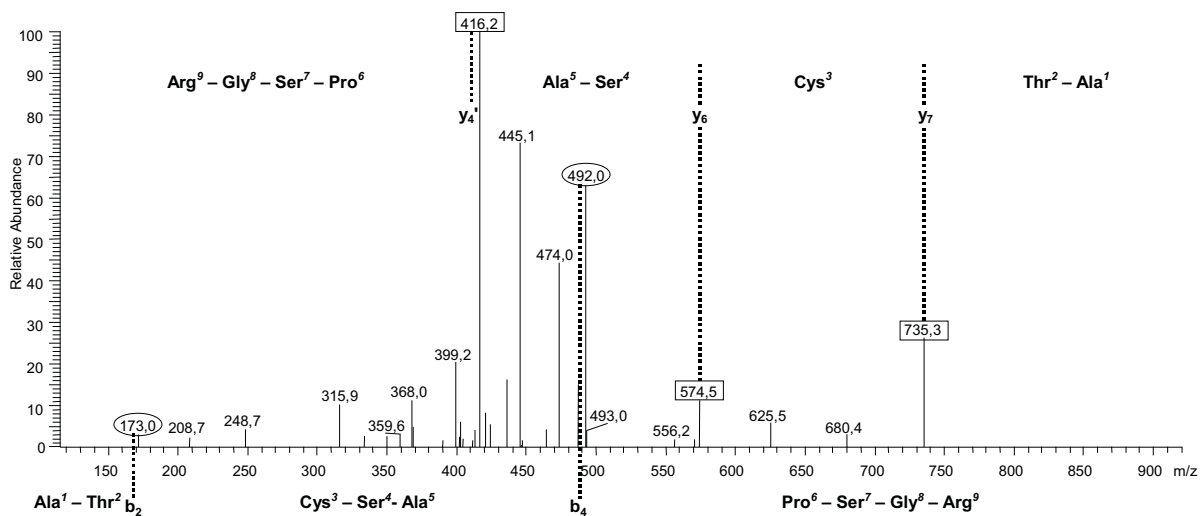
**Abbildung 27:** Berechnete Molmassen der tryptischen Peptide aus der durch Edman-Abbau ermittelten Aminosäuresequenz von **17**.

Für die Peptide C - E wurden keine passenden Fragmente in der Edman-Sequenz gefunden. Näheren Aufschluß über diese Diskrepanzen sollte das anschließende MS<sup>2</sup>-Experiment liefern.

### 7.2.3. ESI-MS/MS-Analyse

In den MS<sup>2</sup>-Experimenten wurden die intensivsten Ionen der Fragmente A - E aus der MS<sup>1</sup>-Analyse zerstoßen. Mit zunehmender Molmasse der zu fragmentierenden Peptide ( $\geq 2$  kDa) erhält man in solchen MS<sup>2</sup>-Experimenten über Kollisionsaktivierung immer weniger struktursignifikante Fragmentationen. Dies ist wahrscheinlich auf intramolekulare Wechselwirkungen zurückzuführen, die zur Ausbildung kompakterer Konformationen beitragen und somit das Molekül stabilisieren. Für alle tryptischen Peptide wurden CID-Spektren erhalten, wobei die Spektren für die Peptide D und E wahrscheinlich aufgrund der Größe keine aussagekräftigen Fragmentierungsmuster aufwiesen. Somit war es nicht möglich, den tryptischen Peptiden D und E eine Aminosäuresequenz zuzuordnen.

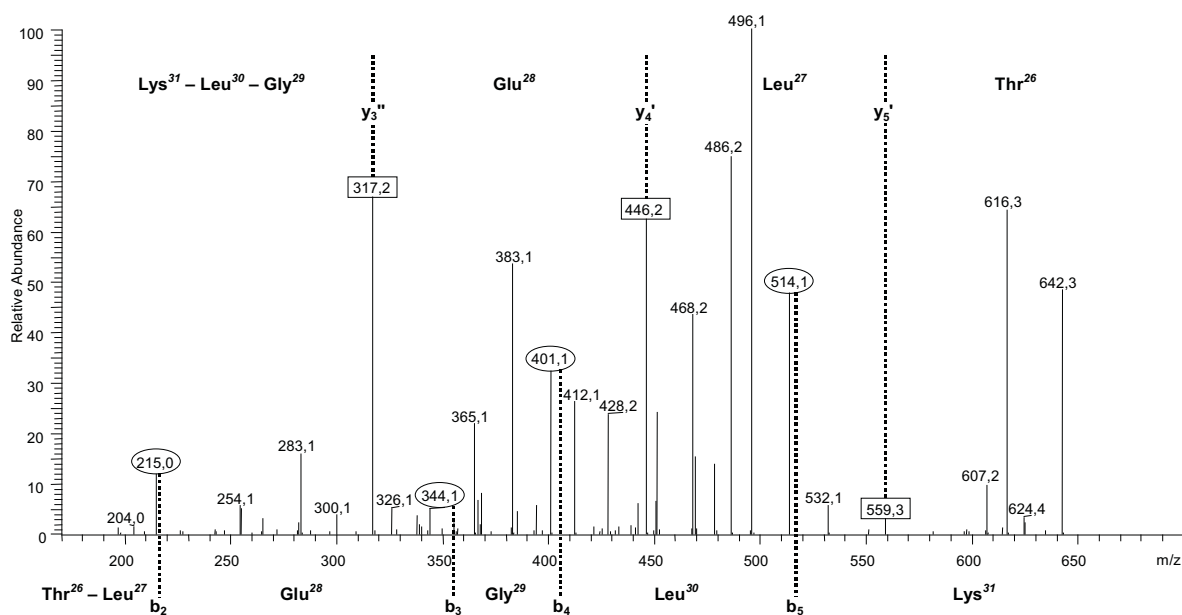
Das Peptid A zeigte in der MS<sup>1</sup>-Analyse neben einem  $[M+H]^+$ -Ion (907.4 Da) und einem  $[M+2H]^{2+}$ -Ion (454.2 Da) ein einfach geladenes Signal bei  $m/z = 735$  Da im full-scan-Spektrum, das als das  $y_7$ -Ion identifiziert werden konnte. Die Massendifferenz zur Gesamtmasse beträgt 173, wofür ausschließlich die Dipeptidkombination Alanin und Threonin am C-terminalen Ende in Frage kommt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Primärstruktur von Edman 1 und bekräftigt die ungenaue Zuordnung von Alanin an Position 1 der Primärstruktur von U-PS (**17**). Das positive Tochterionen-Spektrum (siehe Abbildung 28) zeigte nach Aktivierung des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions weder einen vollständigen Satz an Fragmentationen der y-Serie noch der b-Serie.



**Abbildung 28:** Positives Tochterionen-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions ( $m/z = 454.2$  Da) des Peptids A ( $Ala^1 \rightarrow Arg^9$ ) mit den markierten Ionen der b- und y-Serie.

Neben dem  $y_7$ -Ion waren innerhalb dieser Serie noch die Fragmente  $y_6'$  bei  $m/z = 574.5$  Da und  $y_4'$  bei  $m/z = 416.2$  Da beobachtbar. Das  $y_6'$ -Fragment liefert in Übereinstimmung mit Edman 1 die dritte C-terminale Aminosäure, ein carboxymethyliertes Cystein. Das  $y_7$ -Ion bestätigt die Aminosäurereste Serin und Alanin in Position 4 und 5 in der durch Edman-Chemie ermittelten Aminosäuresequenz. Aufschluß über das C-terminale Ende konnte aus der  $MS^2$ -Studie nicht erhalten werden, da weder  $y$ -Ionen im unteren noch  $b$ -Ionen im oberen Massenbereich nachweisbar waren. Aufgrund der Übereinstimmung sowohl der Molmassen als auch der ersten fünf C-terminalen Aminosäuren von Edman 1 und Peptid A wird die Sequenz H-Ala<sup>1</sup>-Thr<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>-OH als gesichert angesehen.

Im  $MS^1$ -Spektrum zeigte das tryptische Peptid B ein  $[M+H]^+$ -Ion von 660.3 Da, welches in einer  $MS/MS$ -Analyse angeregt wurde. Mit Ausnahme des  $b_1$ -Ions wurde ein vollständiger Satz an  $b$ -Fragmentionen erhalten (siehe Abbildung 29).

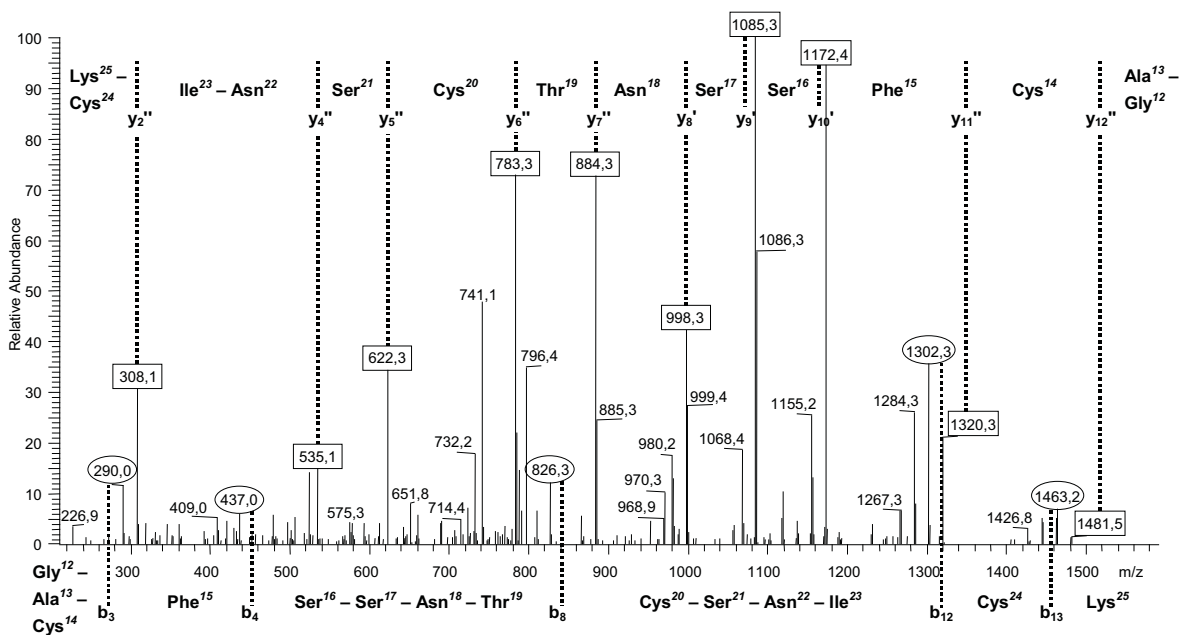


**Abbildung 29:** Positives Tochterionen-Spektrum des  $[M+H]^+$ -Ions ( $m/z = 660.3$  Da) des Peptids B (Thr<sup>26</sup> → Lys<sup>31</sup>) mit den markierten Ionen der  $b$ - und  $y$ -Serie.

Durch Auswertung dieser Ionenserie konnte die Aminosäuresequenz H-Thr<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>-Glu<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>-Leu<sup>30</sup>-Lys<sup>31</sup>-OH abgeleitet und damit die Primärstruktur von Edman 4 bestätigt werden. Die Zuordnung wurde zudem durch das Auftreten der  $y_5'$ -,  $y_4'$ - und  $y_3$ -Ionen im positiven CID-Spektrum bekräftigt, welche die Sequenz H-Thr<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>-

Glu<sup>28</sup>-OH widerspiegeln. Daneben weist das Fragmentation bei  $m/z = 614.3$  Da durch eine Massendifferenz von 44 zu dem  $[M+H]^+$ -Ion auf das Auftreten einer Carbonsäure innerhalb der Sequenz hin, was durch die Zuordnung Glu<sup>28</sup> erfüllt wird.

Für das tryptische Peptid C wurde im positiv-Ionen-MS<sup>1</sup>-Spektrum das  $[M+H]^+$ -Ion bei  $m/z = 1608.5$  Da gefunden, was anhand der Masse keine Zuordnung zu einem formellen Fragment der Edman-Primärstruktur erlaubte. Die MS<sup>2</sup>-Studie nach Anregung des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions (805.3 Da) ergab das in Abbildung 30 dargestellte positive Tochterionen-Spektrum, mit einem fast vollständigen Satz an y-Fragmentationen und einer geringen Anzahl an Ionen der b-Serie.



**Abbildung 30:** Positives Tochterionen-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions ( $m/z = 805.3$  Da) des Peptids C (Gly<sup>12</sup> → Lys<sup>25</sup>) mit den markierten Ionen der b- und y-Serie.

Das Fragment mit  $m/z = 1481.5$  Da erwies sich als das  $y_{12}''$ -Ion und lieferte mehrere mögliche Aminosäurereste für das N-terminale Ende. Die Massendifferenz (128 Da) zum  $[M+H]^+$ -Ion bei  $m/z = 1608.5$  Da kann durch Abspaltung von Lysin, Glutamin oder des Dipeptids Gly-Ala (minus H<sub>2</sub>O) erklärt werden. Eine Serie an Fragmentationen, die der y-Ionenserie ( $y_{12}''$ - $y_4'$ ) zugeordnet werden konnte, liefert die Teilsequenz Cys-Phe-Ser-Ser-Asn-Thr-Cys-Ser, welche mit Abschnitt Cys<sup>14</sup> → Ser<sup>21</sup> des Fragments Edman 3 übereinstimmt. Die im unteren Bereich auftretenden Ionen  $b_3$  und  $b_4$  unterstützen Teile dieser Sequenzinterpretation. Der Massenabstand zwischen dem  $y_4'$ -Ion bei  $m/z = 535.1$  Da und dem  $y_2''$ -Ion bei  $m/z = 308.1$  Da kann nur durch vier

Dipeptidkombinationen erklärt werden, nämlich durch Val + Gln/Lys oder Asn + Ile/Leu. Unter der Annahme, daß es sich bei diesem tryptischen Peptid um das Fragment Edman 3 handelt und daß sich die beiden Aminosäuren Asparagin und Isoleucin durch den Edman-Abbau eindeutig den Positionen 22 bzw. 23 zuweisen lassen, wurde die Dipeptidkombination Asn-Ile als bestätigt angesehen.

Anhand des  $y_2$ "-Ions bei  $m/z = 308.1$  Da konnten die letzten beiden C-terminalen Aminosäurereste der Primärstruktur von Peptid C ermittelt und dadurch die Diskrepanz zwischen dessen Molmasse (1608.5 Da) und dem des Edman 3 (1561 Da) geklärt werden: die Masse von 308.1 Da läßt sich nicht mit den im Edman-Abbau bestimmten Aminosäureresten Isoleucin und Lysin in Einklang bringen. Da Lysin im PTH-Chromatogramm eindeutig zugeordnet werden konnte, Isoleucin jedoch nicht zweifelsfrei, wurde ersteres als gesichert angenommen. Aus der Massendifferenz wurde geschlossen, daß es sich bei der fraglichen Aminosäure um ein carboxymethyliertes Cys<sup>24</sup> handelt. Die im oberen Massenbereich auftretenden Ionen  $b_{12}$  (1302.2 Da) und  $b_{13}$  (1463.2 Da) zeigen ebenfalls eindeutig, daß in Position 24 der vollständigen Edman-Sequenz ein Cystein-Rest lokalisiert ist. Mit der Zuordnung von Peptid C zum Edman 3-Fragment läßt sich auch die oben beschriebene Mehrdeutigkeit bei der Aufklärung des N-terminalen Endes klären, das durch den Edman-Abbau als Gly<sup>12</sup> – Ala<sup>13</sup> identifiziert worden war.

Durch die ESI-MS/MS-Studien an **17** konnten 30 der 32 N-terminalen Aminosäuren bestätigt und die Aminosäure an Position 24 korrigiert werden. Die im Edman-Abbau nachgewiesene Aminosäure Asparagin an Position 32 sowie das Edman 2-Fragment (Phe<sup>10</sup> – Lys<sup>11</sup>) wurden im Tandem-MS-Experiment nicht identifiziert. Ebenfalls konnte die Primärstruktur der tryptischen Peptide D und E aufgrund der Größe dieser Fragmente durch Massenspektrometrie nicht geklärt werden. Aus diesen Befunden ergibt sich schließlich die in Abbildung 31 dargestellte Teilprimärstruktur von **17**.



**Abbildung 31:** Endgültige Teilprimärstruktur (Ala<sup>1</sup> → Asn<sup>32</sup>) von **17**. Die kursiven Positionen wurden nur nach Edman bestimmt.



Obwohl die vollständige Primärstruktur von **17** nicht aufgeklärt wurde, kann aufgrund der schon angeführten Argumente zweifelsfrei gesagt werden, daß die Verbindung **17** weder zur Klasse der Viscotoxine noch zur Familie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thionine gehört und somit in bisherigen Publikationen falsch klassifiziert wurde.

Ein weiteres Indiz dafür, daß U-PS (**17**) strukturell von der Klasse der Viscotoxine abweicht und damit die aus dem Edman-Abbau und den Tandem-MS-Studien gewonnenen Zweifel an der bisherigen Einordnung erhärtet, war die experimentell beobachtete Trypsinlabilität von **17**. Von Viscotoxinen ist bekannt, daß sie aufgrund ihrer Stabilität im nativen Zustand nicht von Trypsin gespalten werden.<sup>120</sup> In einem tryptischen Verdauungsexperiment an nativem U-PS (**17**) konnten jedoch mehrere Spaltprodukte neben dem Edukt nachgewiesen werden, während aus einer parallel durchgeführten Kontrollreaktion mit nativem VT A3 (**14**) wie erwartet nur unzersetztes Peptid hervorging.

#### 7.2.4. Datenbank-Recherche

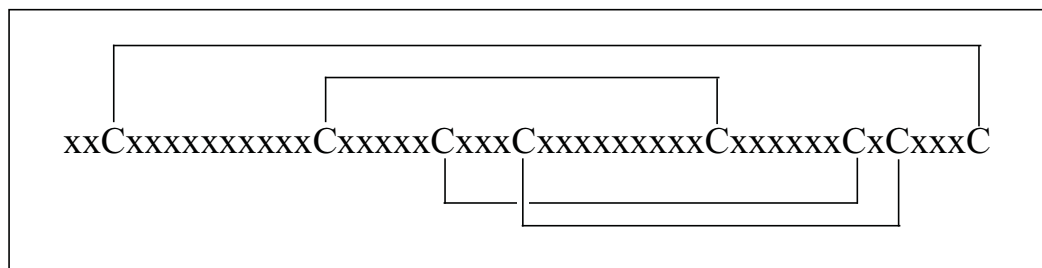
Eine Datenbank-Recherche<sup>121</sup> mit den durch Edman-Abbau und Massenspektrometrie bestimmten Sequenzdaten ergab, daß U-PS (**17**) zur Familie der  $\gamma$ -Thionine gehört. Die Teilsequenz von **17** zeigt Homologien (bis zu 70 %) zu Primärstrukturen von verschiedenen  $\gamma$ -Thionin-Vorläufern aus höheren Pflanzen. Als Beispiel ist der Vergleich mit einem solchen Vorläufer aus der norwegischen Fichte *Picea abies* aufgeführt.

Teilsequenz von U-PS ( <b>17</b> )	
1	T C S A P S G R F K G A C F S S N T C S N I C K T L E G 28
	T C P S G F K G C S S N C N C T E G
35	T C K T P S G K F K G V C A S S N N C K N V C Q T - E G 61
Teilsequenz eines $\gamma$ -Thionin-Precursors aus der Fichte <i>Picea abies</i>	

**Abbildung 32:** Vergleich von Teilsequenzen aus **17** und einem  $\gamma$ -Thionin-Precursor – im untersuchten Bereich stimmen alle konservierten Cys-Positionen überein.

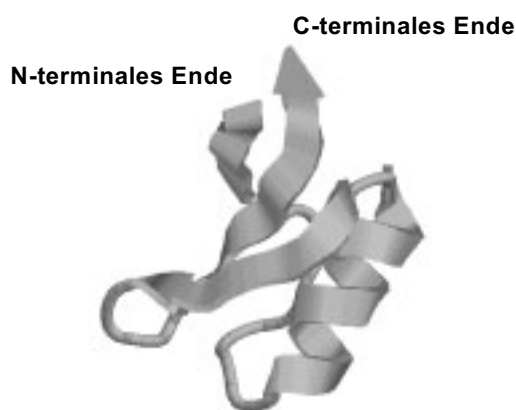
$\gamma$ -Thionine findet man in vielen Pflanzenfamilien.<sup>122,123,124</sup> Im reifen Zustand, abgespalten aus dem Vorläufermolekül, sind sie aus etwa 45 - 50 Aminosäuren aufgebaut. Wie das folgende Schema zeigt, besitzen diese Mikroproteine acht konservierte Cysteine, welche in Disulfidbrücken involviert sind. Im Gegensatz zu der

Familie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thionine gibt es keine weiteren konservierten Bereiche in der Aminosäuresequenz innerhalb dieser Familie.



**Abbildung 33:** Konservierte Cysteine und Disulfidbrücken in  $\gamma$ -Thioninen.

Die gefaltete Struktur des  $\gamma$ -Purothionins (**20**), isoliert aus Weizen, wurde anhand von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aufgeklärt<sup>125</sup> und ist in Abbildung 34 zu sehen. Sie enthält ein, aus drei Strängen bestehendes, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (Aminosäurereste 1 - 6, 31 - 34 und 39 - 47) und eine kurze  $\alpha$ -Helix (Aminosäurereste 16 - 28). Drei der vier Disulfidbrücken sind im hydrophoben Kern zwischen der Helix und dem  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert und formen ein Cystein-stabilisiertes  $\alpha$ -helicales-(CSH)-Motif. Die dreidimensionale Struktur der  $\gamma$ -Thionine weicht sowohl von der Struktur der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thionine<sup>113,114</sup> als auch von der des Viscotoxin A3<sup>120</sup> (siehe Kapitel A.III.8.1) erheblich ab. Homologien zeigt sie jedoch zu Skorpiongiften und Verteidigungsgiften einiger Insekten.



**Abbildung 34:** Dreidimensionale Struktur von **20**.<sup>125</sup>

## 8. Röntgenstrukturanalyse

Vergleichende Studien über die Toxizität verschiedener Viscotoxine<sup>28</sup> ergaben erhebliche Unterschiede innerhalb dieser Klasse. Die Autoren machen für diese Beobachtung Abweichungen in der dreidimensionalen Molekülstruktur der Isoformen verantwortlich. Dies zeigt, welche eine wichtige Rolle der genauen Bestimmung von Molekülgeometrie und -struktur zukommt, wenn man wissen möchte, wie biologisch aktive Verbindungen wirken. Da theoretische Berechnungen solche Strukturen nicht vorhersagen können, kommt experimentellen Bestimmungsmethoden nach wie vor die größte Bedeutung zu. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Messungen an Viscotoxin A3 haben bereits zur Veröffentlichung einer dreidimensionalen Struktur dieses Peptids geführt, die Aufschluß über dessen Form in Lösungen gibt.<sup>120</sup> Allerdings lieferte diese Analyse nur einen Satz ähnlicher, möglicher Strukturen, die sich in mehreren Bindungswinkeln unterscheiden und die nur als monomere Einheit interpretiert wurden (Abbildung 35). Eine Phosphatgruppe wurde in dieser NMR-Struktur nicht gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Viscotoxin A3 (**14**) erstmals im AK Sheldrick von *Judit Debreczeni* kristallisiert und die Tertiärstruktur aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleitet.<sup>x</sup> Des Weiteren konnte die Primär- sowie die Tertiärstruktur des Viscotoxins B2 (**19**) mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse annähernd aufgeklärt werden.



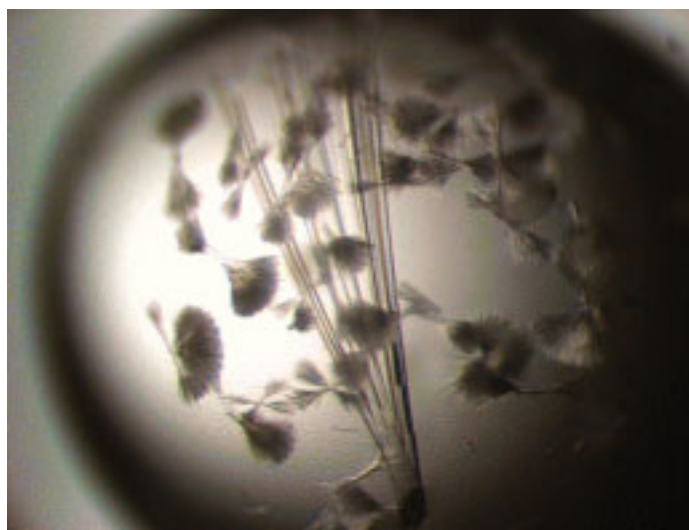
**Abbildung 35:** Superposition der NMR-Strukturen von VT A3 (**14**).<sup>120</sup>

<sup>x</sup> Für die gute Zusammenarbeit danke ich Herrn Prof. Dr. G. M. Sheldrick und Frau Judit Debreczeni, Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen.

## 8.1. Röntgenstrukturanalyse von Viscotoxin A3 (14)

### 8.1.1. Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung

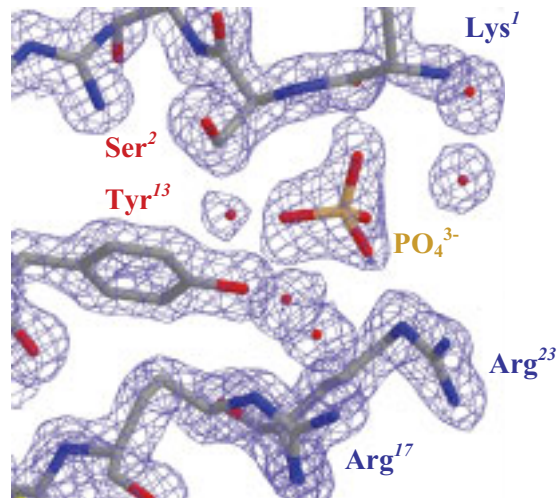
Eine 15 mg/mL Lösung des Viscotoxin A3 wurde nach der *hanging-drop*-Methode<sup>126,127</sup> zur Kristallisation gebracht. Nadelförmige Kristalle mit einer Kantenlänge von 350  $\mu\text{m}$  (Abbildung 36), konnten innerhalb von 10 Tagen aus 27 % PEG 8000, 0.05 M Cacodylatpuffer (pH 6.5), 0.15 M Ammoniumsulfat-Lösung bei Raumtemperatur erhalten werden.



**Abbildung 36:** Kristalle von Viscotoxin A3 (14).

Da die Peptidstruktur weder mit der *molecular-replacement*-Methode noch durch Schweratomderivate gelöst werden konnte, wurde ein SAD-Experiment (single wavelength anomalous dispersion) an einer Drehanode mit Kupferstrahlung vorgenommen, um die Positionen der Disulfidbrücken mit Hilfe anomaler Dispersion des Schwefels zu bestimmen.<sup>128</sup> Es wurde ein vollständiger Datensatz mit einer durchschnittlichen Redundanz von 108.6 gesammelt, um eine statistische Minimierung von Meßfehlern zu erreichen. Aus den anomalen Differenzen wurde die Substruktur der Disulfidbrücken bestimmt. Es konnte von diesem Zeitpunkt an mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß sechs Cystine, also zwei Viscotoxinmoleküle in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind. Die Struktur konnte durch Interpretation der Elektronendichte aufgeklärt werden. An der Beamline X31 des EMBL/DESY in Hamburg wurde ein kompletter Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.7 Å erhalten, das Modell wurde gegen diese Daten bis zu einem R-Faktor von 17.4 % verfeinert. Die Verfeinerungen sind jedoch bisher noch nicht vollständig abgeschlossen. Eine Übersicht über wichtige kristallographische sowie

Verfeinerungsdaten findet sich im Anhang dieser Arbeit. Abbildung 37 zeigt einen Ausschnitt der Elektronendichte nach der vorläufigen Verfeinerung.



**Abbildung 37:** Ausschnitt der Elektronendichte von Viscotoxin A3 (14), gezeigt ist die positiv geladene Bindungstasche.

### 8.1.2. Interpretation der Kristallstruktur von Viscotoxin A3 (14)

In der Kristallstruktur liegt Viscotoxin A3 als Dimer zweier fast identischer Moleküle vor. Der einzige deutliche Unterschied zwischen diesen Molekülen ist ein Sulfation, welches nur bei einem der Monomere an den Ser<sup>38</sup>-Rest gebunden ist und aus der Kristallisationslösung stammt. Eine „Least-Square“-Überlagerung beider Monomere zeigt keine weiteren signifikanten Abweichungen.



**Abbildung 38:** Dreidimensionale Dimerstruktur von VT A3 (14).

Die dreidimensionale Struktur beider Monomereinheiten von VT A3 (**14**) ähnelt dem Großbuchstaben "L", wie alle bisher publizierten Tertiärstrukturen von pflanzlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thioninen.<sup>129,130,113</sup> Die Ähnlichkeit zu der durch  $^1\text{H-NMR}$ -Studien erhaltenen Struktur von Viscotoxin A3 ist groß (Abbildung 39).<sup>120</sup>

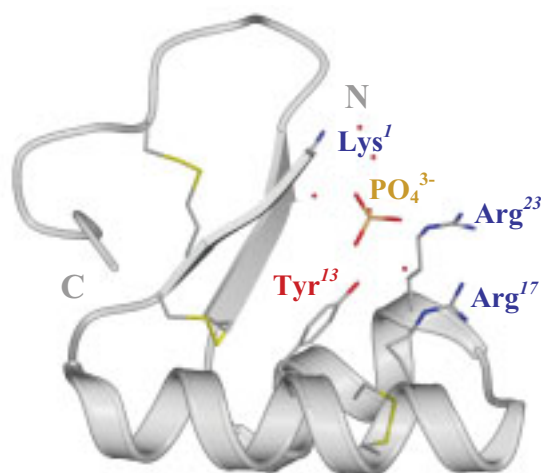


**Abbildung 39:** Superposition von NMR- (blaugrün) und Röntgenstruktur (violett) von **14**.

Die zwei amphipatischen  $\alpha$ -Helices ( $\text{Thr}^7 - \text{Arg}^{18}$ ,  $\text{Arg}^{23} - \text{Ser}^{30}$ ) verlaufen in entgegengesetzter Richtung und definieren den langen Schenkel des Buchstaben "L". Das  $\beta$ -Faltblatt, welches aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen ( $\text{Lys}^1 - \text{Cys}^4$ ,  $\text{Cys}^{32} - \text{Ile}^{35}$ ) besteht, bildet den kurzen Schenkel. Die relative Lage der beiden  $\alpha$ -Helices zueinander scheint für die Position der geladenen Seitenketten von Bedeutung zu sein. Die Aminosäurereste 7 - 30, die unter anderem auch in der Struktur von  $\alpha$ -Hordothionin<sup>129</sup> auftreten, bilden ein Helix-turn-helix-motif (HTH), das charakteristisch für DNA-bindende Proteine ist.<sup>131</sup> Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Region die DNA-bindende Domäne sowohl der Viscotoxine als auch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thionine darstellt. Des weiteren finden sich in den Aminosäurebereichen 19 - 22, 36 - 39 und 44 - 46 Schleifen (turns). Wie erwartet ist jedes Monomer durch drei Disulfidbrücken  $\text{Cys}^3/\text{Cys}^{40}$ ,  $\text{Cys}^4/\text{Cys}^{32}$  und  $\text{Cys}^{16}/\text{Cys}^{26}$  stabilisiert, die ein "concentric motif" bilden. Dieses charakteristische Motif wurde nicht nur in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thioninen, sondern auch in verschiedenen kleineren Proteinen gefunden, wie Sapsin und Oberflächenprotein B.<sup>55</sup> All diesen Proteinen ist die Fähigkeit gemein, mit den Lipidkomponenten verschiedener biologischer Membranen zu interagieren und diese Membranen dadurch zu destabilisieren.

Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, wird in jedem der zwei Monomere ein tetraedrisch koordiniertes Ion nicht-kovalent über die Seitenketten der Aminosäuren  $\text{Arg}^{17}$ ,  $\text{Arg}^{13}$

und Lys<sup>1</sup> gebunden. Da in der Kristallisationslösung Sulfationen zugegen waren, kann aufgrund der Strukturähnlichkeit nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei diesem Ion um ein Sulfation oder um das in Kapitel A.III.6 beschriebene fest gebundene Phosphation handelt.



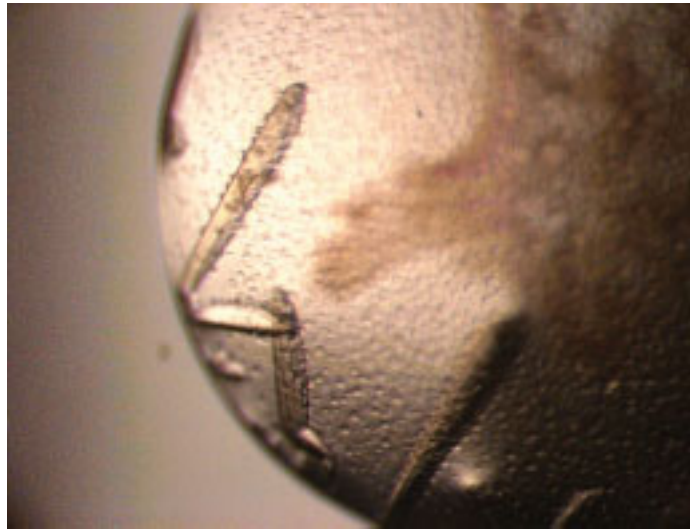
**Abbildung 40:** Darstellung eines Monomers von VT A3 (**14**).

Die Gruppe der drei oben genannten Aminosäuren Arg<sup>17</sup>, Arg<sup>13</sup>, und Lys<sup>1</sup> bildet eine positiv geladene Tasche zwischen dem kurzen und dem langen Schenkel der L-Form. Die Art der Ionenbindung in dieser Tasche erklärt auch die biochemischen Befunde dieser Arbeit, nach denen das Phosphat nur durch Reduktion der Disulfidbrücken oder durch Hydrolyse des Peptids herausgelöst werden kann. Die funktionelle Bedeutung der Phosphat-bindenden Aminosäuren spiegelt sich auch in der hohen Konserviertheit dieser Aminosäuregruppen innerhalb der Viscotoxin-Familie wider.

## 8.2. Röntgenstrukturanalyse von Viscotoxin B2 (**19**)

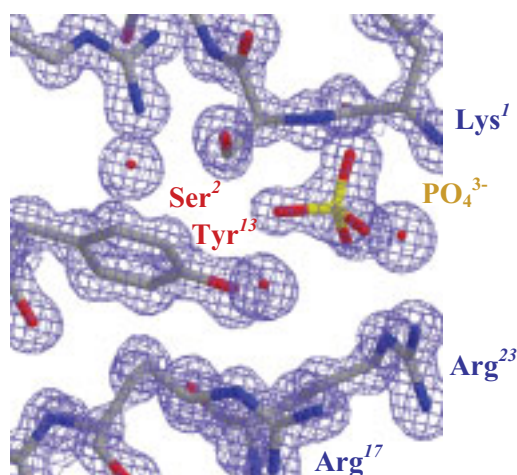
### 8.2.1. Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung

Die unbekannte Verbindung **19** konnte unter denselben Bedingungen wie Viscotoxin A3 (**14**) kristallisiert werden. Nach drei Monaten wurden meßbare, nadelförmige Kristalle (siehe Abbildung 41) mit einer Kantenlänge von 450 µm erhalten.



**Abbildung 41:** Kristalle von Viscotoxin B2 (19).

Es wurde auf der Beamline X13 am EMBL/DESY ein vollständiger Datensatz bis zur atomaren Auflösung (1.0 Å) aufgenommen und das Modell gegen diese Daten bis zu einem R-Faktor von 19.9 % verfeinert. Die atomare Auflösung ermöglichte die Strukturlösung mit Direkten Methoden. Die Primär- und Sekundärstruktur wurde durch Interpretation der Elektronendichte fast vollständig gelöst. Es konnte gezeigt werden, daß sich in der asymmetrischen Einheit zwei Moleküle VT B2 (19) befinden. Da erst gegen Ende dieser Arbeit Kristalle von 19 erhalten wurden, sind die Verfeinerungen bisher noch nicht abgeschlossen. Eine Übersicht über wichtige kristallographische Daten und vorläufige Verfeinerungsdaten befindet sich im Anhang dieser Arbeit. In Abbildung 42 ist ein ausgewählter Bereich der Elektronendichte nach der vorläufigen Verfeinerung zu sehen.



**Abbildung 42:** Ausschnitt der Elektronendichte von 19, gezeigt ist die positiv geladene Bindungstasche.



### 8.2.2. Interpretation der Kristallstruktur von Viscotoxin B2 (19)

Aus der gefundenen Elektronendichteverteilung wurde die Struktur eines Peptids mit 46 Aminosäuren abgeleitet, von denen 41 eindeutig zugeordnet werden konnten. In Abbildung 43 ist die vorläufige Aminosäuresequenz von 19 dargestellt.

#### Viscotoxin B2

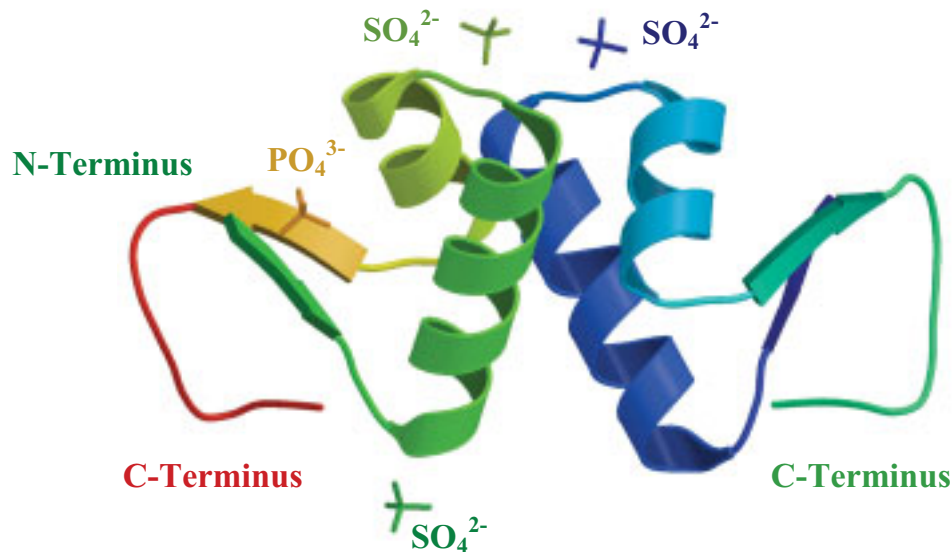
1	11	21	31	41
KSCCPNTTGR	_IY_TCRLGG	GSR_RCASLS	GC_IISASTC	PS_YPK
KSCCPNTTGR	NIYNTCRLGG	GSRERCASLS	GCKIISASTC	PSDYPK

#### Viscotoxin B

**Abbildung 43:** Vorgeschlagene Primärstruktur von VT B2 (19) im Vergleich zu der von VT B (15).

In den Positionen 11, 14 und 43 kann aufgrund der Elektronendichte ein Asparagin- oder ein Asparaginsäure-Rest vermutet werden, in Stellung 24 ein Glutamin- oder ein Glutaminsäure-Rest. Eine Identifizierung der Aminosäure in Stellung 33 war wegen zu geringer Elektronendichte nicht möglich.

Durch Vergleich der Primärstruktur von 19 mit den publizierten Aminosäuresequenzen der Viscotoxine kann eindeutig gesagt werden, daß es sich hierbei um ein weiteres Viscotoxin handelt. 19 zeigt 6 Cystein-Reste in den für Viscotoxine typischen Positionen, ebenfalls weist es eine große Übereinstimmung mit den konservierten Bereichen der Viscotoxine auf. Von allen Viscotoxin-Isoformen ist es dem VT B (15) am ähnlichsten, zu diesem zeigt es in allen bisher identifizierten Aminosäuren eine einhundertprozentige Homologie. Die Abweichungen der chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften von Viscotoxin B2 (19) zu Viscotoxin B (15) müssen daher auf Sequenzunterschieden in den Bereichen beruhen, die für Viscotoxin B2 noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Um die genauen Unterschiede zwischen diesen offenbar sehr ähnlichen Strukturen VT B (15) und VT B2 (19) aufklären zu können, werden weitere Arbeiten zur Verfeinerung der Kristallstruktur nötig sein. Darüber hinaus werden Sequenzanalysen durch Edman-Abbau sowie Tandem-MS-Experimente zusätzliche Beweise für die Aminosäuresequenz von 19 liefern können. Abbildung 44 zeigt die Kristallstruktur von 19 nach vorläufiger Verfeinerung.



**Abbildung 44:** Dreidimensionale Dimerstruktur von VT B2 (**19**).

Ein Vergleich mit Abbildung 38 offenbart die große Ähnlichkeit dieser Struktur mit der von VT A3 (**14**). Wie dieses liegt **19** im Kristall als Dimer zweier praktisch identischer Monomere vor, allerdings sind in der asymmetrischen Einheit vier Phosphat-/Sulfationen gebunden, die sich im Verhältnis 3:1 auf die beiden Monomere verteilen. An beide Monomere ist je eines dieser Anionen zwischen den beiden  $\alpha$ -Helices durch Wasserstoffbrücken gebunden und zwar an den Aminosäurerest Ser<sup>22</sup> der einen und an den Aminosäurerest Arg<sup>25</sup> der anderen Einheit. Während in dem linken Monomer in Abbildung 44 eine Belegung der positiv geladenen Bindungstasche mit Sicherheit nachzuweisen ist, ist dieser Bereich in der rechten Teilstruktur noch nicht hinreichend verfeinert, um ein entsprechendes Anion lokalisieren zu können. Das vierte Phosphat-/Sulfat-Anion ist ebenfalls an das linke Monomer gebunden, und zwar an die Aminosäurereste Thr<sup>7</sup> und Lys<sup>46</sup>. Im Vergleich zu Abbildung 38 fällt ebenfalls die leicht veränderte Stellung der beiden Monomereinheiten zueinander auf.

Im übrigen weisen die Tertiärstrukturen der beiden Monomere alle Strukturmerkmale auf, die auch schon für VT A3 in Kapitel A.III.8.1.2 beschrieben wurden: Sie besitzen zwei amphipatische Helices, die aus den Aminosäuren Thr<sup>7</sup> - Leu<sup>18</sup> und Arg<sup>23</sup> - Ser<sup>30</sup> gebildet werden, das  $\beta$ -Faltblatt enthält die antiparallelen  $\beta$ -Stränge (Lys<sup>1</sup> - Cys<sup>4</sup> und Cys<sup>32</sup> - Ile<sup>35</sup>), und die Bereiche 19 - 22, 36 - 39 sowie 44 - 46 bilden Turns. Die Cystein-Reste gehören zu den konservierten Aminosäuren der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Thionine und wie alle Verbindungen dieser Familie bildet **19** Disulfidbrücken zwischen den Positionen 3 - 40, 4 - 32 und 16 - 26. Die resultierende Tertiärstruktur weist, wie auch VT A3 (**14**), das in Kapitel A.III.8.1.2 beschriebene HTH-motif auf.

Abbildung 45 vergleicht die dreidimensionalen Strukturen von VT A3 (**14**), VT B2 (**19**) und  $\alpha$ -1-Purothionin (**21**).<sup>113</sup>



**Abbildung 45:** Superposition von VT A3 (**14**), VT B2 (**19**) und  $\alpha$ -1-Purothionin (**21**).

## 9. Ausblick

Mistelextrakte werden in der adjuvanten Medizin zur Krebsbekämpfung eingesetzt. Um Aussagen über den Einsatzbereich und das Wirkspektrum der Extrakte verschiedener Subspezies machen zu können, muß eine genaue Kenntnis über die Struktur, den Gehalt und die Zusammensetzung der Inhaltstoffe dieser Extrakte vorliegen, dies gilt vor allem für die Viscotoxine und Mistellektine.

Die durchgeführten Untersuchungen haben eine Reihe weiterführender Fragen aufgeworfen. So muß die Anzahl der Viscotoxin-Isoformen größer sein, als bisher bekannt war. Es konnte gezeigt werden, daß sich nicht alle Viscotoxine unter Verwendung der HPLC und der ESI-Massenspektrometrie eindeutig unterscheiden lassen. Auch die MALDI-Massenspektrometrie weist eine zu große Ungenauigkeit auf. Um in Zukunft zweifelsfreie Studien an diesen Molekülen durchführen zu können, wird der Ausarbeitung eines Verfahrens zur schnellen und eindeutigen Identifizierung dieser Verbindungen eine große Bedeutung zukommen. Hierfür hat sich die hochauflösende ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie in Verbindung mit der HPLC als geeignet erwiesen.

Zur vollständigen Klärung der durch hochauflösende Massenspektrometrie entstandenen Diskrepanzen erscheint eine Aufklärung der Primärstruktur der aus Pappelmisteln isolierten Viscotoxinen A1 (**12**), A2 (**13**), B (**15**), und 1-PS (**16**) durch Edman-Abbau oder Tandem-MS-Experimente sinnvoll. Um diese Sequenzen anschließend mit VT-Isoformen aus anderen Subspezies vergleichen zu können, müssen die bereits vorhandenen Viscotoxine A1, A2, A3, B und 1-PS aus Kiefernmisteln weiter aufgereinigt und die hochaufgelösten monoisotopischen Massen bestimmt werden. Bei Unterschieden zu den aus Pappelmisteln isolierten Verbindungen wäre eine Primärstrukturanalyse anzuschließen. Sollte sich der Verdacht bestätigen, daß es unterschiedliche Isoformen innerhalb der Subspezies gibt, wären auch Tannenmisteln auf ihre Viscotoxine hin zu untersuchen. Auch wäre die Frage zu klären, ob sich diese Variationen nur innerhalb der Subspezies zeigen, oder ob die Unterschiede auch zwischen Misteln von unterschiedlichen Laubbäumen auftreten. Um eine eindeutige Zuordnung der jeweiligen isolierten Mikroproteine zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thioninen machen zu können, wäre eine Primärstrukturanalyse bei Unstimmigkeiten von Vorteil. Auch könnte somit geklärt werden, ob noch weitere Vertreter der  $\gamma$ -Thionine in den jeweiligen Viscotoxin-Rohprodukten vorhanden sind.

Da bei der Isolierung aus Pappelmisteln eine neue Isoform der Viscotoxine gefunden wurde, sollte bei den weiteren Isolierungsarbeiten ebenfalls auf neue Verbindungen geachtet werden. Bei der Isolierung aus der Tannenmistel sollte versucht werden, die Verbindung **18** erneut zu erhalten und diese in ihrer Struktur aufzuklären. Weiterhin sind die noch fehlenden Aminosäuren in der Primärstruktur von VT B2 (**19**) durch weitere Verfeinerung der Röntgenstruktur oder mittels Tandem-Massenspektrometrie zu bestimmen.

Eine Variation in der Aminosäuresequenz kann auch eine Änderung in der dreidimensionalen Struktur nach sich ziehen. Um Unterschiede in der Tertiärstruktur der verschiedenen Viscotoxin-Isoformen zu erkennen, wäre es von Vorteil, alle Verbindungen in möglichst hohen Ausbeuten zu isolieren, um daran Kristallisationsversuche und anschließende Röntgenstrukturanalysen durchführen zu können. Die Kristallisation sollte in einer Stammlösung erfolgen, die weder Sulfat- noch Phosphationen enthält, um beurteilen zu können, ob das Phosphataddukt oder das native Peptid kristallisiert wurde.

Aufschluß über Struktur-Wirkungsbeziehungen könnte der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen verschiedener Isoformen mit deren Wirkdaten geben. Sollten Kristallstrukturen einer Isoform sowohl mit Phosphation als auch ohne erhalten werden, könnten anhand möglicher Konformationsunterschiede die Kenntnisse der Wirkmechanismen erweitert werden.

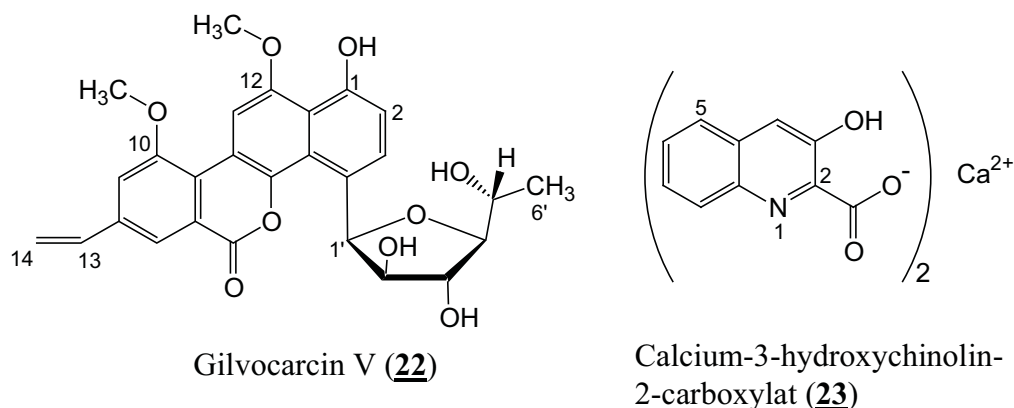
Die Ergebnisse der Zellmembrantests für die Mikroproteine isoliert aus Pappelmisteln stehen zur Zeit noch aus.

## IV. Sekundärmetaboliten der Gilvocarcin-Gruppe

### 1. *Streptomyces griseoflavus* Stamm Gö 3592/1

#### 1.1. Bekannte Sekundärmetaboliten

Der Stamm Gö 3592/1 wurde in unserer Abteilung zum ersten Mal Anfang der achtziger Jahre von *S. Breiding-Mack*<sup>132,133</sup> bearbeitet. Dabei fiel der Stamm im chemischen Screening durch die Bildung zweier Sekundärmetaboliten, bei denen es sich um Gilvocarcin V (**22**) und um Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**) handelt, auf (siehe Abbildung 46). Die beiden Metaboliten wurden aus Fermentationen im Soja/Mannit-Nährmedium in Ausbeuten von 20 mg/L **22** und 24 mg/L **23** gewonnen. Die vielversprechenden cytostatischen Eigenschaften von **22** waren 1985 Anlaß für Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Verbindung durch *C. Albrecht*.<sup>134</sup> Hierfür wurde eine Reihe an Derivaten von **22** synthetisiert und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht.

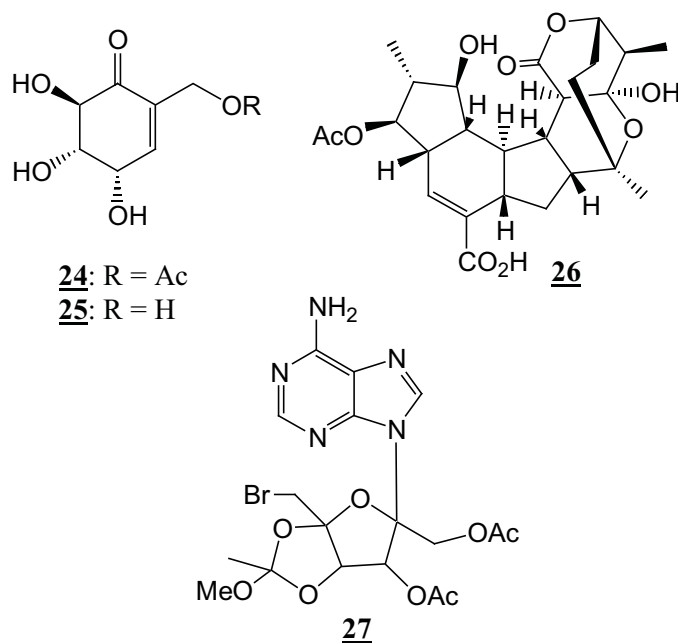


**Abbildung 46:** Bekannte Metaboliten aus dem Stamm Gö 3592/1.

Da mit dem Stamm Gö 3592/1 bisher noch keine Versuche zur Veränderung des Metabolitenmusters unternommen worden waren, sollte untersucht werden, ob sich mit Hilfe des OSMAC-Ansatzes (OSMAC = One Strain - Many Compounds)<sup>135,136</sup> die Produktion neuer Metaboliten induzieren läßt. Ziel dieses Ansatzes ist die Erzeugung von Variabilität bei der Stoffbildung sowie von chemischer Diversität in der Gerüstbildung. Die Auswertung der Sekundärstoffproduktion sollte mit Hilfe des chemischen Screenings<sup>137,138</sup> erfolgen.

## 1.2. Variation der Kultivierungsbedingungen

Das Metabolitenmuster eines Bakterienstamms ist häufig vielfältiger als es unter Standardbedingungen zu beobachten ist. Mit dem OSMAC-Ansatz wird versucht, das gesamte Biosynthesepotential eines Stamms durch Variation der Kultivierungsparameter zu erfassen. So ist es bei den für die Sekundärstoffbildung besonders begabten Actinomyceten und Pilzen leicht, auch bei gut untersuchten Stämmen bisher nicht beschriebene Naturstoffe zu entdecken. Dabei gibt es einen fließenden Übergang zwischen der Ausbeutesteigerung einzelner, im Prinzip vorhandener und dem erstmaligen Auftreten vorher nicht nachweisbarer Metaboliten.<sup>136</sup> Daß sich das OSMAC-Konzept bereits erfolgreich bewährt hat, kann an einer Reihe von Arbeiten eindrucksvoll gezeigt werden. So konnte *J. Fuchser* durch Kultivierungsvariationen 17 Sekundärmetaboliten aus *Aspergillus ochraceus* isolieren, darunter 12 noch nicht beschriebene.<sup>139,140</sup> Als weiteres Beispiel sei das komplexe Metabolitenmuster von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 erwähnt. Aus diesem Stamm wurden 16 Metaboliten aus vier verschiedenen Strukturklassen erhalten.<sup>141</sup> Im Gegensatz dazu produziert *S. cellulosa* ssp. *griseorubiginosus* Stamm S 1013, der von *R. Höfs* bearbeitet wurde, nur vier Naturstoffe. Diese lassen sich jedoch drei verschiedenen Biosynthesewegen zuordnen:<sup>136,142,143</sup> Gabosin D (**24**) und E (**25**) sind Intermediate des Zuckerstoffwechsels, Hexacyclinsäure (**26**) gehört zu den Typ-I-Polyketiden, während **27** ein Angustmycin A Derivat darstellt (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Isolierte Metaboliten aus *Streptomyces cellulosa* S 1013.

Parameter, die sich wirkungsvoll variieren lassen, sind neben dem Nährmedium und der Art des Kultivierungsgefäßes unter anderem die Belüftung, die Kultivierungstemperatur und der pH-Wert.

Für den Stamm Gö 3592/1 wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem Einfluß des Kultivierungsgefäßes und des Nährmediums auch der Einfluß von Zusätzen oberflächenreicher Materialien auf das Metabolitenmuster untersucht. Die Analyse des Metabolitenspektrums erfolgte durch Dünnschichtchromatographie und bei den Metaboliten der Gilvocarcinreihe zusätzlich durch HPLC-Analytik. Gilvocarcin V (**22**) und Gilvocarcin M (**28**) ließen sich im HPLC-Chromatogramm sehr gut anhand ihrer Retentionszeiten und ihrer UV-Spektren unterscheiden (siehe Tabelle 15), was im Dünnschichtchromatogramm aufgrund des gleichen Laufverhaltens in allen gängigen Laufmittelsystemen nicht möglich war.

**Tabelle 15:** Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima von **22** und **28**.

Metabolit	R <sub>t</sub> [min] <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> [nm]
Gilvocarcin V ( <b>22</b> )	18.3	249, 286, 397
Gilvocarcin M ( <b>28</b> )	17.5	242, 274, 387

<sup>a</sup> HPLC II, Säule 8, Programm 13.

### 1.2.1. Nährmedienvariationen

Der Variation des Nährmediums kommt bei Untersuchungen des Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen eine große Bedeutung zu, da nur sehr wenige Mikroorganismen in der Lage sind, die für sie charakteristischen Metaboliten in jedem beliebigen Nährmedium zu produzieren. Eine Untersuchung an 760 Mikroorganismen hat zum Beispiel gezeigt, daß eine bestimmte biologische Aktivität bei 75 % der bearbeiteten Stämme nur auf einem von vier Nährmedien zu beobachten ist.<sup>144</sup> So können Nährmedienbestandteile wie z. B. Glucose, Ammonium- oder Phosphationen die Bildung von Sekundärstoffen reprimieren.<sup>145</sup> Auch die Anwesenheit von Spurenelementen wie z. B. Mg, Ca, Na, K, Fe, Mn, Zn, Co, Cu und Mo hat sich für das Wachstum von Streptomyceten<sup>146</sup> und die Bildung von Sekundärmetaboliten<sup>147</sup> als essentiell herausgestellt.

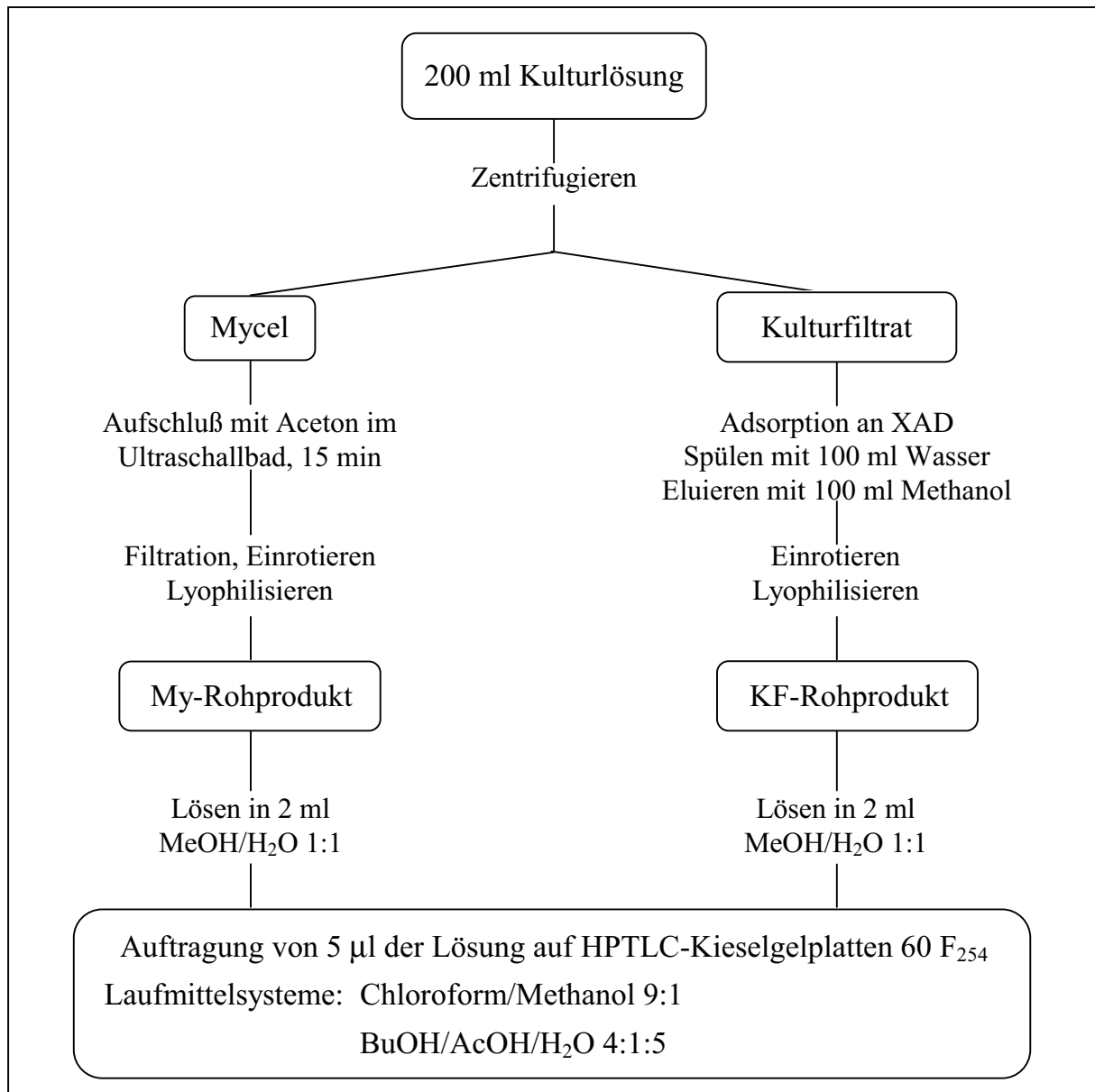
Bei der Kultivierung von Streptomyceten greift man deshalb auf Nährmedien zurück, die mindestens eine Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorquelle sowie bestimmte Salze und Spurenelemente enthalten. Zu den typischen Kohlenstoffquellen für komplexe (chemisch undefinierte) Nährmedien zählt unter anderem Malzextrakt,



dessen Hauptbestandteil Maltose ist. Als Stickstoff- und Schwefelquelle dienen im komplexen Nährmedium Hefeextrakt, Peptone (Proteinhydrolysate) und Sojamehl, die alle einen relativ hohen Anteil an Aminosäuren und Peptiden aufweisen. Als Phosphorquelle dienen ebenfalls die komplexen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Im Fall von synthetischen (chemisch definierten) Nährmedien werden als C-Quellen neben Glycerin meist einfache Kohlenhydrate wie Glucose bzw. Saccharose verwendet. Gängige N-Quellen für synthetische Nährmedien sind Ammoniumsalze und Glycin, Sulfate sind hier typische S-Quellen. Zur Sättigung des Phosphorbedarfs werden zu chemisch definierten Nährlösungen Phosphationen, meist in Form von Ammoniumphosphaten zugefügt. Die Kultivierung in unterschiedlichen Nährmedien soll gewährleisten, daß in einzelnen Versuchen Vorläufer der drei wichtigsten Biogenesequellen (Zucker, Carbonsäuren und Aminosäuren) in unterschiedlicher Form und Menge zur Verfügung stehen. Für diesen Zweck ist die Verwendung komplexer Nährmedien gegenüber synthetischen Nährmedien von Vorteil. Allerdings kann es hier zur irrtümlichen Isolierung von Nährmedienbestandteilen neben den gesuchten Sekundärmetaboliten kommen. Zusätzlich kann ein hoher Fettgehalt der Medienbestandteile die Aufarbeitung und die Detektion der Naturstoffe erschweren.

In Tabelle 16 sind die ausgewählten Nährmedien, die bei der Kultivierung des Stammes Gö 3592/1 genutzt wurden, aufgelistet. Um ausschließlich den Einfluß der Nährmedienvariationen auf die Sekundärstoffproduktion zu untersuchen, wurden alle anderen Parameter nicht verändert. Die Kultivierung erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, verschlossen mit Schaumstoffkappen bei 28 °C, 250 rpm für 96 Stunden. Die Kolben waren jeweils mit 100 mL der entsprechenden Nährlösung befüllt und wurden mit 1/12 einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Von jedem Nährmedium wurden zwei Kolben angesetzt, um die Stabilität des Stammes und die Reproduzierbarkeit der Sekundärmetabolitenproduktion überprüfen zu können. Die Aufarbeitung der Kulturen ist in Abbildung 48 dargestellt. Die Extrakte wurden jeweils in 2 mL Methanol/Wasser 1:1 aufgenommen und 5 µl dieser Lösung wurden auf zwei gegenüberliegenden Seiten von HPTLC-Platten aufgetragen. Die Chromatogramme wurden anschließend zur Abdeckung eines möglichst breiten Polaritätsbereichs in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen entwickelt. Als Laufmittel dienten dabei Chloroform/Methanol 9:1 und n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5. Die Analyse des Metabolitenspektrums erfolgte über visuelle Detektion bei farbigen Substanzen, UV-Absorption bzw. Fluoreszenz bei 254 und 366 nm, sowie durch Behandlung mit Anfärbereagenzien. Um möglichst viele unterschiedliche

funktionelle Gruppen sichtbar zu machen, wurden die HPTLC-Platten mit Anisaldehyd, Orcin, Vanillin-Schwefelsäure sowie mit Tetrazolblau angefärbt.<sup>148</sup> Das Auftreten von Gilvocarcin M (**28**) wurde anhand von HPLC-Chromatogrammen überprüft.



**Abbildung 48:** Aufarbeitung von Kulturen im chemischen Screening.

Der Stamm Gö 3592/1 zeigte in vielen komplexen Nährmedien ein gutes Wachstum. Zur Bildung von Biomasse erwiesen sich M2Ca-, M2S-, SM-, SGG- und SSG-Nährlösungen als besonders geeignet, in den restlichen wurde nur wenig bzw. gar kein Mycel gebildet. Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, war in den genannten Medien auch die Sekundärmetabolitenproduktion am höchsten bzw. am vielfältigsten. Neben

den für diesen Stamm bekannten Sekundärstoffen Gilvocarcin V (**22**) und Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**), konnten Gilvocarcin M (**28**) und Ferrioxamin E (**29**) als weitere Metaboliten nachgewiesen werden. Fermentationen im größerem Maßstab wurden in den Nährmedien SM, SGG und M2S durchgeführt, da die Dünnschichtchromatogramme interessante Substanzflecken zeigten. Diese Fermentationen wurden analog zu denen im Screening durchgeführt. In den Extrakten aus den Kultivierungen in M2, NL-6, NL-203 und NL-1358 ließen sich dünnschichtchromatographisch ausschließlich Spots geringer Intensität detektieren, was auf eine niedrige Konzentration der entsprechenden Sekundärmetaboliten hindeutet. Deshalb wurde auf größere Fermentationsansätze unter Verwendung eines dieser vier Nährmedien verzichtet.

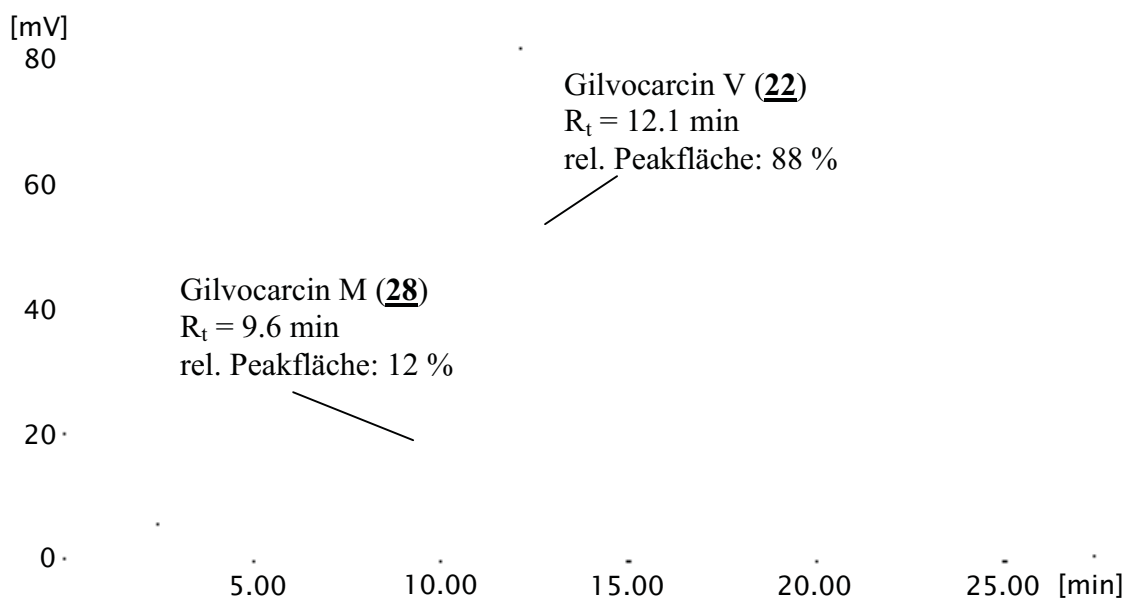
**Tabelle 16:** Kultivierung des Stammes Gö 3592/1 in verschiedenen Nährmedien.

Nährmedium		<b>22</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>29</b>
M2	My	(+)	-	-	-
	KF	(+)	-	-	-
M2Ca	My	+++	(+)	-	-
	KF	(+)	-	+	-
M2S	My	++	(+)	-	-
	KF	+	(+)	++	-
Soja/Mannit	My	++	(+)	++	-
	KF	+	(+)	+++	-
Hafer	My	(+)	-	-	-
	KF	(+)	-	+	-
SGG	My	+++	+	-	-
	KF	++	(+)	+	(+)
SSG	My	+++	(+)	+	-
	KF	+	-	(+)	(+)
NL-6	My	+	-	-	-
	KF	+	-	-	-
NL-203	My	+	-	-	-
	KF	+	-	-	-
NL-1358	My	+	-	-	-
	KF	+	-	-	-

(+++/+++/+ sehr gute/gute/mäßige Produktion, (+) Produktion in Spuren, - keine Produktion)

Gilvocarcin V (**22**), das in allen Nährmedien als Hauptkomponente nachzuweisen war, wurde in dem durch Kultivierung in SM-Medium gebildeten Mycel in einer Ausbeute von 35 mg/L produziert. Daneben produzierte der Stamm unter diesen Bedingungen 5 mg/L Gilvocarcin M (**28**) und 20 mg/L Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**), wobei letzteres aus dem Kulturfiltrat isoliert wurde.

Aufgrund des sehr ähnlichen Laufverhaltens von **22** und **28** erwies sich die säulenchromatographische Aufreinigung der beiden Verbindungen als schwierig. Daher erfolgte die Isolierung von **22** und **28** in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Mischfraktion, welche die beiden Metaboliten in einem Verhältnis von ungefähr 7:1 enthielt durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 19:1 → 5:1) erhalten. Diese wurde weiter durch präparative HPLC-Chromatographie aufgereinigt (siehe Abbildung 49). Aufgrund der geringen Löslichkeit der beiden Gilvocarcine in allen üblichen HPLC-Lösungsmitteln (gute Löslichkeit zeigen **22** und **28** lediglich in DMSO und THF) war die Auftrennung nur mit kleinen Substanzmengen praktikabel. Es wurden daher nur 8.5 mg **22** und 1.3 mg **28** aufgereinigt. Der Anteil der beiden Gilvocarcine im Gemisch und die Ausbeuten pro Liter Kulturbrühe wurden durch Auswertung der Peakflächen im HPLC-Chromatogramm der Gilvocarcinmischfraktion bestimmt. Durch Wechsel von Soja/Mannit-Nährmedium auf SGG-Nährmedium konnte die Ausbeute an **22** auf 140 mg/L und an **28** auf 19 mg pro Liter Kulturbrühe gesteigert werden, die Produktion von **23** nahm jedoch gleichzeitig auf 2 mg/L ab. Ferrioxamin E (**29**), welches im chemischen Screening nur im SGG- bzw. SSG-Medium nachgewiesen werden konnte, wurde bei der Fermentation im größeren Maßstab nicht in isolierbaren Mengen erhalten. Durch Kultivierung im M2S-Medium konnte weder die Ausbeute an **22**, **28** oder **23** erhöht, noch die Bildung neuer Metaboliten erreicht werden.



**Abbildung 49:** HPLC-Chromatogramm der Mischfraktion aus **22** und **28** (Verhältnis 7:1).

### 1.2.2. Kultivierungsgefäße

Unterschiede im Metabolitenspektrum sind bei Variationen eines Kultivierungsgefäßes überwiegend auf Veränderungen der Belüftungsverhältnisse zurückzuführen. Bei der Verwendung von Fermentern läßt sich die Belüftung durch die Art und Anzahl der Rührblätter, durch die Füllhöhe sowie durch die Rührgeschwindigkeit variieren. In Schüttelkolben ergeben sich die Unterschiede durch die Verwendung von Kolben mit oder ohne Schikanen, unterschiedliche Rotationsgeschwindigkeit im Schüttelschrank, sowie durch die Wahl des Kappenmaterials. Bei Ruhefermentationen in P-Kolben kommt es zu keiner Durchmischung der Kulturbrühe und somit zu einem reduzierten Sauerstoffangebot.

Mit dem Ziel, die Bildung neuer Metaboliten sowie die Produktion von Ferrioxamin E (**29**) zu induzieren, wurden zunächst Veränderungen an Schüttelkulturen vorgenommen. Dabei wurden zwei Parameter variiert, zum einen die Umdrehungszahl (180 bzw. 250 rpm), zum anderen die Form der Kolben (mit bzw. ohne Schikanen). Die Variationen wurden in fünf verschiedenen Nährmedien durchgeführt. In Tabelle 17 ist das Metabolitenmuster in Abhängigkeit von der jeweiligen Variation dargestellt. Diese Untersuchungen ergaben, daß die vorgenommenen Variationen das Produktmuster des Stammes Gö 3592/1 nur wenig beeinflussen. Neben den bereits erwähnten Metaboliten Gilvocarcin V (**22**), Gilvocarcin M (**28**), Calcium-3-

hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**) und Ferrioxamin E (**29**) wurden keine weiteren Sekundärstoffe gebildet. Auch kam es zu keiner erneuten bzw. gesteigerten Produktion von **29**. Zudem war es in keinem dieser Ansätze möglich, die Produktion von **22** und **28** zugunsten von **28** zu verschieben. Aufgrund dieser Beobachtungen bei der chromatographischen Analyse der Rohextrakte wurde auf Fermentationen im größeren Maßstab verzichtet.

**Tabelle 17:** Metabolitenspektrum in Abhängigkeit von Schüttelkulturvariationen.

Medien	Schüttelkulturen (300 mL Gefäße, Schaumstoffkappen, 28 °C, 96 h)															
	<b>22</b>				<b>28</b>				<b>23</b>				<b>29</b>			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
M2	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M2Ca	+++	+++	+++	++	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	++	+	-	-	-	-
SM	++	++	++	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
SGG	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+++	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)
Hafer	(+)	+	++	++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

(+++/++/+ sehr gute/gute/mäßige Produktion, (+) Produktion in Spuren, - keine Produktion)

**A:** 250 rpm, ohne Schikanen, **B:** 250 rpm, mit Schikanen, **C:** 180 rpm, ohne Schikanen, **D:** 180 rpm, mit Schikanen.

Zusätzlich zu den Schüttelkolben wurden weitere Kultivierungsgefäße getestet (siehe Tabelle 18). Auch hier stellte sich heraus, daß der Stamm Gö 3592/1 ein vom Kultivierungsgefäß wenig abhängiges Produktmuster aufweist. Bei keiner der in Tabelle 18 aufgeführten Fermentationen ließen sich weitere Metaboliten nachweisen. Jedoch konnte in P-Kolben, gefüllt mit SM-Medium die Produktion von **29** angeregt und diese Verbindung in einer Ausbeute von 22 mg/L isoliert werden. Auch die Ausbeute von **23** konnte in P-Kolben mit SM-Medium auf 35 mg/L gesteigert werden, **28** war in diesem Fall jedoch nicht zu detektieren. Die höchste Ausbeute für **22** und **28** wurde in der Kulturbrühe des Biostat E-Fermenters (SGG-Medium) beobachtet. Sie betrug 160 mg Gilvocarcin V (**22**) und 21 mg Gilvocarcin M (**28**) pro Liter Kulturbrühe. Das Verhältnis von **22** und **28** ließ sich auch hier nicht zugunsten von **28** verschieben.

**Tabelle 18:** Metabolitenmuster in Abhängigkeit vom Kultivierungsgefäß.

Kultivierungsgefäße	<u>22</u>	<u>28</u>	<u>23</u>	<u>29</u>
Biostat B (5 L) <sup>a</sup>	+	-	-	-
Biostat E (10 L) <sup>b</sup>	+++	++	++	-
P-Kolben <sup>a</sup>	+	-	-	-
P-Kolben <sup>b</sup>	++	+	++	-
P-Kolben <sup>c</sup>	+++	-	+++	++

(+++ / ++ / + sehr gute / gute / mäßige Produktion, (+) Produktion in Spuren, - keine Produktion)

<sup>a</sup>M2-Medium, <sup>b</sup>SGG-Medium, <sup>c</sup>SM-Medium.

### 1.2.3. Zusatz von Oberflächenmaterialien

In früheren Studien ist am Beispiel des Adsorberharzes XAD der Einfluß von Materialien mit großen Oberflächen und adsorbierenden Eigenschaften auf das Metabolitenmuster schon mehrfach gezeigt worden. So wurde festgestellt, daß es bei Anwesenheit von XAD in der Kulturlösung zur Bildung neuer Sekundärmetaboliten sowie zu einer Ausbeutesteigerung schon bekannter Sekundärstoffe kommen kann.<sup>149</sup>

Die Ursache für diesen Effekt ist jedoch bisher ungeklärt. Eine mögliche Interpretation ist die Deutung von XAD als Streßfaktor.<sup>150</sup> Als Beispiel für einen Naturstoff, der erst nach Zugabe von XAD gebildet wurde, sei Exfoliamycin genannt.<sup>151</sup> C. Puder konnte in seiner Dissertation zeigen, daß der Rubromycinbildner *Streptomyces* sp. Stamm A1 bei Zusatz von Celite<sup>®</sup> die Produktion von  $\beta$ -Rubromycin um den Faktor vier steigert. Bei Zugabe von Erde zur Nährlösung wurde darüber hinaus die Bildung von drei neuen Metaboliten induziert.<sup>152</sup>

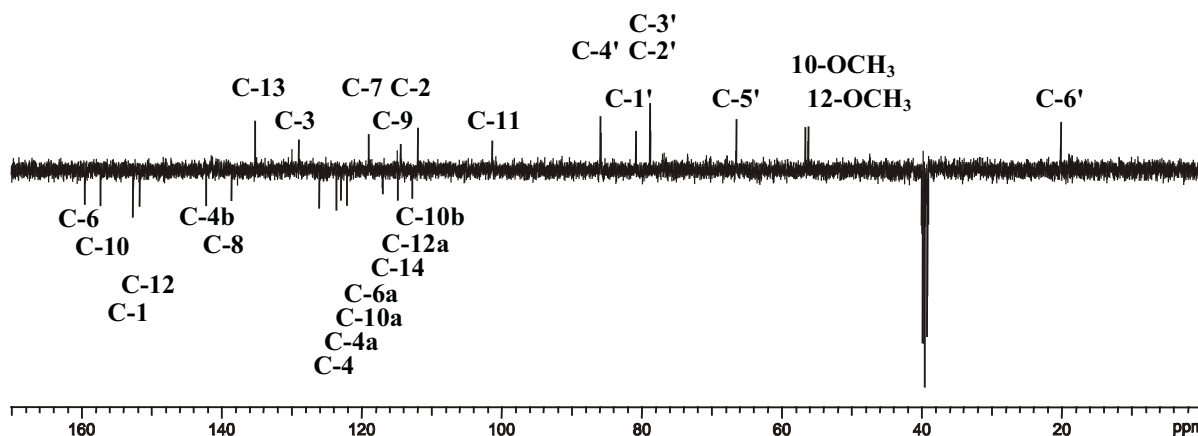
Als Zusätze für die Fermentation des Stammes Gö 3592/1 wurden Amberlite<sup>®</sup> XAD-2, MCI<sup>®</sup>, Siedesteine und Celite<sup>®</sup> in einer Konzentration von je 30 g/L SGG-Nährmedium verwendet. Alle Materialien wurden zu Beginn der Fermentation zur Kulturbrühe hinzugegeben. Zusätzlich wurde Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 in einem zweiten Ansatz erst nach 40 Stunden zugegeben. Die Kultivierung erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 28 °C und 250 rpm für 96 h. Die Aufarbeitung und Auswertung wurde wie in Kapitel A.IV.1.2.1 beschrieben durchgeführt. Der Ernte-pH war bei allen Ansätzen 6.8 und die Kulturen waren optisch unauffällig. Bei keiner der aufgeführten Kultivierungen in Gegenwart von Oberflächenmaterialien kam es zu einer Beeinflussung des Sekundärmetabolitenspektrums bzw. zu einer Ausbeutesteigerung der bereits bekannten Substanzen. Demzufolge wurden keine Fermentationen im größeren Maßstab durchgeführt.

### 1.3. Identifizierung der Sekundärmetaboliten

#### 1.3.1. Gilvocarcin V (22)

Die aus dem Stamm Gö 3592/1 als Hauptkomponente (5-160 mg/L) isolierte gelbe Verbindung fällt im Dünnschichtchromatogramm durch ihre intensive gelbe Fluoreszenz bei 366 nm auf. Sie ist mit Ausnahme von DMSO und THF in allen gängigen Lösungsmitteln schlecht löslich. Durch Aufnahme von EI- und ESI-Massenspektren wurde eine Molmasse von 494 g/mol ermittelt. Das UV-Spektrum weist Absorptionsmaxima bei 248, 286 und 397 nm auf. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ( $d_6$ -DMSO) zeigt ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}} = 1.25$  ppm, welches einer Methylgruppe zugeordnet werden kann. Die Intensität der Singulett-Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 4.10$  und  $4.15$  ppm entspricht ebenfalls jeweils drei Protonen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Methoxygruppen handelt. Weiterhin sind charakteristische Signale einer Zucker-Einheit zwischen  $\delta_{\text{H}} = 3.5$  und  $5.5$  ppm erkennbar, die Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 5.48$ ,  $6.10$  und  $6.93$  ppm wurden einer Vinylgruppe zugeordnet. Insgesamt zeigt das Spektrum die Signale für 26 Wasserstoffatomen, von denen sechs im Bereich aromatischer Protonen liegen. Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum finden sich Resonanzen für 27 C-Atome. Dem APT-Spektrum sind Signale für drei Methyl- und einer Methylengruppe, fünf aliphatische und sechs olefinische Methingruppen sowie 12 quartäre C-Atome zu entnehmen. Durch spektroskopischen Vergleich mit einer authentischen Probe war die Identifizierung von Gilvocarcin V (22) schnell abgeschlossen. 22 ist im festen Zustand unter Lichtausschluß stabil, in Gegenwart von Licht färbt es sich langsam rot. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, auf welchem Vorgang diese Rotfärbung basiert. Bestrahlungsversuche ergaben lediglich, daß sich 22 an Licht langsam zersetzt und daß die gebildeten Zersetzungsprodukte keine UV-Maxima im langwelligen Bereich aufweisen, die für eine rote Farbe verantwortlich sein könnten.





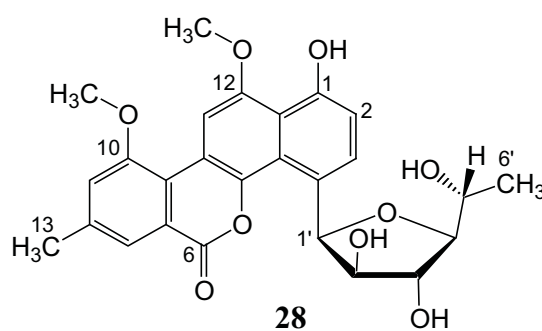
**Abbildung 50:** APT-Spektrum von Gilvocarcin V (**22**) (125.7 MHz,  $d_6$ -DMSO).

Gilvocarcin V (**22**) wurde zu Beginn der achtziger Jahre von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in Japan<sup>153,154</sup> und den USA<sup>155,156</sup> entdeckt, und anfangs auch unter dem Namen Toromycin geführt. **22** wurde in unserer Arbeitsgruppe erstmals 1981, kurz vor der Veröffentlichung der Struktur, von *S. Breiding-Mack*<sup>132</sup> isoliert.<sup>154,155,157,158</sup> Die Verbindung **22** ist wirksam gegen gram-positive Bakterien,<sup>153,155,159</sup> Mycobakterien<sup>153</sup> und Trichomonaden,<sup>153</sup> sowie einige Virustypen.<sup>153,160</sup> Des weiteren zeichnet sich Gilvocarcin V (**22**) durch eine sehr gute Antitumor-Wirksamkeit in Verbindung mit einer außergewöhnlich geringen Toxizität aus. Die Wirkung dieser Verbindung auf verschiedene Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ist in vielen Arbeitsgruppen untersucht worden.<sup>154,161,162</sup> Dabei wurde entdeckt, daß die Anwesenheit der Vinylgruppe für die Aktivität der Verbindung essentiell ist.<sup>163</sup> Besonders erwähnenswert ist die von *Elespuru* und *Gonda*<sup>164</sup> gefundene Steigerung der cytostatischen Wirkung unter Einfluß von Licht. Die starke Photoaktivität von **22** ist Gegenstand vieler Untersuchungen,<sup>165,166</sup> bei denen unter anderem gezeigt werden konnte, daß **22** ein DNA-angreifendes Agens mit stark interkalierenden Eigenschaften ist. Unter Belichtung geht **22** eine [2+2]-Cycloaddition am Thymidinrest einer Doppelstrang-DNA ein und bewirkt dadurch einen Strangbruch der DNA.<sup>167</sup> Neben der DNA-Synthese inhibiert **22** auch die der RNA oder die Protein-Synthese, jedoch im geringeren Ausmaße.<sup>159</sup> Weiterhin besitzt **22** die Fähigkeit die Topoisomerase II zu hemmen.<sup>168</sup> Aufgrund ihres signifikanten pharmakologischen Potentials hat die Verbindung ebenfalls ein starkes Interesse unter Synthesechemikern geweckt.<sup>169,170</sup> Biosyntheseuntersuchungen haben gezeigt, daß das Aglykon vollständig aus Acetat-Einheiten aufgebaut wird.<sup>171,172</sup> Inzwischen ist der Biosynthesegencluster von

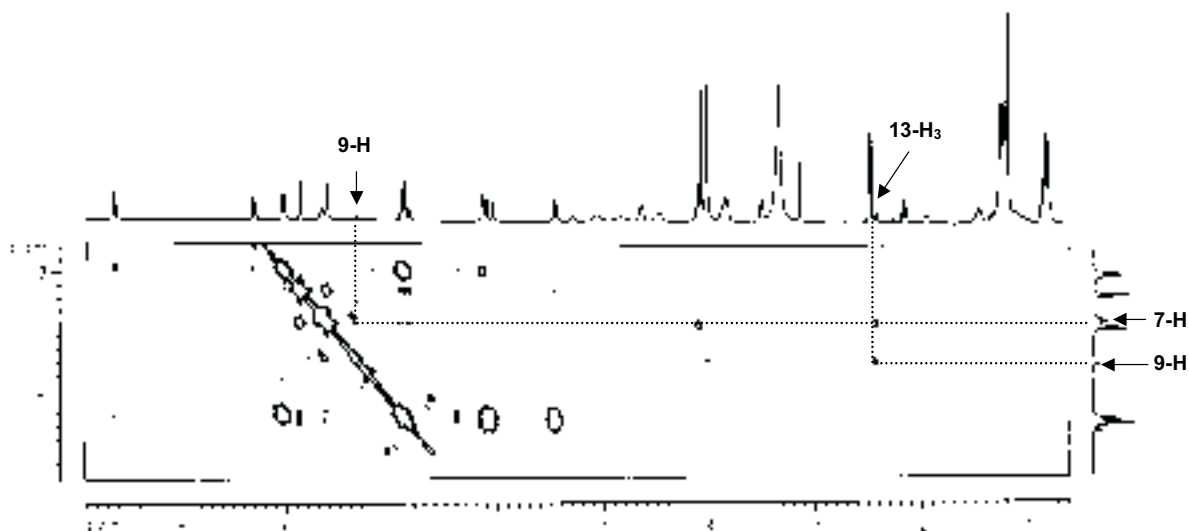
Gilvocarcin V (**22**) in *Streptomyces griseoflavus* Stamm Gö 3592 identifiziert worden.<sup>173</sup>

### 1.3.2. Gilvocarcin M (**28**)

Die häufig als Begleitkomponente von Gilvocarcin V (**22**) aufgetretene gelbe Verbindung Gilvocarcin M (**28**) ist wie dieses nur in wenigen Lösungsmitteln wie THF und DMSO gut löslich. In den gängigen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methanol, Essigester und Aceton ist sie schlecht löslich und in Wasser unlöslich.



Das UV-Spektrum von **28** weist sehr große Ähnlichkeit mit dem von **22** auf. Für **28** finden sich Absorptionsmaxima bei 243, 273, 306 und 383 nm, wobei Absorptionen bei 273 und 383 nm typisch sind für ein Gilvocarcin-Aglykon, bei dem sich an C-8 anstelle einer Vinyl-Gruppe eine aliphatische Seitenkette befindet. Die im EI- und ESI-MS bestimmte, im Vergleich zu **22** um 12 Einheiten geringere Masse von 482 deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Verbindung um das in 8-Position methylierte Gilvocarcin handelt. Entsprechend zeigt das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum das Singulett einer Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.4$  ppm, welches im <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-NMR-Spektrum Korrelationssignale zu 7-H ( $\delta_{\text{H}} = 7.64$ ) und 9-H ( $\delta_{\text{H}} = 7.35$ ) aufweist. Die Zuordnung der <sup>1</sup>H-NMR-Daten erfolgte aus einem Mischspektrum von **22** und **28**. Die Signale der einzelnen Komponenten konnte anhand der Integralverhältnisse unterschieden werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten bestätigte, daß die isolierte Verbindung **28** mit Gilvocarcin M identisch ist.<sup>157</sup>



**Abbildung 51:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR-Mischspektrum von **22** und **28** (75.5 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).

**28** wurde zusammen mit **22** erstmals 1981 aus *Streptomyces gilvotanareus* isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte noch im selben Jahr durch Abbau- und spektroskopische Methoden,<sup>157</sup> sowie zusätzlich durch eine Röntgenstruktur, welche die relative Konfiguration bewies.<sup>174</sup> Die absolute Konfiguration der Fucose wurde anhand synthetischer Vergleichssubstanzen als  $\beta$ -D- bestimmt und damit die lange Zeit postulierte L-Konfiguration widerlegt.<sup>175</sup> **28** weist im Vergleich zu **22** eine bis zu 50fach geringere antimikrobielle bzw. antitumorale Aktivität auf.<sup>155,161</sup> Zu einer Wirkungssteigerung unter Einfluß von Licht, kommt es bei **28** ebenfalls nicht. **28** bindet zwar an die DNA, jedoch verursacht es keinen lichtinduzierten DNA-Strangbruch.<sup>166</sup> Diese Untersuchungen belegen die bereits unter A.IV.1.3.1 erwähnte Bedeutsamkeit der Vinyl-Gruppe an C-8 für die biologische Aktivität.

### 1.3.3. Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**)

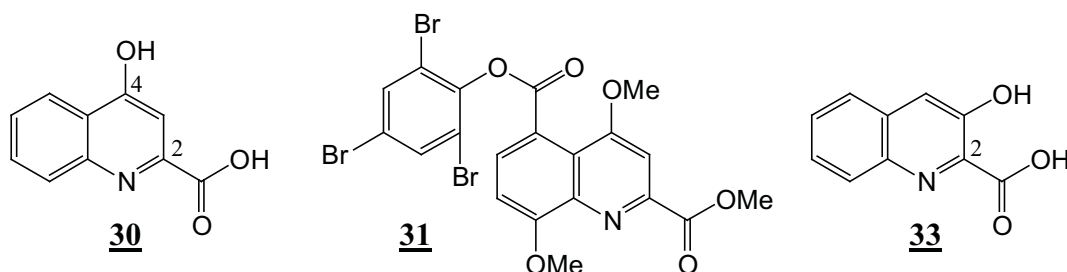
Die hellgelbe Verbindung **23** fluoresziert im langwelligen UV-Licht hellgrün und ist mit keinem der verwendeten Sprühreagenzien anfärbbar. **23** ist sowohl in DMSO als auch in Pyridin gut löslich, wenig löslich in Methanol bzw. Wasser und fast unlöslich in Chloroform, Aceton und Essigester. Das EI-Spektrum zeigt eine Molmasse von 189, sowie die Fragmentmassen 171, 145, 143, 117 und 115, wie in Abbildung 52 zu sehen ist. Eine Suche in der internen EI-Massenspektren-Datenbank führte zur Klasse der Hydroxychinolin-Carbonsäuren. Im IR-Spektrum der Verbindung tritt ein breite Bande bei  $3509\text{ cm}^{-1}$  und eine Bande im Carbonylbereich bei  $1651\text{ cm}^{-1}$  auf. Das

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt Signale für nur 5 aromatische Protonen, was die vermutete Struktur aus dem EI-Experiment bestärkt. Da bekannt war, daß der untersuchte Stamm **23** produziert, wurden die gemessenen IR- und  $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit denen von *S. Breiding-Mack*<sup>132</sup> verglichen und die fragliche Substanz als die Calcium-haltige Verbindung **23** identifiziert.



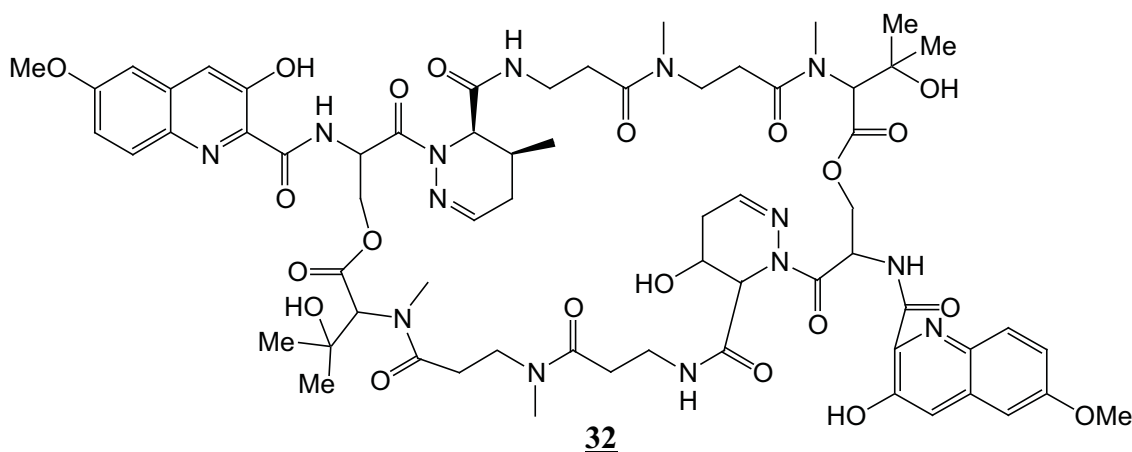
**Abbildung 52:** EI-Massenspektrum von **23**.

Hydroxychinolincarbonsäuren sind in der Literatur zahlreich publiziert worden. Das Vorkommen dieser Klasse von Verbindungen beschränkt sich nicht nur auf Mikroorganismen, vielmehr findet man sie auch in Eukaryonten (Tier und Mensch). Als Beispiele hierfür seien Kynurensäure (**30**),<sup>176</sup> bei der es sich um ein Urinbestandteil handelt, und Trididemnic acid A (**31**)<sup>177</sup> genannt.



Viele dieser Verbindungen besitzen interessante biologische Wirkungen. Zum Beispiel besitzen 1-, 6- und 7-substituierte Derivate der 4-Hydroxychinolin-3-carbonsäure antibakterielle Wirkung.<sup>178</sup> 7-substituierte Derivate sind außerdem Inhibitoren

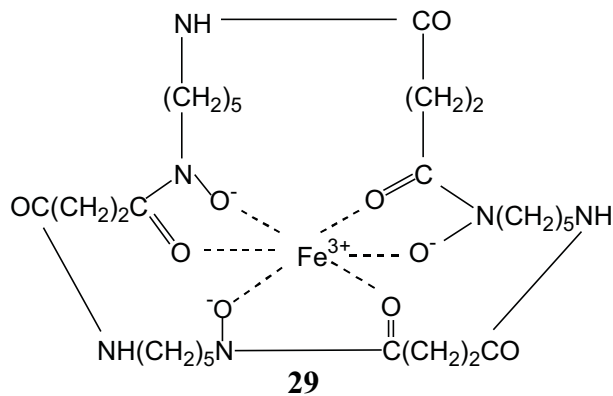
verschiedener Dehydrogenaseenzyme und als Folge daraus Hemmstoffe von Ehrlich-Ascites-Zellen.<sup>179</sup> Weiterhin können Hydroxychinolincarbonsäuren Bestandteil höhermolekularer Naturstoffe sein. Das Antibiotikum BBM-928 (**32**) enthält als Chromophor 2 Moleküle 3-Hydroxy-6-methoxychinolin-2-carbonsäure. Es gehört zur Reihe der Depsipeptide und wirkt cytostatisch. **23** selbst besitzt weder cytostatische noch antibakterielle bzw. antifungische Aktivität.<sup>132</sup> Die Synthese der calciumfreien 3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**33**) wurde 1995 von C. Boger publiziert.<sup>180</sup>



#### 1.3.4. Ferrioxamin E (**29**)

Der nur in P-Kolben in isolierbaren Mengen produzierte, sehr polare rote Naturstoff ist sehr gut in DMSO löslich, mäßig in Methanol, Dichlormethan bzw. Wasser und fast unlöslich in Aceton und n-Pentan. Im EI-MS-Experiment war keine Masse erhältlich, im ESI-Massenspektrum ergab sich eine Molmasse von 653. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum war aufgrund zu breiter Signale wenig aussagekräftig. Es bestand daher der Verdacht, daß es sich um eine metallhaltige Verbindung handeln könnte. Im UV-Spektrum konnten Absorptionsmaxima bei 200 und 246 nm bestimmt werden. Unter Zusatz von NaOH kommt es zu einer geringen bathochromen Verschiebung, worauf die Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}} = 210$  und 248 nm liegen. Im IR-Spektrum lassen sich die für NH-Valenzschwingungen charakteristische Bande einer Amidgruppe bei  $3439 \text{ cm}^{-1}$  und die dazugehörige Carbonylbande bei  $1634 \text{ cm}^{-1}$  erkennen. Eine Suche mit dem Molekulargewicht in der Datenbank "Dictionary of Natural Products"<sup>181</sup> ergab unter anderem Hinweise auf eine eisenhaltige Verbindung. Ein Vergleich der UV-Absorptionsmaxima und des IR-Spektrums mit den Literaturdaten<sup>182</sup> bestätigte, daß es sich bei dem isolierten Metabolit um Ferrioxamin E (**29**) handelt. Die

Koordination des dreiwertigen Eisen erfolgt über die drei amidischen Sauerstoffatome und die drei im Chelatkomplex anionisch vorliegenden Hydroxamate.

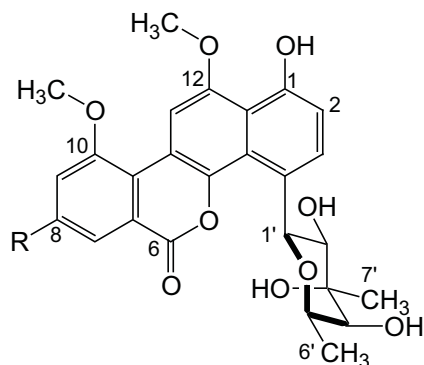


Ferrioxamin E (**29**) ist synonym mit Norcardamin und wurde aus verschiedenen Mikroorganismen wie *Nocardia*-Arten, *Pseudomonaden* und *Streptomyceten* isoliert.<sup>183,184</sup> Es handelt sich bei dieser Verbindung um einen Vertreter aus der bereits intensiv untersuchten Substanzklasse der mikrobiellen Eisen-(Fe<sup>3+</sup>)-chelatoren. **29** ist in Mikroorganismen verantwortlich für den Eisentransport und gehört somit zusammen mit den anderen bislang isolierten Ferrioxaminen zu der Gruppe der Siderophore.<sup>185</sup> Die eisenfreie Form von Ferrioxamin B, ein weiteres Mitglied dieser Klasse, wird in der Humantherapie unter dem Markennamen Desferal<sup>®</sup> zur Behandlung von Eisen-Speicherkrankheiten eingesetzt.<sup>186</sup> Strukturell unterscheidet sich Ferrioxamin B von dem isolierten **29** nur dadurch, daß eine Amidbindung gespalten ist und Ferrioxamin B demzufolge eine freie Amino- und Carboxylgruppe trägt.

## 2. *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2471

### 2.1. Bekannte Sekundärmetaboliten

*Streptomyces* sp. Stamm Tü 2471 stammt aus der Tübinger Streptomycetensammlung von Prof. Zähler. Frühere Arbeiten<sup>132,187</sup> zeigten, daß dieser Stamm Chryso mycin A (**11**), Chryso mycin B (**34**) und Chryso mycin C (**35**) produziert, deren Strukturen in Abbildung 53 gezeigt sind. Diese drei Sekundärmetaboliten gehören zur selben Substanzklasse wie die Gilvocarcine, auf die in Kapitel A.IV.2.7 näher eingegangen wird.



Chrysoerythrin A (**11**): R = CH=CH<sub>2</sub>

Chrysoerythrin B (**34**): R = CH<sub>3</sub>

Chrysoerythrin C (**35**): R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

**Abbildung 53:** Bekannte Metaboliten aus dem Stamm Tü 2471.

Da für Tü 2471 bisher keine Versuche zur Veränderung des Metabolitenmusters unternommen worden waren, sollte zur Erschließung der Biosyntheseleistung dieses Stammes die OSMAC-Methode angewendet werden.

## 2.2. Variation der Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1. Nährmedien

Einen ersten Einblick in das Biosynthesepotential des Stammes sollte eine Variation der Nährmedien gewähren. Diese Variationsversuche wurden bezüglich Nährmedien, Probenaufbereitung und chemischem Screening analog zu denen in Kapitel A.IV.1.2.1 für den Stamm Gö 3592/1 beschriebenen, durchgeführt. Genau wie die Gilvocarcine verhielten sich auch die einzelnen Chrysoerythrine in ihrem Laufverhalten auf DC-Platten sehr ähnlich und konnten nur durch HPLC-Chromatographie eindeutig voneinander unterschieden werden (Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima von **11**, **34** und **35**.

Metabolit	R <sub>t</sub> [min] <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> [nm]
Chrysoerythrin A ( <b>11</b> )	18.9	249, 286, 394
Chrysoerythrin B ( <b>34</b> )	18.1	242, 274, 381
Chrysoerythrin C ( <b>35</b> )	19.3	242, 274, 379

<sup>a</sup> HPLC II, Säule 8, Programm 13.

Die Kulturen in den verschiedenen Nährmedien unterschieden sich schon rein optisch deutlich voneinander. Die Farbe der Kulturlösung variierte je nach Nährmedium von grünlich über ockerfarben bis dunkelbraun. Es kam mal mehr, mal weniger zur

Bildung von Pellets, die sich in ihrer Größe und ihrer Farbe unterschieden. Jedoch konnte weder in den Mycelextrakten noch in den Extrakten der Kulturfiltrate das Auftreten neuer Metaboliten beobachtet werden. **11**, **34** und **35** entstanden in jedem Nährmedium und waren überwiegend im Mycelextrakt enthalten. Es wurde deshalb auf die Aufarbeitung des Kulturfiltrates verzichtet. Kulturen in SM- und SGG-Nährmedium wiesen dabei die höchste Produktion der drei Metaboliten auf. Um die Sekundärmetaboliten in größeren Mengen zu erhalten wurde für beide Nährmedien jeweils ein Scale-up auf 2 L durchgeführt. Während im SM-Nährmedium nur die bekannten Verbindungen in einer Ausbeute von 120 mg/L **11**, 80 mg/L **34** und 5.5 mg/L **35** produziert worden waren, konnte in dem HPLC-Chromatogramm des SGG-Mycelextraktes sieben weitere Minderkomponenten nachgewiesen werden. Die HPLC-UV-Spektren dieser Metaboliten ließen darauf schließen, daß diese Komponenten ebenfalls der Gilvocarcinreihe angehören. In Tabelle 20 sind die HPLC-UV-Daten und Ausbeuten dargestellt. Die neuen Verbindungen wurden anhand ihres Substituenten an C-8 benannt. Metaboliten mit neuartigen Substituenten erhielten eine im Alphabet weiterführende Bezeichnung, bekannte Reste an C-8 erhielten in ihrer Serie eine höhere Ziffer.

**Tabelle 20:** Retentionszeiten, UV-Absorptionsmaxima und Ausbeuten der neuen Metaboliten, isoliert aus SGG-Schüttelkulturen.

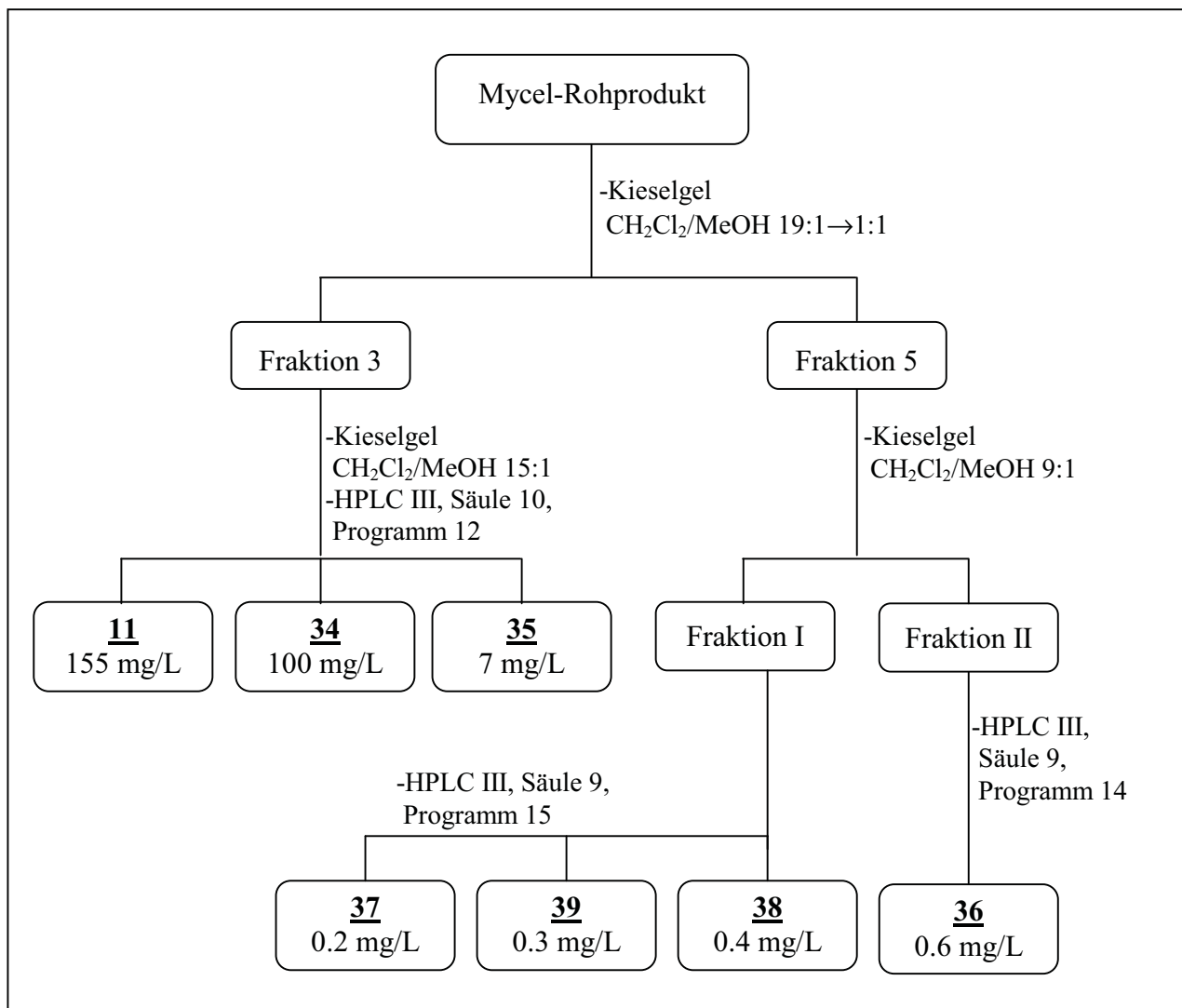
Metabolit	R <sub>t</sub> [min] <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> [nm]	Ausbeute [mg/L]
Chrysomycin D ( <b>36</b> )	14.4	242, 274, 383	0.6
Chrysomycin E ( <b>37</b> )	15.1	242, 274, 383	0.2
Chrysomycin B <sub>2</sub> ( <b>39</b> )	15.3	245, 274, 379	0.3
Chrysomycin A <sub>2</sub> ( <b>38</b> )	16.1	253, 285, 392	0.4
<b>40</b>	19.5	239, 277, 385	-
<b>41</b>	20.6	198, 219, 277, 386	-
<b>42</b>	20.8	198, 219, 277, 386	-

<sup>a</sup> HPLC II, Säule 8, Programm 13.

Die Isolierung erfolgte wie in Abbildung 54 dargestellt. Fraktion 3 der Säulenchromatographie des Mycelrohprodukts enthielt die Chrysomycine A (**11**), B (**34**) und C (**35**) im Verhältnis 22:15:1. Auch hier trat bei der anschließenden präparativen HPLC-Chromatographie das Problem der geringen Löslichkeit der Sekundärstoffe in Methanol auf. Die drei Metaboliten wurden in einer Ausbeute von



155 mg/L **11**, 100 mg/L **34** und 7 mg/L **35** produziert, jedoch wurden für die folgende Analytik nur insgesamt 3.5 mg **11**, 2 mg **34** und 0.3 mg **35** isoliert.



**Abbildung 54:** Isolierung der Chrysomyce aus dem SGG-Mycelextrakt von Tü 2471.

Aus Fraktion 5 ließen sich vier neue Metaboliten, Chrysomycin D (**36**), Chrysomycin E (**37**), Chrysomycin A<sub>2</sub> (**38**) und Chrysomycin B<sub>2</sub> (**39**), in sehr geringen Ausbeuten isolieren, die Verbindungen **40** - **42** wurden nur in nicht isolierbaren Mengen produziert. Ein Vergleich der UV-Absorptionsspektren von **40** - **42** mit den bekannten Metaboliten dieser Substanzklasse läßt vermuten, daß es sich hier um Aglyka der Gilvocarcin-Gruppe mit einem nicht-konjugierten Substituenten am C-8-Atom handelt.

### 2.2.2. Kultivierungsgefäße

Der mögliche Einfluß von verschiedenen Kultivierungsgefäßen wurde bereits in Kapitel A.IV.1.2.2 beschrieben. Zunächst wurde mit dem Stamm Tü 2471 eine Fermentation im Biostat E-Fermenter (10 L, SGG-Medium) durchgeführt, um einerseits größere Mengen von den sieben, in Schüttelkulturen gefundenen Metaboliten zu isolieren, und um andererseits zu untersuchen, ob weitere neue Metaboliten gebildet werden. Das Sekundärstoffmuster aus dieser Fermentation war mit dem aus Schüttelkolben kaum vergleichbar. Die Metaboliten **36** - **42** wurden nicht gebildet, und neue Verbindungen wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Allerdings produzierte der Stamm **11**, **34** und **35** in ähnlich guten Ausbeuten wie in der SGG-Schüttelkultur.

Weiterhin wurden auch bei Schüttelkulturen Variationen vorgenommen. Dazu wurden wie in Kapitel A.IV.1.2.2 für den Stamm Gö 3592/1 beschrieben, sowohl die Art der Schüttelkolben als auch die Umdrehungszahl variiert. Leider fielen auch hier immer wieder nur die drei Hauptkomponenten an, zudem konnte für diese keine Ausbeutesteigerung gegenüber den bereits untersuchten Variationen beobachtet werden. Weder die Produktion der Metaboliten **36** - **42** noch die von neuen Sekundärstoffen konnte induziert werden. Aus diesen Grund wurde von weiteren Fermentationen in größerem Maßstab abgesehen.

Auch in Extrakten aus Ruhefermentation im P-Kolben, für die SGG-Medium verwendet wurde, ließen sich im Dünnschicht- und im HPLC-Chromatogramm wieder nur die drei Verbindungen **11**, **34** und **35** nachweisen. Auf eine Bestimmung der Ausbeuten wurde verzichtet.

### 2.2.3. Zusatz von Oberflächenmaterialien

Der mögliche Einfluß von Oberflächenmaterialzusätzen wurde bereits in Kapitel A.IV.1.2.3 näher erläutert. Da bekannt war, daß es unter Einfluß von XAD häufig zur Ausbeutesteigerung von Metaboliten kommt,<sup>149</sup> bestand die Hoffnung, daß durch diese Zusätze die Produktion von Chrysomycin D (**36**), E (**37**), A<sub>2</sub> (**38**) und B<sub>2</sub> (**39**) bzw. die der Verbindungen **40** - **42** angeregt wird. Als Zusätze wurden Amberlite<sup>®</sup> XAD-2, Celite<sup>®</sup>, Siedesteine und MCI<sup>®</sup> verwendet. Die Fermentationen wurden wie in Kapitel A.IV.1.2.3 auf Seite 84 beschrieben durchgeführt, die Aufarbeitung der Extrakte und die Auswertung der Chromatogramme sind in Abbildung 48 zusammengefaßt. Leider erwies sich der Stamm unter allen untersuchten Bedingungen als wenig variabel. Bei keiner der aufgeführten Kultivierungen in Gegenwart von Oberflächenmaterialien kam

es zu einer Ausbeutesteigerung der bekannten Metaboliten bzw. zu einer Beeinflussung des Sekundärmetabolitenspektrums. Es wurden wieder nur die drei Hauptmetaboliten detektiert. Demzufolge wurde auf Fermentationen im größeren Maßstab verzichtet.

Die Bildung von Chryso mycin D (**36**), E (**37**), A<sub>2</sub> (**38**), B<sub>2</sub> (**39**), **40**, **41**, und **42** ließ sich somit nur in Schüttelkolben (300 mL, 250 rpm, mit Schikanen) auf SGG-Medium ohne Zusätze induzieren. Die Chryso mycine A (**11**), B (**34**) und C (**35**) waren hingegen in allen Kultivierungsvariationen in kleineren und größeren Mengen nachweisbar.

### 2.3. Charakterisierung und Strukturaufklärung

#### 2.3.1. Chryso mycin A (**11**)

Der vom Stamm Tü 2471 in allen Nährmedien gebildete Hauptmetabolit weist im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform/Methanol 9:1) einen R<sub>f</sub>-Wert von 0.40 auf und färbt mit Anisaldehyd dunkelgrün an. Er ist in DMSO und THF gut löslich, mäßig in Methanol, Acetonitril und Chloroform und unlöslich in Wasser. Die UV- und IR-Spektren der Substanz weisen eine sehr große Ähnlichkeit mit den Spektren von **22** auf. Im IR-Spektrum deuten eine breite Bande bei 3426 cm<sup>-1</sup> und eine Bande bei 1706 cm<sup>-1</sup> auf Hydroxyl- und Carbonylgruppen hin.

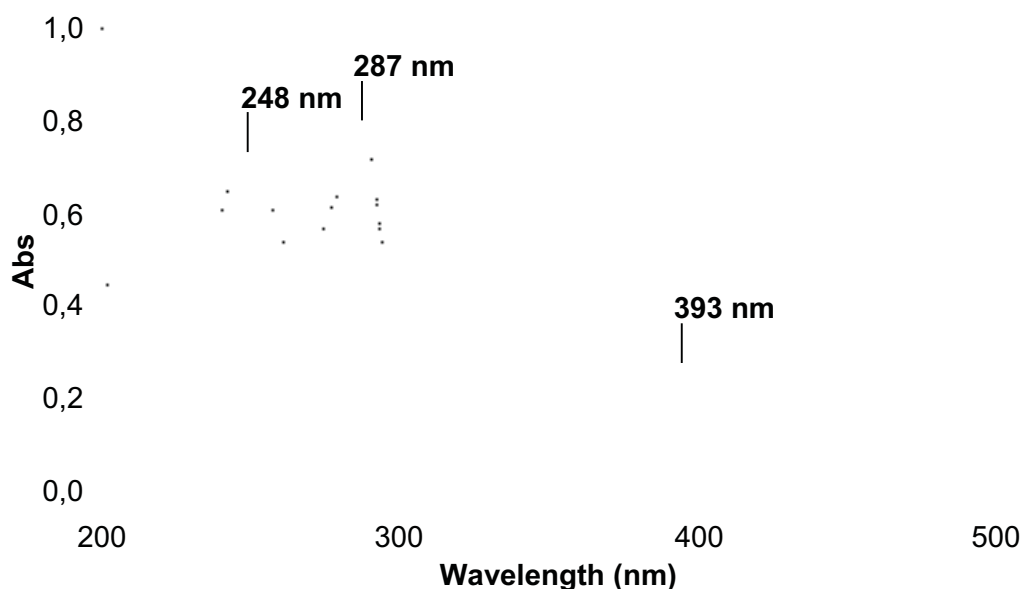


Abbildung 55: UV-Absorptionsspektrum von Chryso mycin A (**11**).

Das EI-Massenspektrum zeigt einen Molpeak bei  $m/z = 508$ , im ESI erhält man das  $[M+H]^+$ -Ion, welches einer Masse von 509 entspricht. Die Hochauflösung dieses Peaks bestätigt die vermutete Summenformel von  $C_{28}H_{28}O_9$ . Wie erwartet deutet das  $^1H$ -NMR-Spektrum ebenfalls auf eine gewisse Strukturähnlichkeiten mit **22** - einen Zuckerrest und ein aromatisches Aglykon hin. Man kann ein anomeres Proton bei  $\delta_H = 6.01$  ppm ( $J = 9.6$  Hz) beobachten, das aufgrund der Kopplungskonstante auf eine  $\beta$ -Konformation des Zuckers hindeutet. Des weiteren ist im Vergleich zu dem Protonenspektrum von **22** das Signal einer zusätzlichen Methylgruppe bei  $\delta_H = 1.27$  ppm erkennbar, welches zum Dublett aufgespalten ist. Die  $^{13}C$ -NMR-Daten sind ebenfalls vergleichbar mit denen des Gilvocarcins V (**22**). Bei  $\delta_C = 17.1$  ppm ist die zusätzliche Methylgruppe zu erkennen. Die Signale des Zuckerteils sind im Vergleich zu **22** um 5 - 10 ppm zu höherem Feld verschoben. Das übrige Spektrum ist bis auf sehr geringe Verschiebungen mit **22** identisch. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit den Originaldaten<sup>132</sup> von Chryso mycin A (**11**) zeigt eine eindeutige Übereinstimmung.

Chryso mycin A (**11**) wurde erstmals 1955 aus einem Bodenbakterium isoliert,<sup>188</sup> die Struktur allerdings erst 1982 von *U. Weiß* publiziert.<sup>189</sup> Die Konstitution und absolute Konfiguration des Zuckers Virenose wurden durch  $^1H$ -NMR-spektroskopische Untersuchungen, chemische Abbaureaktionen und Synthese eindeutig als  $\beta$ -D-festgelegt.<sup>189,190</sup> Seit seiner Entdeckung war Chryso mycin A (**11**) Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, nicht nur wegen der antibakteriellen und antifungischen Wirkung,<sup>188</sup> sondern auch wegen der beachtlichen Antitumoraktivität.<sup>191</sup> Die Ursachen dieser Aktivität wurden von verschiedenen Arbeitskreisen untersucht. **11** hemmt die Biosynthese sowohl der DNA, RNA, als auch der Proteine, interkaliert in die DNA<sup>159</sup> und inhibiert die menschliche Topoisomerase II.<sup>168</sup> Über den Vergleich der Wirksamkeiten von Gilvocarcin V (**22**) und Chryso mycin A (**11**) werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. *T.T. Wei et. al* beschreibt **22** als doppelt so wirksam wie **11**.<sup>159</sup> Im Gegensatz dazu, wurden sie von *R. K. Elespuru et. al* als in ihrer Aktivität identisch beschrieben. Eine Korrelation zwischen Photosensibilisierung und Antitumoraktivität wie bei Gilvocarcin V (**22**) wurde für **11** ebenfalls gefunden.<sup>164</sup>

### 2.3.2. Chryso mycin B (**34**)

Die HPLC-chromatographische Aufreinigung des Peaks mit der Retentionszeit von 18.1 min lieferte einen gelben Feststoff, der die gleichen Lösungseigenschaften wie Chryso mycin A (**11**) aufweist. Das EI-Massenspektrum zeigt einen Peak höchster

Masse bei  $m/z = 496$ . Eine Hochauflösung des Molpeaks ergibt in Übereinstimmung mit den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten eine Summenformel von  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_9$ . Die Auswertung der NMR-Daten erfolgte aus einem Mischspektrum von **11** und **34**. Die Signale der einzelnen Komponenten konnten im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum mit Hilfe der Integralverhältnisse unterschieden werden, allerdings kommt es in einigen Fällen zu Überlagerungen der Signale der beiden Einzelkomponenten. Das Protonenspektrum zeigt eine Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.41$  ppm, das entsprechende Signal im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum findet sich bei  $\delta_{\text{C}} = 21.1$  ppm. Durch einen Vergleich mit den Literaturdaten<sup>187</sup> ließ sich die Verbindung als Chryso mycin B (**34**) identifizieren, die meist als Minderkomponente neben Chryso mycin A (**11**) auftritt.<sup>188</sup> Neben einer antibakteriellen und antifungischen Wirkung, weist **34** ebenfalls eine cytostatische Aktivität auf. Jedoch ist **34** nur halb so wirksam wie **11**.<sup>191</sup>

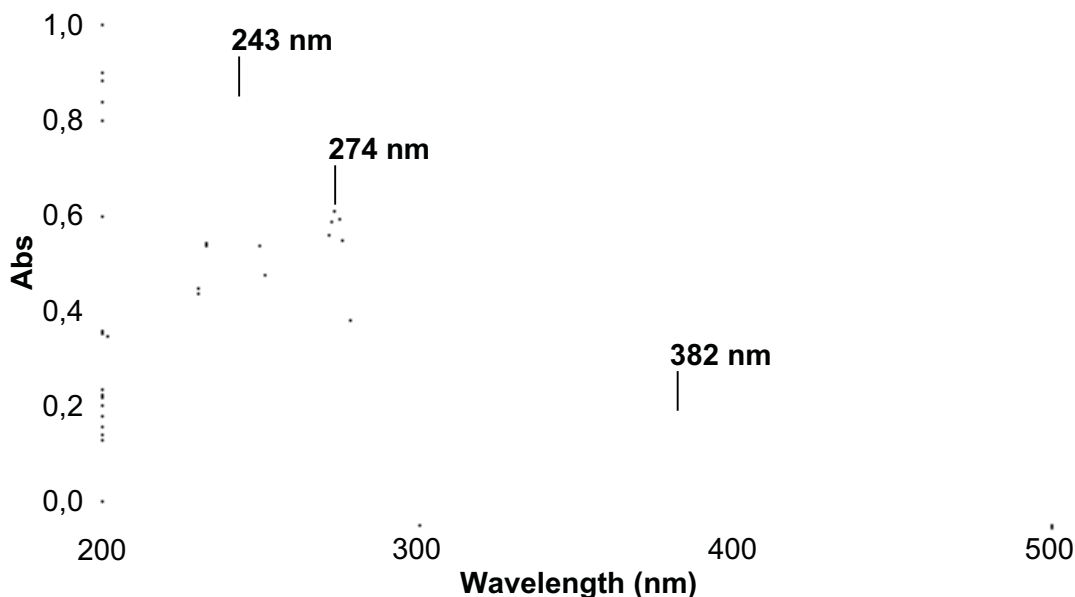


Abbildung 56: UV-Absorptionsspektrum von Chryso mycin B (**34**).

### 2.3.3. Chryso mycin C (**35**)

Der gelbliche Feststoff **35** ist wie die oben beschriebenen Verbindungen der Gilvocarcin-Reihe nur in DMSO und THF gut löslich. Dem UV-Spektrum konnte aufgrund der Absorptionsmaxima bei 243, 274, 306 und 383 nm entnommen werden, daß es sich um ein GilvocarcinGrundgerüst handelt, welches in 8-Position einen aliphatischen Substituenten trägt. Das ESI- und das EI-Massenspektrum zeigten jeweils eine Molmasse von 510 g/mol, die Differenz von 2 Masseneinheiten im

Vergleich zu Chrysozoin A (**11**) weist auf eine Ethylgruppe an C-8-Position anstelle einer Vinylereinheit hin.

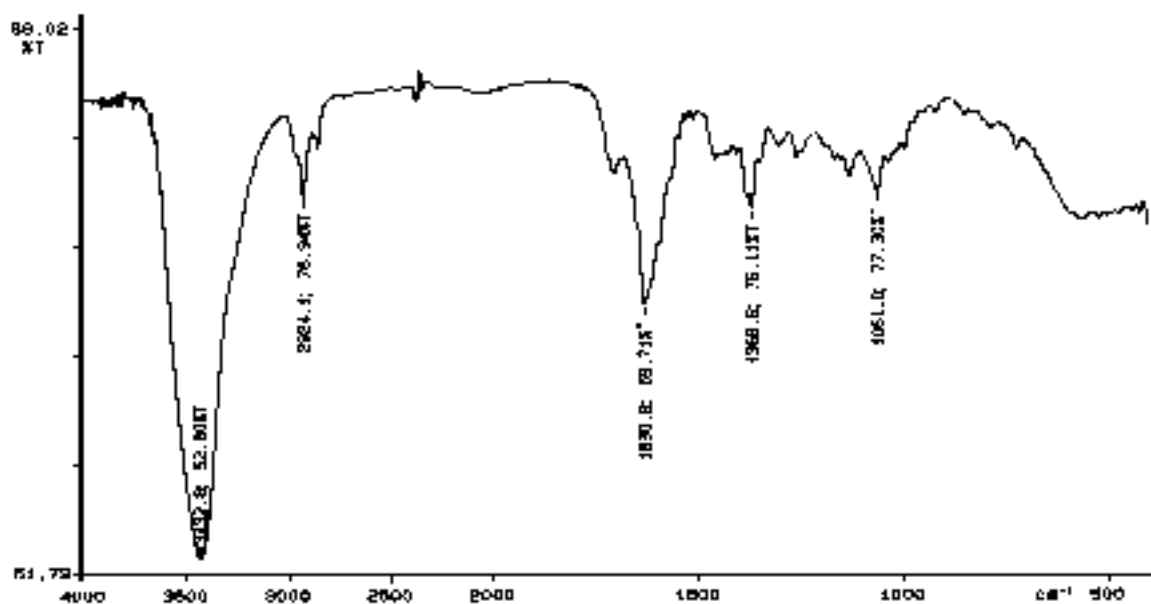


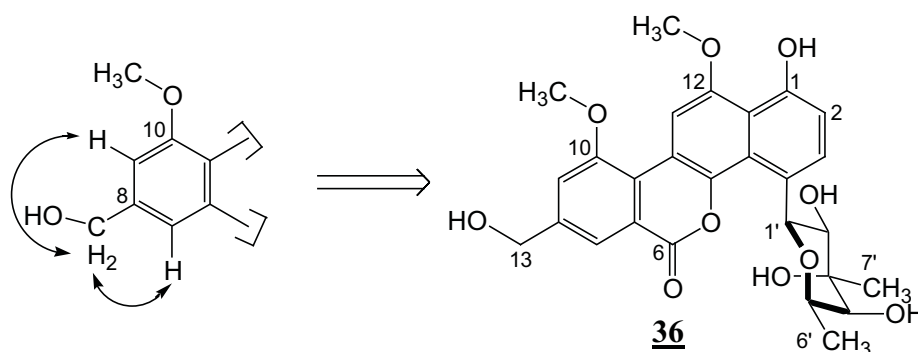
Abbildung 57: IR-Spektrum von Chrysozoin C (**35**).

Die Massenhochauflösung bestätigt die vermutete Summenformel von  $C_{28}H_{30}O_9$ . Da für die Strukturaufklärung nur 0.3 mg zur Verfügung standen, wurde auf die Aufnahme von NMR-Spektren verzichtet. Chrysozoin C (**35**) wurde erstmals von *S. Breiding-Mack* in unserer Abteilung massenspektrometrisch nachgewiesen.<sup>132</sup> Über eine biologische Aktivität von **35** ist bislang nichts bekannt.

#### 2.3.4. Chrysozoin D (**36**)

Der gelbe, in DMSO gut, in Methanol mäßig lösliche Feststoff lag in einer Menge von 1.2 mg vor. Aufgrund der Ähnlichkeit des UV-VIS- und des IR-Spektrums dieser Verbindung mit den anderen Chrysozoinen lag der Verdacht nahe, daß es sich bei diesem Sekundärstoff um ein weiteres Derivat dieser Verbindungsklasse handeln könnte. Die Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei 277 und 383 nm lassen vermuten, daß dieses Derivat an C-8 des Aglykons einen Rest trägt, der das konjugierte System des Aglykons nicht beeinflußt. Aus EI- und ESI- Massenspektren wurde eine Molmasse von 512 g/mol erhalten, die hochaufgelöste Masse liefert die Summenformel  $C_{27}H_{28}O_{10}$ . Mit diesen Daten wurde eine Datenbankrecherche sowohl im "Dictionary of Natural Products on CD-ROM"<sup>181</sup> als auch in der "Naturstoffdatenbank AntiBase"<sup>192</sup> durchgeführt. Es war in beiden Datenbanken kein

passender Strukturvorschlag zu finden. Das Protonenspektrum unterscheidet sich nur wenig von dem des Chrysomycins B (**34**). So fehlt das im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **34** enthaltene Signal für die Methylgruppe, dafür tritt ein zusätzliches Singulett mit einer Intensität von zwei bei  $\delta_{\text{H}} = 4.69$  ppm auf. Die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten lassen in Verbindung mit der Summenformel auf eine Hydroxymethylgruppe schließen, die durch das entsprechende Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 62.9$  ppm im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum bestätigt wird. Die Position der Hydroxymethylgruppe ergibt sich aus einem  $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -Experiment, in dem man sowohl eine Korrelation zwischen dem 13- $\text{H}_2$ -Signal und dem als Singulett erscheinenden Signal für 7-H beobachtet, als auch zwischen dem 13- $\text{H}_2$ - und dem 9-H-Signal.

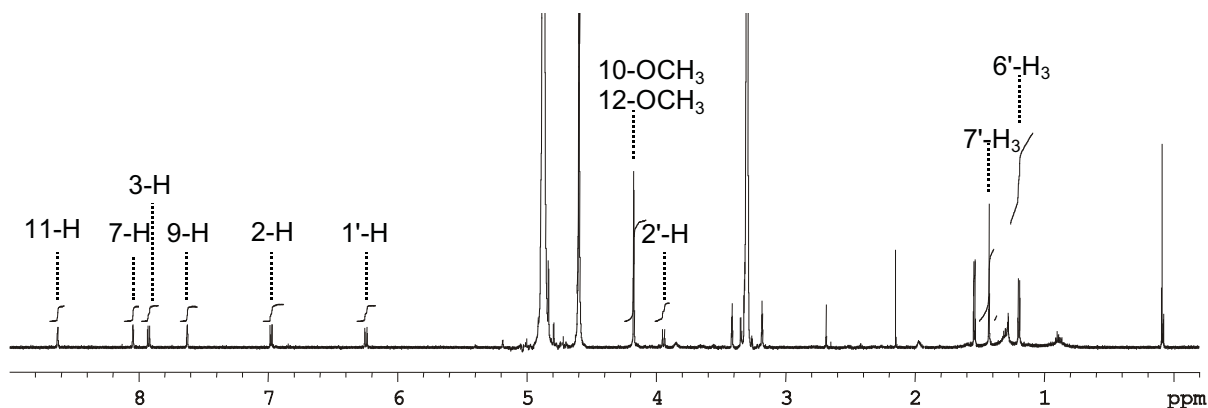


**Abbildung 58:** Im  $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -NMR-Spektrum (600 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) beobachtete Korrelationen für die in **36** enthaltene Hydroxymethylgruppe.

In Anlehnung an **34** ließ sich mit Hilfe dieses Experimentes die Struktur von Chrysomycin D (**36**) aufklären. **36** stellt ein neues, bisher nicht bekanntes Chrysomycin-Derivat dar. Es leitet sich formal von dem oben beschriebenen Chrysomycin B (**34**) durch Oxidation der Methylgruppe zur beschriebenen Hydroxymethylgruppe ab.

### 2.3.5. Chrysomycin E (**37**)

Chrysomycin E (**37**) wurde als hellgelber, gut in DMSO und Methanol löslicher Feststoff in einer Ausbeute von 0.2 mg/L isoliert. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum unterscheidet sich nur wenig von dem des Chrysomycins B (**34**). Das im Spektrum von **34** enthaltene Singulett-Signal der Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.41$  ppm fehlt jedoch. Die Signale für 7-H bei  $\delta_{\text{H}} = 8.05$  ppm und für 9-H bei  $\delta_{\text{H}} = 7.62$  ppm sind im Vergleich zu denen im Protonenspektrum von **34** leicht tieffeldverschoben. Zusätzliche Signale, die auf einen Substituenten an C-8 hinweisen, sind nicht zu erkennen.

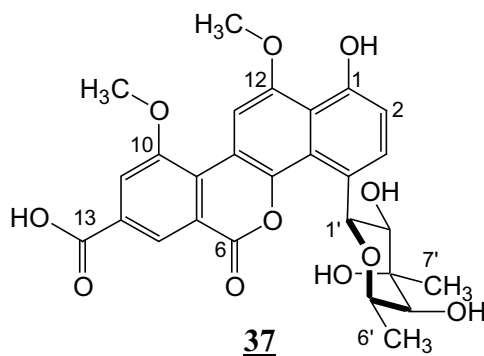


**Abbildung 59:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **37** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

In Verbindung mit dem UV-VIS-Spektrum (Absorptionsmaxima bei 274 und 383 nm) konnte wiederum auf ein Chrysomycin-Derivat mit einer Gruppe an C-8 Position geschlossen werden, die das konjugierte Ringgerüst nicht beeinflusst. Durch Aufnahme eines ESI-Massenspektrums konnte ein Molekulargewicht von 526 g/mol bestimmt werden. Eine Hochauflösung war nicht zu erhalten, da **37** nicht im EI-MS-Experiment meßbar war. Subtrahiert man von dem im ESI-Experiment bestimmten Molekulargewicht die Summen der Massen für den Zucker und das Aglykon, so verbleiben für den Rest an C-8 45 Masseneinheiten, was die Anwesenheit einer Carboxylgruppe an C-8-Position nahelegt. Eine Carboxylgruppe würde zum einen das Fehlen eines Signals im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und zum anderen die Tieffeldverschiebung der Signale von 7-H und 9-H relativ zur Verbindung **34** mit einer Methyl-Seitenkette erklären, da sie mit ihrem -M-Effekt die Elektronendichte im aromatischen Ringsystem herabsetzt.

Aufgrund der geringen Substanzmenge war es nicht möglich ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufzunehmen. Eine Datenbankrecherche<sup>181,192</sup> mit den gefundenen Strukturdaten führte zu keinem Ergebnis. Die Struktur von **37** ist somit in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Wie auch schon bei Verbindung **36** handelt es sich bei **37** um ein formal an der Methylgruppe in 8-Position oxidiertes Derivat von **34**.



**Tabelle 21:**  $^1\text{H-NMR}$ -Daten (in ppm) der Chrysomycine.

H	<b><u>11</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>a</sup>	<b><u>34</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>a</sup>	<b><u>36</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>b</sup>	<b><u>38</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>b</sup>	<b><u>37</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>c</sup>	<b><u>39</u></b> ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>c</sup>
1-OH	9.77	9.77	9.84	9.80	-	-
2-H	6.94	6.93	6.95	6.94	6.98	6.94
3-H	7.83	7.82	7.83	7.82	7.92	7.89
7-H	7.91	7.65	7.95	7.90	8.05	7.72
9-H	7.60	7.32	7.60	7.52	7.62	7.09
11-H	8.34	8.31	8.51	8.72	8.63	8.74
10-OCH <sub>3</sub>	4.08	4.08	4.13	-	4.18	-
12-OCH <sub>3</sub>	4.04	4.04	4.12	4.10	4.18	4.13
1'-H	6.01	6.01	6.03	6.03	6.25	6.25
2'-H	3.65-3.75	3.65-3.75	3.68	3.67	3.93	4.01
4'-H	3.15	3.15	3.16	3.14-3.17	nd	nd
5'-H	4.54	4.54	4.51	4.51	nd	4.77
6'-CH <sub>3</sub>	1.03	1.03	1.01	1.01	1.19	1.21
7'-CH <sub>3</sub>	1.26	1.26	1.35	1.23	1.43	1.44
2'-OH	4.15-4.25	4.15-4.25	4.01	4.12-4.14	-	-
3'-OH	4.15-4.25	4.15-4.25	nd	4.12-4.14	-	-
4'-OH	4.61	4.61	nd	4.51	-	-
13-H <sub>3</sub>	-	2.41	-	-	-	2.44
13-H <sub>2</sub>	-	-	4.69	-	-	-
13-H	6.87	-	-	6.87	-	-
14-H <sub>a</sub>	5.45	-	-	5.44	-	-
14-H <sub>b</sub>	6.08	-	-	5.92	-	-

Multiplizitäten und Kopplungskonstanten [Hz] sind dem experimentellen Teil zu entnehmen.

<sup>a</sup>300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO; <sup>b</sup>600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO; <sup>c</sup>600 MHz, CD<sub>3</sub>OD; nd = nicht detektierbar.

### 2.3.6. Chrysomycin A<sub>2</sub> (**38**)

Im HPLC-Chromatogramm fiel ein weiterer Metabolit bei einer Retentionszeit von 16.1 min auf, welcher in einer Ausbeute von 0.4 mg/L als gelber Feststoff erhalten werden konnte. **38** ist in DMSO und Methanol gut löslich, löscht auf DC-Platten bei 254 nm UV-Licht und fluoresziert gelb-grün bei 366 nm. Aus ESI-Massenspektren wurde eine Molmasse von  $m/z = 494$  erhalten, **38** weist damit eine Massendifferenz von minus 14 Einheiten gegenüber **11** auf.

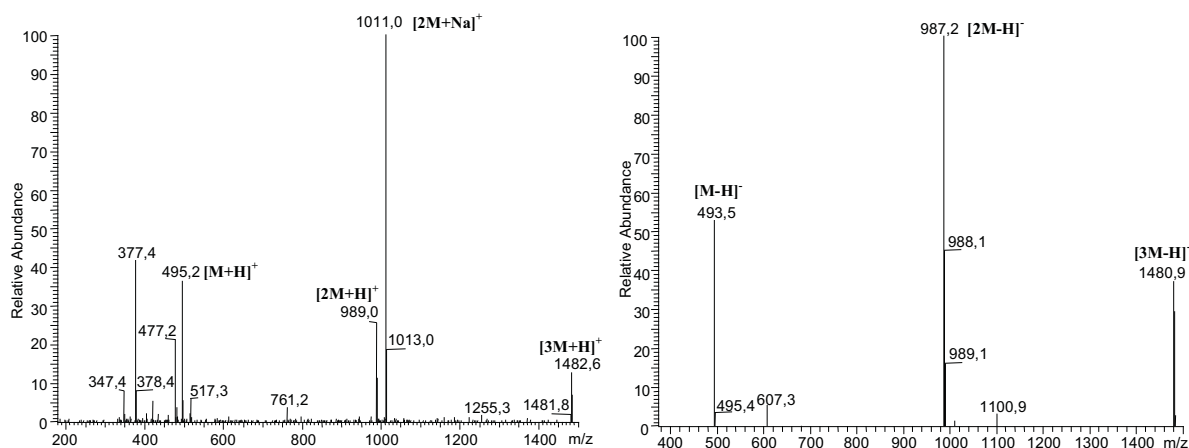
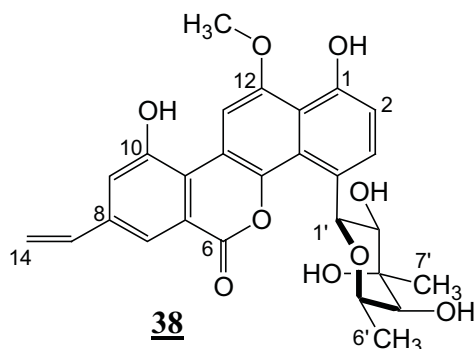


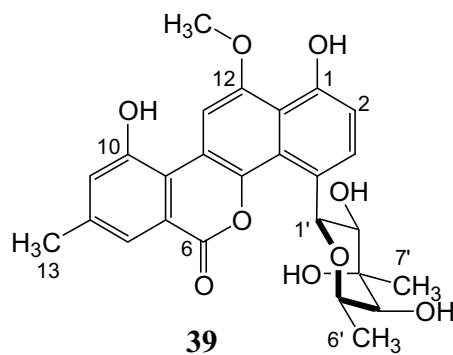
Abbildung 60: ESI-Massenspektrum (positiver und negativer Ionenstrom) von **38**.

Aufgrund der Molmasse und durch ein Vergleich der UV- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mit denen von **11**, **34** und **35** konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei **38** um ein weiteres Chrysomycin-Derivat mit einer Vinylgruppe an 8-Position handelt. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (gemessen in  $d_6$ -DMSO), welches 26 Protonen enthält, ist bis auf das Fehlen eines Methoxy-Signals nahezu identisch mit dem Spektrum von Chrysomycin A (**11**), was in Verbindung mit der gefundenen Molmasse für eine Struktur mit einer Hydroxyl- statt einer Methoxygruppe an C-10 oder C-12 spricht. Das  $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -Spektrum zeigt dementsprechend auch ein Korrelationssignal zwischen 11-H und 12- $\text{OCH}_3$ , jedoch nicht zwischen 9-H und dem fehlenden 10- $\text{OCH}_3$ . Dies deutet darauf hin, das es sich bei diesem Metaboliten um ein an 10-OH demethyliertes Chrysomycin A handelt, das in Anlehnung an **11** die Bezeichnung Chrysomycin A<sub>2</sub> erhält. Die Struktur von **38** ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden und somit neu.



### 2.3.7. Chrysofuran B<sub>2</sub> (**39**)

Das gelbe Chrysofuran B<sub>2</sub> ist etwas hydrophiler als Chrysofuran A<sub>2</sub> (**38**) und ist in Methanol sowie DMSO gut löslich. Für die Strukturaufklärung standen 0.6 mg zur Verfügung. Das Protonenspektrum von **39**, aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD zeigt große Ähnlichkeit mit dem von Chrysofuran B (**34**). Es sind Signale für 26 Wasserstoffatome zu erkennen, aus denen sich sowohl das Chrysofuran-Aglykon als auch die Zuckereinheit ableiten lassen. Jedoch fehlt im Vergleich zu **34** das Singulett-Signal einer der beiden Methoxygruppen. Ein ESI-Experiment ergab eine Molmasse von 482 g/mol. Diese gegenüber **34** um 14 Einheiten geringere Masse deutet in Verbindung mit dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum auf das Fehlen einer Methoxygruppe hin. Die Position der Hydroxylgruppe wurde durch ein <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-Experiment bestimmt, in dem eine Korrelation zwischen 12-OCH<sub>3</sub> und dem Singulett-Signal von 11-H beobachtet wurde, während das Signal von 9-H keine Korrelationen aufweist. Eine Datenbanksuche<sup>192,181</sup> unter Berücksichtigung der gefundenen Daten führte zu keinem Ergebnis. Chrysofuran B<sub>2</sub> ist somit ein neues Chrysofuran-Derivat und bildet zusammen mit **38** die demethylierten Äquivalenten zu den am häufigsten isolierten Metaboliten **11** und **34**.



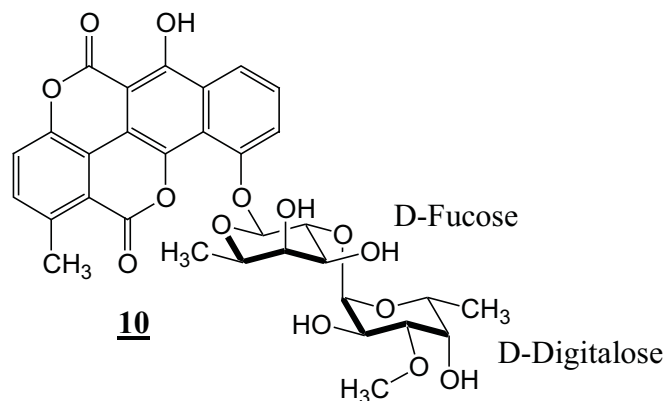
## 2.4. Versuche zur Interaktion des Stammes Tü 2471 mit *Streptomyces* sp.

### Stamm Tü 6024

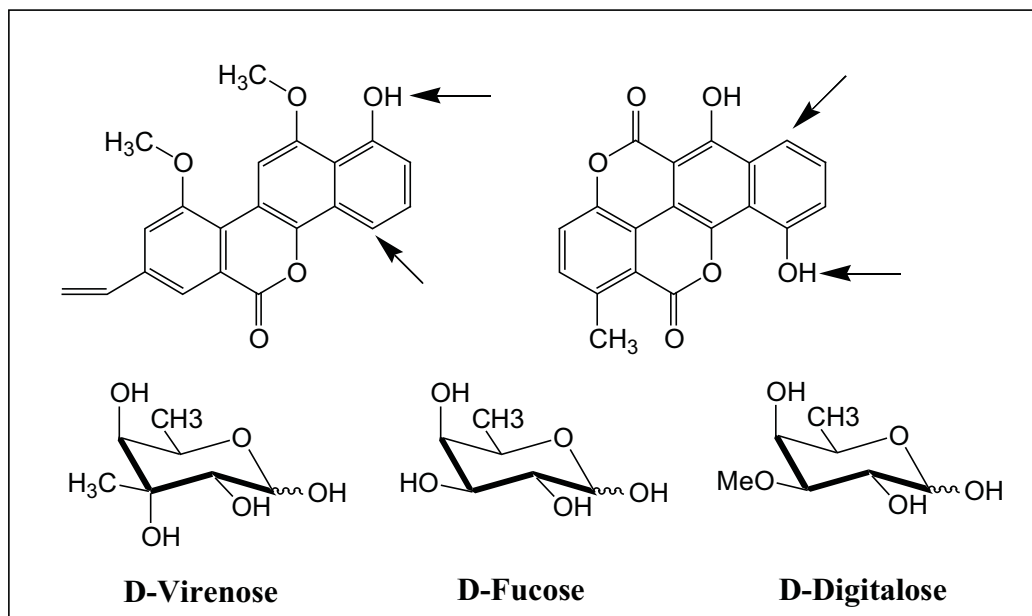
#### 2.4.1. Allgemeines

Mischfermentationsansätze wurden bisher in unserer Abteilung hauptsächlich durchgeführt, um Kommunikationsphänomene bei Bakterien zu untersuchen.<sup>193</sup> Einen neuartigen Ansatz zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese mittels Mischfermentation stellte *I. Papastavrou* in ihrer Dissertation<sup>194</sup> vor. Sie kultivierte den Stamm Tü 3634 mit seiner unspezifisch arbeitenden Rhamnosyltransferase unter anderem mit dem Pyrrolcarbonsäuren produzierenden Stamm *S. griseoflavus* W 384 und erhielt 2-Pyrrolyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, ein für den Stamm neues Acylrhamnosid. Den im folgenden beschriebenen Mischfermentationen liegt ebenfalls die Idee zugrunde, die Sekundärmetaboliten eines Fremdstammes dem Stamm Tü 2471 als potentielle Vorläufer anzubieten.

Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Chryso mycin A (**11**) und Chartreusin (**10**) lag die Vermutung nahe, daß durch Co-Fermentation der beiden Produzentenstämme neue Hybrid-Antibiotika gebildet werden könnten.



**10** und **11** weisen ein ähnliches Aglykon auf. Die 2'-D-Digitalosyl-D-Fucose des Chartreusins (**10**) ist jedoch O-glykosidisch gebunden, während die D-Virenose des Chryso mycins A (**11**) C-glykosidisch an das Aglykon bindet. Es sollte somit überprüft werden, ob die Biosyntheseenzyme der beiden Bakterienstämme jeweils das Aglykon bzw. die Zuckereinheiten des anderen Stammes als mögliche Vorläufer akzeptieren und auf diese Weise neue Chryso mycine und Chartreusine mit veränderter glykosidischer Bindung und variierten Zuckereinheiten erhalten werden können. In Abbildung 61 sind die möglichen Variationsbindungsstellen aufgezeigt.

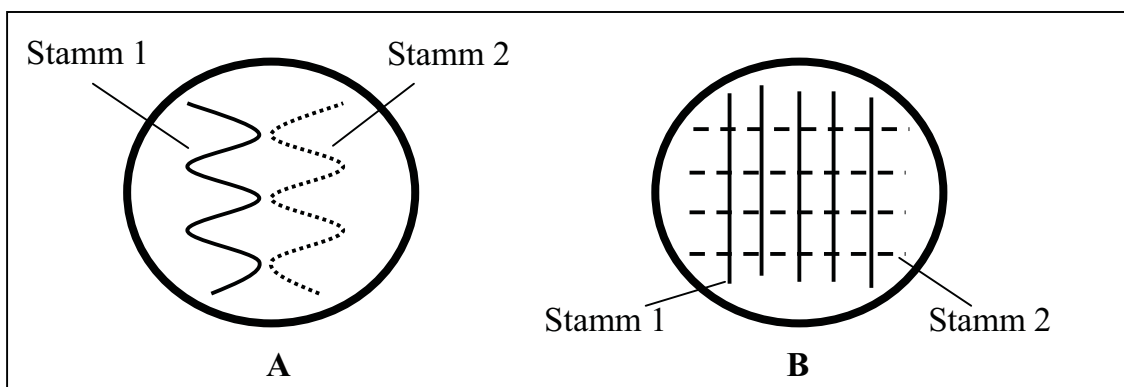


**Abbildung 61:** Mögliche Bausteine für neue Chrysoerythrin- und Chartreusin-Derivate.

Als geeigneter Fremdstamm, der auch unter ähnlichen Bedingungen wie Stamm Tü 2471 kultiviert werden kann, wurde *Streptomyces* sp. Tü 6024 gewählt, der neben Streptazolin und den Streptazonen, Chartreusin (**10**) in hoher Ausbeute produziert und in die Kulturbrühe freisetzt.

#### 2.4.2. Plattenausstrichmethoden

Vor einer Flüssigkultivierung in Mischkultur ist es ratsam, einen ersten Eindruck der gegenseitigen Beeinflussung der Stämme zu bekommen. Dafür eignet sich die gemeinsame Inkubation auf einer Agarplatte. Hierzu bieten sich mehrere Ausstrichmethoden<sup>141</sup> an, die Aussagen über unterschiedliche Wechselwirkungen zulassen. Die Methode A, wie in Abbildung 62 zu sehen ist, bedient sich des schlangenförmigen Ausstrichs, bei dem es nicht zum Zell-Zell-Kontakt zwischen den beiden Stämmen kommt. Wechselwirkung tritt nur dann auf, wenn einzelne Metaboliten durch die Agarschicht diffundieren. Gleichzeitig ist in den am weitesten voneinander entfernten Bereichen des Impfausstrichs davon auszugehen, daß keine Beeinflussung durch diffundierte Metaboliten erfolgen kann. Das Wachstumsverhalten bei Zell-Zell-Kontakt kann anhand Methode B beobachtet werden. Allerdings ist hierbei auf die Reihenfolge des Ausstrichs zu achten, da bei dem Kreuzausstrich immer auch Zellen des ersten Stammes mitgeführt werden. Zeigt dieser ein schnelleres Wachstum, kommt es zu einer Überwucherung des anderen Stammes.



**Abbildung 62:** Verschiedene Ausstrichmethoden zur Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung zweier Stämme.

Mit den Stämmen Tü 2471 und Tü 6024 wurden erste Verträglichkeitsuntersuchungen über beide Ausstrichmethoden auf M2Ca-Nährmedien durchgeführt, die Platten wurden dafür 5 Tage lang inkubiert. Parallel wurden Referenzplatten zum Vergleich angefertigt. Der Stamm Tü 6024 zeigte ein stärkeres Wachstum als der Stamm Tü 2471, bei der Ausstrichmethode A war in den Nahbereichen das Wachstum von Tü 6024 unterdrückt, und es konnte dort keine Luftmycelbildung beobachtet werden. Dagegen zeigte der Stamm in den weiter entfernten Bereichen ein normales Wachstum. Tü 2471 wies ein beschleunigtes Wachstum in den Nahbereichen auf, bildete jedoch an den entfernter gelegenen Bereichen nur Substratmycel. Auf den nach Methode B beimpften Agarplatten bilden beide Stämme unabhängig der Ausstrichreihenfolge nur Substratmycel. Bei Tü 2471 konnte an den Enden der Ansatz einer Luftmycelbildung erkannt werden.

### 2.4.3. Mischfermentationen

Der Stamm Tü 6024 wurde von *J. Schimana* in der Arbeitsgruppe Fiedler auf seine Sekundärmetabolitenproduktion<sup>195</sup> untersucht. Aus diesen Arbeiten war bekannt, daß er Chartreusin (**10**) in hohen Ausbeuten im SM-Nährmedium, produziert. Alle Mischfermentationen wurden in Schüttelkolben, befüllt mit SM-Nährlösung, unter den für das Standardscreening üblichen Bedingungen (Kapitel A.IV.1.2.1) durchgeführt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden der Inokulation verwendet. In einem ersten Ansatz wurden Agarstücke je einer gut bewachsenen Agarplatte der beiden Stämme als Inokulum verwendet und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugegeben. In einem zweiten Ansatz wurde mit Vorkulturen angeimpft, welche als Reinkulturen angezogen worden waren. Im Rahmen des ersten Ansatzes wurden Kolben zum einen

gleichzeitig mit Agarstücken beider Stämme angeimpft, zum anderen wurden die Stämme in Reinkultur über einen Zeitraum von 8 Stunden angezogen, bevor zu jeder Kultur ein Stück einer gut bewachsenen Agarplatte des jeweils anderen Stammes hinzugefügt und für 96 Stunden fermentiert wurde. Zum Vergleich wurden jeweils Reinkulturen mitgeführt. In allen Kulturen des ersten Ansatzes konnten außer den bekannten jeweiligen Metaboliten keine neuen Verbindungen beobachtet werden. Bei den Fermentationen mit einem Überschuß an Tü 2471 oder einem gleichen Verhältnis der beiden Stämme konnte **10** nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, wobei eine Fermentation mit einem Überschuß an Tü 6024 die Ausbeute an **11** nicht sehr beeinflußte. Im zweiten Ansatz, mit Vorkulturen als Inokulum, wurde hauptsächlich mit einem Überschuß an Tü 6024 gearbeitet. Dies sollte der Tatsache Rechnung tragen, daß in den vorigen Versuchen die Anwesenheit des Stammes Tü 2471 die Produktion an **10** verringerte. Die Hauptkulturen wurden mit insgesamt 8 mL Vorkultur in den Verhältnissen 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 2:1 (Tü 2471:Tü 6024) angeimpft. In dem Ansatz mit dem Mischungsverhältnis Tü 2471:Tü 6024 (1:3) konnte neben den bekannten Metaboliten eine neue Verbindung bei einem  $R_f$ -Wert von 0.5 detektiert werden. Diese gelbe Verbindung löscht das UV-Licht bei 254 nm, fluoresziert bei 366 nm leicht rötlich und färbt mit Anisaldehyd braun bzw. mit Vanillin-Schwefelsäure dunkelgrün an. Um diese Verbindung in ausreichender Menge zu erhalten wurde die Mischfermentation sowohl im 2-L-Maßstab in Schüttelkolben als auch im 5-L-Maßstab im Biostat-B-Fermenter unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Leider wurde die Substanz in den größeren Fermentationsansätzen nicht mehr produziert.

## 2.5. Beurteilung der Biosyntheseleistung der Stämme Gö 3592/1 und Tü 2471

Im Verlauf dieser Arbeit konnten aus dem Stamm Gö 3592/1 vier Metaboliten isoliert werden, die sich zwei verschiedenen Biosynthesewegen zuordnen lassen und aus dem Stamm Tü 2471 sieben Sekundärstoffe, die eine gemeinsame biosynthetische Herkunft aufweisen. Bei vier der sieben Verbindungen aus Tü 2471 handelt es sich um neue Chrysomycin-Derivate, die bisher weder für diesen Stamm noch überhaupt beschrieben wurden. In dem HPLC-Chromatogramm des SGG-Kultivierungsansatzes von Tü 2471 waren noch weitere Metaboliten sichtbar, jedoch in zu geringen Konzentrationen.

Die unter allen Bedingungen von dem Stamm Gö 3592/1 produzierte Hauptkomponente Gilvocarcin V (**22**) und ihre häufig auftretende Begleitkomponente

Gilvocarcin M (**24**) werden im Typ-II-Polyketidstoffwechsel gebildet. Ferrioxamin E (**29**) gehört zur Klasse der peptidischen Verbindungen und wird aus Lysin (Aminosäurepool) und Bernsteinsäure (Carbonsäurepool) aufgebaut. Für Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**) ist die Biogenesequelle in Mikroorganismen nicht bekannt. Einer Vermutung zufolge entstehen diese Verbindungen im Tryptophanstoffwechsel. Diese Vermutung basiert auf der Untersuchung an Vertretern dieser Verbindungsklasse eukaryontischen Ursprungs, z. B. an Kynurensäure (**30**).<sup>196</sup> Ob sich allerdings die Befunde für Eukaryonten auf Mikroorganismen anwenden lassen, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Alle sieben Sekundärmetaboliten aus dem Stamm Tü 2471 gehören wie die Gilvocarcine zu den Typ-II-Polyketiden und entstehen auf einem gemeinsamen Biosyntheseweg.

Im Vergleich zur Biosyntheseleistung der Streptomycetenstämme Gö 40/14<sup>197</sup> und Gö 28,<sup>198</sup> deren Sekundärmetabolismus mehr als fünf verschiedene Biosynthesewege umfaßt, ist das biosynthetische Potential der beiden in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen weniger vielseitig. Nach einem von B. Bethe<sup>197</sup> entworfenen Konzept zur Klassifizierung von Mikroorganismen aufgrund ihrer Biosyntheseleistung im Sekundärstoffwechsel kann der Stamm Gö 3592/1 als "vielseitig, verzweigt und komplex" und der Stamm Tü 2471 als "vielseitig, linear und komplex" eingestuft werden.

## 2.6. Zur biologischen Aktivität der isolierten Substanzen

In ersten Untersuchungen zur biologischen Aktivität wurden die Verbindungen **22**, **23**, **28** und **29** sowie **11**, **34** - **39** im Plattendiffusionstest bezüglich ihrer Wirkung gegen die Testkeime *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* untersucht. Die Ergebnisse der aktiven Substanzen bzw. der Referenzsubstanzen Penicillin und Nystatin sind in Tabelle 22 dargestellt. Wider Erwarten zeigten nur Chrysomycin A (**11**) und B (**34**) eine antimikrobielle Aktivität und das auch nur gegen *B. subtilis* und *S. aureus*, nicht aber Gilvocarcin V (**22**), Gilvocarcin M (**28**)<sup>159</sup> und die Chrysomycine D (**36**), E (**37**), A<sub>2</sub> (**38**) und B<sub>2</sub> (**39**). Ebenfalls erwiesen sich die Verbindungen **23** und **29** als unwirksam gegen die Testkeime.



**Tabelle 22:** Ergebnisse der Plattendiffusionstests.

Metabolit	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Chrysomycin A ( <b>11</b> )	17	10	-	-
Chrysomycin B ( <b>34</b> )	10	7	-	-
Penicillin	48	30	14	-
Nystatin	-	-	-	21

Hemmhofdurchmesser in mm, Konzentration 1 mg/mL, Testplättchendurchmesser 6 mm.

Da bekannt ist, daß es sich bei den Gilvocarcinen und den Chrysomycinen um photosensitive Substanzen handelt, wurden ebenfalls Plattendiffusionstests unter Lichtbestrahlung durchgeführt. Wie in Tabelle 23 zu sehen ist, kam es wiederum nur bei den Metaboliten der Chrysomycin-Reihe zu einer Hemmhofbildung. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Werten aus Tabelle 22, so ist zu erkennen, daß es sowohl bei **11** und **34** als auch bei der Referenzsubstanz zu einer Vergrößerung des Hemmhofes kam. Unter Einfluß von Licht hemmte Chrysomycin A (**11**), im Gegensatz zu dem Test im Dunkeln ebenfalls den Pilz *C. albicans* und auch **35** zeigte diesmal eine biologische Wirkung bei den gram-positiven Bakterien *B. subtilis* und *S. aureus*. Das gram-negative Bakterium *E. coli* wuchs unter Lichteinfluß nicht.

**Tabelle 23:** Ergebnisse der Plattendiffusionstests unter Lichteinfluß.

Metabolit	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Chrysomycin A ( <b>11</b> )	31	33	-	12
Chrysomycin B ( <b>34</b> )	14	14	-	-
Chrysomycin C ( <b>35</b> )	12	17	-	-
Penicillin	70	45	-	-
Nystatin	-	-	-	17

Hemmhofdurchmesser in mm, Konzentration 1 mg/mL, Testplättchendurchmesser 6 mm.

Gilvocarcin V (**22**), M (**28**) und Chrysomycin A (**11**) sowie Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**) und Ferrioxamin E (**29**) wurden außerdem von *W. Beil*<sup>VII</sup> gemäß den NCI-Richtlinien<sup>112</sup> auf cytotoxische Aktivitäten gegen die Tumorzellen HM02 (Magenadenocarcinom), HEPG2 (Lebercarcinom) und MCF (Mammacarcinom) getestet. **23** und **29** zeigten in allen drei Tumorzelllinien bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL (entspricht 0.02 mmol/L bzw. 0.01 mmol/L) keine Wirkung. Dagegen sind **22** und **11** als sehr positiv zu bewerten. Sie zeigen in

allen Zelllinien eine sehr gute Wirkung, sprich sie besitzen TGI-Werte um bzw. deutlich unter 1  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tabelle 24:** Zelllinie HM02 (Magenadenocarcinom)

Metabolit	GI <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	TGI ( $\mu\text{mol/L}$ )	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )
Gilvocarcin V ( <b>22</b> )	0.014	0.075	5.0
Gilvocarcin M ( <b>28</b> )	4.56	>10	>10
Chrysomycin A ( <b>11</b> )	0.018	0.080	5.5

GI<sub>50</sub> = Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

TGI = Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

LC<sub>50</sub> = Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt, d. h. die 24 h nach Aussaat die vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.

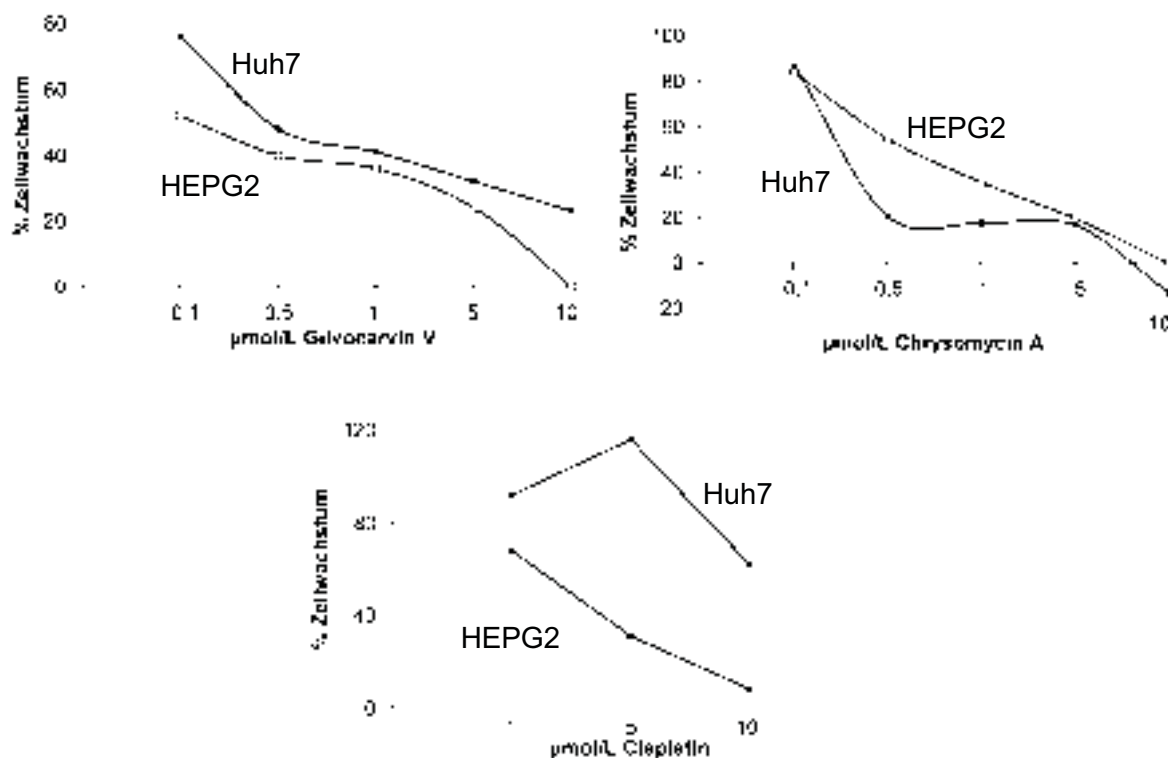
**Tabelle 25:** Zelllinie HEPG2 (Lebercarcinom)

Metabolit	GI <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	TGI ( $\mu\text{mol/L}$ )	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )
Gilvocarcin V ( <b>22</b> )	0.65	1.20	>10
Gilvocarcin M ( <b>28</b> )	3.11	>10	>10
Chrysomycin A ( <b>11</b> )	0.20	1.50	>10

**Tabelle 26:** Zelllinie MCF7 (Mammacarcinom)

Metabolit	GI <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	TGI ( $\mu\text{mol/L}$ )	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )
Gilvocarcin V ( <b>22</b> )	0.080	0.36	>10
Gilvocarcin M ( <b>28</b> )	2.28	5.81	>10
Chrysomycin A ( <b>11</b> )	0.092	0.31	7.6

Aufgrund der sehr guten Wirkung von Gilvocarcin V (**22**) und Chrysomycin A (**11**) wurden diese Substanzen in den Leberzelllinien HEPG2 und Huh7 vergleichend getestet.<sup>vii</sup> Im Gegensatz zu HEPG2- haben Huh7-Zellen ein mutiertes p53-Gen, so daß bei ihnen keine Apoptose induziert werden kann. Huh7-Zellen sind somit nicht sensitiv gegenüber klassischen Cytostatika, wie Cisplatin und Vinblastin.<sup>199</sup> Wie in Abbildung 63 zu sehen ist, zeigen **22** und **11** im Gegensatz zu Cisplatin, jeweils eine fast identische Wirkung in Huh7- und HEPG2-Zellen. Diese Befunde zeigen deutlich, daß diese beiden Metaboliten zum einen in p53-negativen Zellen wirksam sind und daß sie folglich ihre cytotoxische Wirkung über einen anderen Wirkmechanismus ausüben als die "klassischen" Cytostatika.



**Abbildung 63:** Dosis-abhängiger Cytotoxizitäts-Assay an HEPG2- und Huh7-Zellen.

Weiterhin wurden mit Gilvocarcin V (**22**) Zellzyklusuntersuchungen<sup>VIII</sup> sowohl an der Mammacarcinom-(MCF7)- als auch an der Magenadenocarcinom-(HM02)-Zelllinie durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 zusammengefasst. Eine Erläuterung zu den einzelnen Phasen wurde bereits in Kapitel A.III.4.2 gegeben. **22** wirkt in der MCF7-Zelllinie phasenspezifisch, die Substanz arretiert die Zellen in der S-Phase. Diese Wirkung ist verbunden mit einer Abnahme der Zahl der Zellen in der Ruhephase (G1). In der Magencarcinom-Zelllinie (HM02) arretiert **22** die Zellen initial in der G2/M-Phase, was ebenfalls die Zahl der Zellen in der Ruhephase (G1) verringert, wie Tabelle 28 zu entnehmen ist. Bei höheren Konzentrationen bzw. bei einer Verlängerung der Inkubationszeit wurde eine Abnahme an Zellen in der G2/M- und eine Zunahme der Zellen in der S-Phase gefunden. Demnach ist die Hauptwirkung von **22** der initiale G2/M-Arrest.

**Tabelle 27:** Zellzyklusuntersuchungen in der Mammacarcinom-Zelllinie (MCF7).

	Sub G1 (Apoptose)	G1	S	G2/M
Kontrolle <sup>a</sup>	8.2 ± 2.2%	59 ± 5%	11 ± 0.5%	20.7 ± 1.7%
Gilvocarcin V ( <b>22</b> ) <sup>b</sup>	7.5 ± 2%	48 ± 2.7%*	26 ± 2.5%*	18.7 ± 3.2%

Werte: Mittelwert ± SE von vier unabhängigen Experimenten; \*p<0.05 (t-Test)

<sup>a</sup>Lösungsmittelkontrolle, <sup>b</sup>Konzentration 0.01 µg/mL, Inkubationszeit: 24 h.

**Tabelle 28:** Zellzyklusuntersuchungen in der Magenadenocarcinom-Zelllinie (HM02).

	Sub G1 (Apoptose)	G1	S	G2/M
Kontrolle <sup>a</sup>	7.7 ± 1.6%	60 ± 2%	17 ± 1.2%	16 ± 0%
Gilvocarcin V ( <b>22</b> ) <sup>b</sup>	9.5 ± 0.5%	35 ± 15%*	17.5 ± 4.5%	38.5 ± 11%*

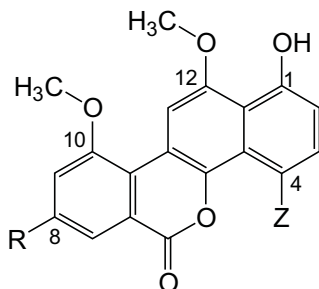
Werte: Mittelwert ± SE von vier unabhängigen Experimenten; \*p<0.05 (t-Test)

<sup>a</sup>Lösungsmittelkontrolle, <sup>b</sup>Konzentration 0.01 µg/mL, Inkubationszeit: 24 h.

## 2.7. Weitere Metaboliten der Gilvocarcin-Reihe

Die Gilvocarcine gehören, wie ihre strukturverwandten Verbindungen, die Chrysomycine und Ravidomycine,<sup>200,201</sup> zu einer Verbindungsklasse von Aryl-C-Glykosid-Antibiotika.<sup>202</sup> Wie Abbildung 64 zu entnehmen ist, haben diese Verbindungen ein gemeinsames tetracyclisches, aromatisches, [6*H*-Benzo[*d*]naphtho[1,2-*b*]pyran-6-on]-Grundgerüst, an das C-glykosidisch unterschiedliche Zucker (Z) in C-4 Position gebunden sind. Die Variation der Zuckereinheiten tritt nur in voneinander verschiedenen Produzentenstämmen auf. Innerhalb eines Stammes wurden keine Variationen des Zuckers beobachtet, jedoch kann in diesem Fall der Substituent (R) an C-8 des produzierten Aryl-C-Glykosid-Antibiotikums variieren. Als Hauptkomponente tritt stets die Verbindung mit R = Vinyl auf. Ein Methyl- und ein Ethylsubstituent an C-8-Position sind nur bei den Gilvocarcinen und Chrysomycinen beschrieben worden, wobei das Methylderivat häufig als Begleitkomponente zum Vinylderivat zu finden ist. Von den Ravidomycinen konnten bisher drei Derivate aus Streptomyceten-Kulturen isoliert werden. Als C-8-Substituent wurden bei diesen Verbindungen wiederum eine Vinylgruppe, sowie als deren formal oxidierte Formen eine 1-Hydroxyethyl- und eine Oxiranyleinheit gefunden. In Abbildung 64 sind die wichtigsten aus Streptomyceten isolierten Metaboliten dieser Reihe aufgelistet. Des weiteren sind Verbindungen mit

dem selben Aglykon (Defucogilvocarcin) aus Streptomyceten erhalten worden, die weitere Variationen im Zuckergerüst aufweisen.<sup>203,204,205,206</sup>



Z	R	Name
		<b>22</b> <sup>155</sup>
	H <sub>3</sub> C—	<b>28</b> <sup>174</sup>
$\beta$ -D-Fucose	H <sub>3</sub> C—H <sub>2</sub> C—	Gilvocarcin E ( <b>43</b> ) <sup>155</sup>
		<b>11</b> <sup>189</sup>
	H <sub>3</sub> C—	<b>34</b> <sup>189</sup>
	H <sub>3</sub> C—H <sub>2</sub> C—	<b>35</b> <sup>132</sup>
$\beta$ -D-Virenose	HO—H <sub>2</sub> C—	<b>36</b>
		<b>37</b>
		Ravidomycin ( <b>44</b> ) <sup>200</sup>
		SS 50408 A ( <b>45</b> ) <sup>207</sup>
$\beta$ -Ravidosamin		SS 50408 D ( <b>46</b> ) <sup>207</sup>

**Abbildung 64:** Tetracyclisches Grundgerüst sowie Substitutionsmuster wichtiger Vertreter der Gilvocarcin-Gruppe.

## V. Zusammenfassung der Ergebnisse

### Viscotoxine aus *Viscum album* L.

- 1) Um Viscotoxine einzeln oder im Gemisch eindeutig identifizieren zu können, wurde eine HPLC-Analytik mit Referenzsubstanzen eingerichtet und optimiert.
- 2) Die Identifizierung der Referenzsubstanzen erfolgte durch Massenspektrometrie. Für die literaturbeschriebene, jedoch nicht näher bestimmte Verbindung U-PS (**17**) sowie für die unbekannte Verbindung **18** wurden die hochaufgelösten Molekülmassen bestimmt. Für alle untersuchten Viscotoxine, mit Ausnahme von **17** und **18**, konnte ein Phosphataddukt nachgewiesen werden.
- 3) Zur Gewinnung hochreiner Viscotoxine aus Pflanzenmaterial wurde ein effizientes Isolierungs- und Aufreinigungsverfahren unter Vermeidung phosphathaltiger Lösungsmittel entwickelt.
- 4) Aus Pappelmisteln wurden die Viscotoxine A1 (**12**), A2 (**13**), A3 (**14**), B (**15**) und 1-PS (**16**) isoliert und anhand von HPLC und ESI-Massenspektrometrie identifiziert. Für alle Verbindungen konnte das entsprechende Phosphataddukt nachgewiesen werden. Die aus hochauflösender Massenspektrometrie erhaltenen monoisotopischen Molekülmassen für Viscotoxin A1 (**12**), A2 (**13**) B (**15**) und 1-PS (**16**) weichen geringfügig aber signifikant von den für die Literatursequenzen zu erwartenden Werten ab. Im Fall von Viscotoxin A2 konnte gezeigt werden, daß die isolierte Substanz nicht mit der Referenzsubstanz übereinstimmt, obwohl sie durch HPLC und ESI-MS nicht unterscheidbar waren. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanzen wurden diskutiert, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.
- 5) Die Identität des isolierten VT A3 (**14**) mit der literaturbeschriebenen Verbindung konnte durch ESI-FT-ICR, Primärstrukturanalyse mittels Tandem-Massenspektrometrie sowie durch Röntgenstrukturanalyse eindeutig nachgewiesen werden. Die dreidimensionale Kristallstruktur von **14** wird mit der durch <sup>1</sup>H-NMR-Experimente ermittelten Struktur und mit den Strukturen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thioninen verglichen.
- 6) Ebenfalls aus Pappelmisteln wurde die bisher unbekannte Verbindung Viscotoxin B2 (**19**) isoliert. Die Primärstruktur dieser neuen Verbindung wurde durch Röntgenstrukturanalyse weitgehend aufgeklärt. Die Zugehörigkeit von **19** zu der Klasse der Viscotoxine ergibt sich aus der ermittelten Aminosäuresequenz, die

- eine große Übereinstimmung mit der Sequenz von VT B (**15**) aufweist. Die dreidimensionale Struktur von **19** zeigt von der des VT A3 (**14**) kaum Abweichungen.
- 7) Das Mikroprotein U-PS (**17**) wurde aus Kiefernmisteln isoliert und mit Hilfe der HPLC sowie durch ESI- und hochauflösende ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie charakterisiert. Durch Edman-Abbau sowie MS/MS-Studien wurden die ersten 32 Aminosäuren der Primärstruktur aufgeklärt. Anhand einer Datenbankrecherche konnte das Peptid U-PS (**17**) der Familie der  $\gamma$ -Thionine zugeordnet werden. **17** ist somit kein Viscotoxin, entsprechende Literaturangaben müssen korrigiert werden.
  - 8) Neben **17** konnten in dem Kiefernmistelextrakt auch die Viscotoxine A1 (**12**), A2 (**13**), A3 (**14**), B (**15**) und 1-PS (**16**) durch HPLC-MS nachgewiesen werden.
  - 9) Die aus Pappel- und Kiefernmisteln isolierten Verbindungen **12** - **17** und **19** zeigten in Plattendiffusionstests keine antimikrobielle Wirkung.
  - 10) Alle VT-Isoformen sowie die Rohprodukte VE-P und VE-K, nicht jedoch U-PS (**17**), wiesen eine bemerkenswerte cytotoxische Wirkung gegen mehrere Tumorzelllinien auf. VT A3 (**14**) und VT A2 (**15**) besitzen die größte Wirkstärke. Das VT-Rohprodukt VE-P aus Pappelmisteln war aktiver als das aus Kiefernmisteln, was auf die jeweilige Viscotoxin-Zusammensetzung zurückzuführen ist. In Zellzyklusuntersuchungen zeigten die getesteten Proben **14** und VE-P keine Arretierung der Zelle in einem bestimmten Zellzyklus.
  - 11) Die isolierten Mikroproteine erwiesen sich als relativ stabil gegen Hitze und UV-Licht. U-PS (**17**) war als einzige Verbindung instabil unter sauren Bedingungen. Mehr oder weniger instabil zeigten sich alle Peptide unter Einfluß von Base.
  - 12) Im Test zur Bestimmung der Stabilität gegenüber Trypsin erwies sich U-PS (**17**) als weniger resistent im Vergleich zu VT A3 (**14**), das nicht reagiert.
  - 13) Für VT A1 (**12**), A2 (**13**), A3 (**14**), B (**15**) und 1-PS (**16**) wurde der Phosphorgehalt quantitativ bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß der Anteil an Phosphataddukt in den Proben **12** - **15** 5 % ausmacht, für **16** wurde ein Wert von 14 % bestimmt. Die pflanzliche Herkunft des Phosphations konnte bewiesen werden. Die Bedeutung der Phosphatbindung für die biologische Wirksamkeit wird diskutiert.

### Sekundärmetaboliten der Gilvocarcin-Reihe

Aus den Streptomycetenstämmen Gö 3592/1 und Tü 2471, welche Substanzen der Gilvocarcin-Gruppe produzieren, wurden insgesamt 11 Sekundärmetaboliten isoliert, darunter vier neue. Zur Beeinflussung des Sekundärstoffwechsels der Stämme wurden die Fermentationsparameter variiert (OSMAC-Ansatz). Das Biosynthesepotential beider Stämme wurde im Anschluß diskutiert und beurteilt.

#### Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces griseoflavus* Stamm Gö 3592/1

- 1) Der bekannte Hauptmetabolit Gilvocarcin V (**22**) und die Begleitkomponente Gilvocarcin M (**28**) waren in fast allen Fermentationsvariationen nachweisbar, dabei variierten je nach Ansatz die Ausbeuten pro Liter Kulturlösung. Beide Verbindungen wurden aus verschiedenen Fermentationsansätzen isoliert und anhand spektroskopischer Methoden identifiziert.
- 2) Neben den Gilvocarcinen produziert der Stamm die bekannten Verbindungen Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (**23**) und Ferrioxamin E (**29**).

#### Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2471

- 1) Aus dem Stamm Tü 2471 konnten die drei bekannten Chrysomycine A (**11**), B (**34**) und C (**35**) isoliert werden. Daneben wurden die vier neuen Sekundärstoffe Chrysomycin D (**36**), E (**37**), A<sub>2</sub> (**38**) und B<sub>2</sub> (**39**) produziert.
- 2) Die Strukturen von **11**, **34** - **39** wurden anhand spektroskopischer Daten aufgeklärt.
- 3) Drei weitere Peaks im HPLC-Chromatogramm konnten aufgrund ihres UV-Spektrums der Gruppe der Gilvocarcine zugeordnet werden. Allerdings waren diese Verbindungen in zu kleiner Menge im Extrakt enthalten.
- 4) Die Interaktion von Tü 2471 mit dem Chartreusinbildner Tü 6024 wurde durch Mischkultivierung auf Agarplatten untersucht. Tü 6024 zeigte auf Platte ein stärkeres Wachstum als Tü 2471, es konnten gegenseitige Beeinflussungen beobachtet werden. Bei der Mischfermentation in Schüttelkolben wurden in allen verwendeten Mischungsverhältnissen die bekannten Metaboliten beider Stämme gebildet. Bei der Fermentation mit einem Mischungsverhältnis Tü 2471:Tü 6024 (1:3) wurde dünnschichtchromatographisch ein neuer Metabolit nachgewiesen, der jedoch bei Fermentationen im größeren Maßstab nicht mehr auftrat.



### Biologische Aktivitäten

- 1) Die Reinsubstanzen wurden in Plattendiffusionstests vergleichend auf ihre antimikrobielle Wirkung hin untersucht. Für die Chrysozyme A (**11**) und B (**34**) beobachtete man eine moderate Wirkung gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, gegen *Escherichia coli* und *Candida albicans* zeigten sie keine Wirkung. Alle anderen Verbindungen wiesen keine antimikrobielle Wirkung auf.
- 2) Bei unter Lichtbestrahlung durchgeführten Plattendiffusionstests trat eine gesteigerte Aktivität von Chrysozym A (**11**) und B (**34**) gegenüber gram-positiven Bakterien auf. Im Unterschied zur Inkubation im Dunkeln wurde auch das Wachstum von *Candida albicans* durch Chrysozym A (**11**) gehemmt, Chrysozym C (**35**) erwies sich unter Lichtbestrahlung ebenfalls als biologisch aktiv und war gegen gram-positive Testkeime ähnlich wirksam wie **34**.
- 3) Die isolierten Sekundärstoffe wurden auf ihre Cytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien untersucht. Dabei ist die ausgeprägte Wirkung von Gilvocarcin V (**22**) und Chrysozym A (**11**) gegen alle drei Zelllinien hervorzuheben. Für Gilvocarcin M (**28**) findet sich eine geringere cytostatische Aktivität gegen die verwendeten Zelllinien.
- 4) Aufgrund der auffallenden cytotoxischen Wirkung von **22** und **11** wurden beide Verbindungen gegen eine Apoptose-resistente Tumorzelllinie getestet. Die Befunde zeigen, daß beide Substanzen auch in p53-negativen Zellen wirksam sind und folglich ihre cytotoxische Wirkung über einen anderen Wirkmechanismus ausüben als klassische Cytostatika.
- 5) Gilvocarcin V (**22**) wurde an zwei verschiedenen Tumorzelllinien Zellzyklustests unterzogen. Danach ist die Hauptwirkung von **22** der initiale G2/M-Arrest.

## B. Experimenteller Teil

### I. Allgemeines

#### 1. Verwendete Geräte

**Drehwerte:** Polarimeter der Firma *Perkin-Elmer*, Modell 241, die Drehwerte sind in  $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$ , und die Konzentrationen ( $c$ ) in g / 100 mL angegeben.

**Circulardichroismus-Spektren:** Modell J 500 der Firma *Jasco*. Der Circular-dichroismus  $\Delta\epsilon$  ist in  $\text{cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$  angegeben.

**Massenspektren: EI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz; **ESI-MS:** *Finnigan* LCQ. Die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak ( $I = 100 \%$ ) und sind in Klammern angegeben.

**High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Kopplung (HPLC-MS):** Pumpe: *Flux Instruments* Rheos 4000, Degasser: *Flux Instruments* ERC 3415 $\alpha$ , Detektor: *Linear* UVIS-205, Steuerungssystem: *Flux Instruments* Janeiro, ESI: *Finnigan* LCQ, Software: *Finnigan* Xcalibur.

System A: Lösung A: 0.05 % Ameisensäure in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Lösung B: 0.05 % Ameisensäure in Methanol; Gradient: 20 - 100 % B in 20 min, 10 min 100 % B; Flußrate: 0.3 mL/min; Detektion: 254 nm; positive und negative ESI-Massenspektrometrie, CID 20 %.

System B: Lösung A: 0.1 % Trifluoressigsäure in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Lösung B: 0.1 % Trifluoressigsäure in 90 % Acetonitril; Gradient: 10 - 50 % B in 30 min, 5 min 50 % B; Flußrate: 0.5 mL/min; Detektion: 215 nm; positive ESI-Massenspektrometrie, CID 20 %.

System C: Lösung A: 0.1 % Trifluoressigsäure in H<sub>2</sub>O; Lösung B: 0.1 % Trifluoressigsäure in 90 % Acetonitril; Gradient: 2 - 60 % B in 30 min, 5 min 60 % B; Flußrate: 0.5 mL/min; Detektion: 215 nm; positive ESI-Massenspektrometrie, CID 20 %.

**Infrarotspektren:** Alle IR-Spektren wurden mit einem Spektrometer der Firma *Perkin-Elmer* Modell 1600 aufgenommen. Kristalline Proben wurden als KBr-Preßlinge gemessen, nicht kristalline Substanzen als Film zwischen NaCl-Platten. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

**UV/VIS-Spektren:** *Varian* Modell Cary 3E; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 mL der angegebenen Lösung wurde jeweils ein Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH gegeben. Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) hat die Dimension 1000 cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR-Spektren:** Modelle Unity 300 (300 MHz), Inova 500 (500 MHz) und Inova 600 (600 MHz) der Firma *Varian* sowie AMX 300 (300 MHz) der Firma *Bruker*. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten (ppm) der  $\delta$ -Skala relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben. Zur Kennzeichnung der Signalmultiplizität werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, m<sub>c</sub> = zentriertes Multiplett. Verbreiterte Signale sind durch den Zusatz br gekennzeichnet. Alle Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert. Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben.

**<sup>13</sup>C-NMR-Spektren:** Geräte Unity 300 (75.5 MHz), Inova 500 (125.7 MHz) und Inova 600 (150.8 MHz) der Firma *Varian* sowie AMX 300 (75.5 MHz) der Firma *Bruker*. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten (ppm) der  $\delta$ -Skala relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben.

**APT (Attached Proton Test):** Gerade Multiplizitäten (CH/CH<sub>3</sub>) zeigen nach oben, ungerade (C/CH<sub>2</sub>) zeigen nach unten, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H-Multiplizitäten sind aus HMQC-Experimenten in Verbindungen mit APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

**2D-NMR-Spektren:** <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY (<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-Correlated Spectroscopy), delay-<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY (Long Range-Correlated Spectroscopy), **HMBC** (Heteronuclear Multiple

Bond Connectivity), **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

**<sup>31</sup>P-NMR-Spektren:** *Bruker* Modell Advance 500 (202.5 MHz). Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten (ppm) der  $\delta$ -Skala relativ zur Phosphorsäure als externem Standard angegeben.

**Photometrie:** *Metrohm* 662 Photometer.

## 2. Chromatographische Methoden

**Lösungsmittel:** Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert, für alle anderen Zwecke fanden analysenreine Lösungsmittel Anwendung. Lösungsmittel für die HPLC wurden im Ultraschallbad und anschließend durch Durchleiten eines Heliumstrom für 10 min entgast.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (*Merck*): Schichtdicke 0.25 mm; DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (*Merck*): Schichtdicke 0.20 mm; HPTLC-Fertigplatten (10 x 10 cm) Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(*Merck*): Schichtdicke 0.20 mm. Angegeben sind  $R_f$ -Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

**Sprühreagenzien:** Nach Reagenzien *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.<sup>208</sup> Die DC-Platten wurden mit Hilfe eines Heißluft-Föns nach dem Ansprühen auf ca. 100 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konzentrierter Schwefelsäure.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120 - 122): 1 g Eisen(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

Tetrazolblau (Nr. 308): Eine 6 M Natriumhydroxidlösung wurde zu gleichen Anteilen mit einer Tetrazolblaulösung (0.5 % in Methanol) gemischt.

Vanillin-Schwefelsäure (Nr. 322): 1 g Vanillin in 100 mL konzentrierter Schwefelsäure.

**Säulenchromatographie und Gelchromatographie:** Kieselgel 60, 0.040 – 0.063 mm der Firma *ICN*; Sephadex<sup>®</sup> LH-20 und SE-Sephadex<sup>®</sup> C-25 der Firma *Pharmacia*. Flash-Chromatographie nach W. C. Still.<sup>209</sup>

**Adsorberharz:** *Serva* Amberlite<sup>®</sup> XAD-2, *Mitsubishi* MCI<sup>®</sup>.

### **Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC):**

Pumpe: *Knauer*, HPLC Pumpe 64; Säule: *Merck*, Lobar-Fertigsäule, LiChroprep<sup>®</sup> RP-8, Größe C (440 - 37), 40 - 63 µm.

### **High Performance Liquid Chromatography (HPLC):**

**HPLC I:** Software: *Jasco*-Borwin Ver. 1.50; Pumpe: *Jasco* Pu-1580; Mischeinheit: *Jasco* LG-1580-02; Lösungsmittelentgaser: *Jasco* DG-1580-53; Autosampler: *Jasco* AS 1555; Detektoren: *Jasco* UV-1570 M, CD-995.

**HPLC II:** Software: *Kontron* Kroma-System 2000 Version 1.60; Pumpe: *Kontron* P 322 System; Autosampler: *Kontron* SA 360; Detektor: *Kontron* Dioden Array Detektor 440; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360; analytische Aufgabenschleife: 20 µl.

**HPLC III:** Software: *Jasco*-Borwin Ver. 1.50; Pumpe: *Jasco* PU-1587; Detektor: *Jasco* UV/VIS 1575, Mischkammer: *Jasco*, präparative Aufgabenschleife: 2 mL.

### **HPLC-Säulen:**

- 1:** *Bischoff* ProntoSil 200-3-C8-SH, 3 µm, 3 x 100 mm, mit Vorsäule: *Beckmann* Ultrasphere ODS, 5 µm, 4.6 x 4.5 mm, Flußrate: 0.6 ml/min.
- 2:** *Phenomenex*<sup>®</sup>, Aqua 5µ C18, 200 Å, 5µm, 4 x 250 mm, Flußrate: 1.0 ml/min.
- 3:** *Phenomenex*<sup>®</sup>, Aqua 5µ C18, 200 Å, 5µm, 1 x 250 mm, Flußrate: 4.0 ml/min.
- 4:** *Knauer* Nucleosil-100 C8, 5 µm, 3 x 250 mm, mit integrierter Vorsäule, Flußrate: 0.5 ml/min.
- 5:** *Jasco* Nucleosil-100 C8, 5 µm, 8 x 250 mm, Flußrate: 2.5 ml/min.
- 6:** *Jasco* Nucleosil-100 C8, 5 µm, 20 x 250 mm, Flußrate: 15.0 ml/min.
- 7:** *Knauer* Nucleosil-100 C18, 5 µm, 3 x 250 mm, mit integrierter Vorsäule, Flußrate: 0.5 ml/min.
- 8:** *Jasco* Kromasil-100 C18, 5 µm, 4 x 250 mm, Flußrate: 0.8 ml/min.

- 9:** *Jasco* Kromasil-100 C18, 5 µm, 8 x 250 mm, Flußrate: 2.5 ml/min.  
**10:** *Jasco* Kromasil-100 C18, 5 µm, 20 x 250 mm, Flußrate: 15.0 ml/min.  
**11:** *Grom* Supersphere-100 RP 18 endcapped, 4 µm, 2 x 100 mm, mit integrierter Vorsäule, Flußrate: 0.3 ml/min.

### HPLC-Programme:

**Laufmittelsystem:** Lösung A: 0.1 % TFA in H<sub>2</sub>O,

Lösung B: 0.1 % TFA in Acetonitril.

- 1:** Lösung B von 10 % auf 40 % in 30 min, 10 min 40 % B, UV-Detektion: 280, 215 und 220 nm, CD-Detektion: 220 nm.
- 2:** Lösung B von 25 % auf 38 % in 30 min, 5 min 38 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 3:** Lösung B von 26 % auf 29 % in 16 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 4:** Lösung B von 29 % auf 30 % in 20 min, 5 min 30 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 5:** Lösung B von 30 % auf 31 % in 30 min, 5 min 31 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 6:** Lösung B 30.9 % isokratisch 25 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 7:** Lösung B von 30.8 % auf 30.9 % in 30 min, 5 min 30.9 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 8:** Lösung B von 30.5 % auf 30.6 % in 30 min, 5 min 30.6 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 9:** Lösung B von 31 % auf 33 % in 8 min, in 2 min auf 40 % B, 5 min 40 % B, UV-Detektion: 215 nm.
- 10:** Lösung B von 30 % auf 34 % in 12 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 11:** Lösung B von 0 % auf 50 % in 15 min, UV-Detektion: 215 und 280 nm.
- 12:** Lösung B 45 % isokratisch 15 min, in 2 min auf 100 % B, 5 min 100 % B, UV Detektion: 254 nm.
- 13:** Lösung B von 0 % auf 100 % in 25 min, 10 min 100 % B, UV-Detektion: 220, 254, 285 und 366 nm.
- 14:** Lösung B von 10 % auf 64.3 % in 17 min, 5 min 64.3 % B, UV-Detektion: 254 nm.
- 15:** Lösung B von 40 % auf 65 % in 25 min, UV-Detektion: 254 nm.
- 16:** Lösung B von 31 % auf 33 % in 10 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 17:** Lösung B von 25 % auf 40 % in 30 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 18:** Lösung B von 20 % auf 38 % in 30 min, UV-Detektion: 215 nm.
- 19:** Lösung B von 23 % auf 37 % in 25 min, UV-Detektion: 215 nm.

### 3. Mikrobiologische Methoden

**Nährmedienbestandteile:** Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

D-Glucose	<i>Merck</i>	Hefeextrakt	<i>Gibco BRL</i>
Stärke (löslich)	<i>Merck</i>	Hafermehl (Holo Hafergold)	<i>Neuform</i>
Fleischextrakt	<i>Merck</i>	Corn steep powder	<i>Marcor</i>
D(-)-Mannit	<i>Merck</i>	D(+)-Saccharose	<i>AppliChem</i>
Malzextrakt	<i>Merck</i>	Leberextrakt	<i>Merck</i>
Caseinpepton	<i>Merck</i>	Agar-Agar	<i>Difco</i>
Sojamehl fettarm	<i>Henselwerk GmbH</i>		

Alle Nährmedien wurden nach Einstellung des pH-Wertes mit 0.5 M NaOH bzw. 0.5 M HCl für 30 min bei 121 °C sterilisiert. Für die Stammhaltung gab man zu den entsprechenden Nährmedien einen Zusatz von 20 g/L Agar-Agar.

Folgende Nährmedien, angesetzt mit demineralisiertem Wasser, fanden Verwendung:

M2: 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Hefeextrakt, 4 g/L Glucose, pH 7.0.

M2S: 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Hefeextrakt, 4 g/L Saccharose, pH 7.0.

M2Ca: 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Hefeextrakt, 4 g/L Glucose, 0.3 g/L CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0.

SM: 20 g/L entfettetes Sojamehl, 20 g/L Mannit, pH 7.0.

HA: 20 g/L Hafermehl, 2.5 ml/L Spur 11, pH 7.2.

SGG: 10 g/L Glucose, 10 g/L Glycerin, 10 g/L Stärke, 2.5 g/L Corn steep powder, 5 g/L Caseinpepton, 2 g/L Hefeextrakt, 1 g/L NaCl, 3 g/L CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0.

SSG: 10 g/L Saccharose, 10 g/L Glycerin, 10 g/L Stärke, 2.5 g/L Corn steep powder, 5 g/L Caseinpepton, 2 g/L Hefeextrakt, 1 g/L NaCl, 3 g/L CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0.

NL-6: 10 g/L Glucose, 4 g/L Caseinpepton, 4 g/L Fleischextrakt, 0.5 g/L Hefeextrakt, 0.5 g/L Leberextrakt, 2.5 g/L NaCl, pH 7.2.

NL-203: 20 ml/L Glycerin, 2.5 g/L Glycin, 0.3 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>, pH 7.6.

NL-1358: 30 g/L Glycerin, 2 g/L Caseinpepton, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L NaCl, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5 ml/L Spur 11. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt.

Spurenelementlösung Spur 11: 3 g/L CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 g/L Fe(III)-citrat, 0.2 g/L MnSO<sub>4</sub>, 0.1 g/L ZnCl<sub>2</sub>, 25 mg/L CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 20 mg/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O, 4 mg/L CoCl<sub>2</sub>, 10 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O.

**Zentrifugen:** *Sigma* 2K1, *Sigma* 4K15, *Sigma* 210 M.

**Photometer:** *Eppendorf* BioPhotometer.

**Schüttler und Fermenter:** *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS 4, *Braun* Inkubationsschüttelschrank Certomat<sup>®</sup> HK, *Braun* Inkubationsschüttelschrank Certomat<sup>®</sup> BS-1, *Braun* Biostat E (15 L, 1vvm, 300 rpm), *Braun* Biostat B (2 L / 5 L, 2 vvm, 400 rpm), *Ingold* Sauerstoffelektrode.

#### 4. Biologische Tests

Im Plattendiffusionstest wurden als Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* verwendet. Auf die Agarschicht der mit den verschiedenen Testkeimen angeimpften Agarplatten legte man Filterplättchen (*Schleicher & Schuell*, Durchmesser: 9 mm (Viscotoxine), 6 mm (Gilvocarcin-Gruppe), Dicke: 0.5 mm), die mit 54 µl bzw. 15 µl Lösung der Substanzen ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) in Methanol bzw. Wasser getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet wurden. Die Agarplatten wurden 1 - 2 d bei 37 °C (Bakterien) bzw. 27 °C (Pilze) inkubiert und anschließend ausgewertet.

Medium für *S. aureus*, *E. coli*: 8 g/L Bacto Nutrient Broth, 5 g/L NaCl, 15 g/L Agar.

Medium für *B. subtilis*: 5 g/L Glucose, 0.5 g/L Na-Citrat x 2 H<sub>2</sub>O, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 g/L Agar.

Medium für *C. albicans*: 4 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Glucose, 15 g/L Agar, pH 5.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach der 30 minütigen Sterilisation hinzugegeben.



## II. Viscotoxine aus der europäischen Mistel *Viscum album L.*

### 1. Erstellung des HPLC-Viscotoxin-Standards

Die Referenzsubstanzen wurden an der HPLC I (Säule 1, Programm 1) chromatographiert, als externer Standard diente Viscotoxin A3 (siehe Abbildung 5 auf S.23). Weiterhin wurden alle Substanzen einem ESI-MS-Experiment unterzogen. Für ausgewählte Substanzen wurde die monoisotopische Masse durch MALDI-TOF (*Shimadzu*) bzw. ESI-FT-ICR (*Bruker*) bestimmt.

#### Viscotoxin A1 (12) (Genese unbekannt):

$C_{200}H_{330}N_{62}O_{68}S_6$  (4883.60)<sup>55</sup>

$R_t$  (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 21.9 min.

ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1662.0 [M+H_3PO_4+3H]^{3+}$ , 1628.7  $[M+3H]^{3+}$ , 1246.3  $[M+H_3PO_4+4H]^{4+}$ , 1222.1  $[M+4H]^{4+}$ , 997.4  $[M+H_3PO_4+5H]^{5+}$ , 978.0  $[M+5H]^{5+}$ , 815.5  $[M+6H]^{6+}$ .

#### Viscotoxin A2 (13) (Genese unbekannt):

$C_{199}H_{318}N_{62}O_{66}S_6$  (4827.49)<sup>55</sup>

$R_t$  (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 25.2 min.

ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1643.0 [M+H_3PO_4+3H]^{3+}$ , 1610.0  $[M+3H]^{3+}$ , 1232.5  $[M+H_3PO_4+4H]^{4+}$ , 1208.1  $[M+4H]^{4+}$ , 967.0  $[M+5H]^{5+}$ .

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen):  $m/z = 1237.29182 [M_{mo}+H_3PO_4+3H+Na]^{4+}$ , 1231.54853  $[M_{mo}+H_3PO_4+4H]^{4+}$ , 1207.05554  $[M_{mo}+4H]^{4+}$ , 965.84370  $[M_{mo}+5H]^{5+}$ .

#### Viscotoxin A3 (14) (Genese unbekannt):

$C_{201}H_{328}N_{62}O_{64}S_6$  (4829.59)<sup>27</sup>

$R_t$  (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 25.9 min.

ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1642.8 [M+H_3PO_4+3H]^{3+}$ , 1610.4  $[M+3H]^{3+}$ , 1232.9  $[M+H_3PO_4+4H]^{4+}$ , 1208.6  $[M+4H]^{4+}$ , 986.3  $[M+H_3PO_4+5H]^{5+}$ , 967.2  $[M+5H]^{5+}$ .

MALDI-TOF:  $m/z = 4827.133 [M_{mo}+H]^+$ , 2414.737  $[M_{mo}+2H]^{2+}$ .

#### Viscotoxin B (15) (Genese unbekannt):

$C_{197}H_{322}N_{64}O_{67}S_6$  (4851.51)<sup>56</sup>

**R<sub>t</sub>** (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 19.0 min.

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1618.1 [M+3H]^{3+}$ ,  $1238.0 [M+H_3PO_4+4H]^{4+}$ ,  $1213.9 [M+4H]^{4+}$ ,  $991.0 [M+H_3PO_4+5H]^{5+}$ ,  $971.3 [M+5H]^{5+}$ .

**Viscotoxin 1-PS (16) (Tanne):**

**C<sub>202</sub>H<sub>324</sub>N<sub>64</sub>O<sub>66</sub>S<sub>6</sub>** (4897.58)<sup>57</sup>

**R<sub>t</sub>** (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 24.0 min.

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1665.6 [M+H_3PO_4+3H]^{3+}$ ,  $1633.1 [M+3H]^{3+}$ ,  $1249.7 [M+H_3PO_4+4H]^{4+}$ ,  $1225.5 [M+4H]^{4+}$ ,  $1000.2 [M+H_3PO_4+5H]^{5+}$ .

**MALDI-TOF**:  $m/z = 4895.074 [M_{mo}+H]^+$ ,  $2448.620 [M_{mo}+2H]^{2+}$ .

**U-PS (17) (Kiefer):**

**R<sub>t</sub>** (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 20.2 min.

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1586.9 [M+3H]^{3+}$ ,  $1190.8 [M+4H]^{4+}$ .

**MALDI-TOF**:  $m/z = 4757.023 [M_{mo}+H]^+$ ,  $2381.207 [M_{mo}+2H]^{2+}$ .

**Viscotoxin A4 (18) (Tanne):**

**R<sub>t</sub>** (HPLC I, Säule 1, Programm 1): 25.7 min.

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1632.8 [M+3H]^{3+}$ ,  $1224.9 [M+4H]^{4+}$ ,  $981.3 [M+5H]^{5+}$ .

**ESI-FT-ICR-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1631.77257 [M_{mo}+3H]^{3+}$ .

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3350$  (br),  $3290$  (sh),  $3192$  (sh),  $2942$ ,  $1631$ ,  $1589$ ,  $1466$ ,  $1398$ ,  $1042$ ,  $630$   $\text{cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 198 (4.65), 286 (4.96), 345 (sh) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 228 (3.26), 308 (3.62), 324 (sh), 349 (sh) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 292 (3.61) nm.

**Drehwert**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26^\circ$  (c = 0.3, H<sub>2</sub>O).

## **2. Isolierung der Viscotoxine aus *Viscum album* L.**

### **2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials bis zum Viscotoxin-Rohprodukt**

Die Mistel wurde von dem Wirtsbaum Pappel geerntet und größere Teile mit einer Schere grob zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde 5 Tage bei 60 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Für die weitere Bearbeitung wurde das getrocknete

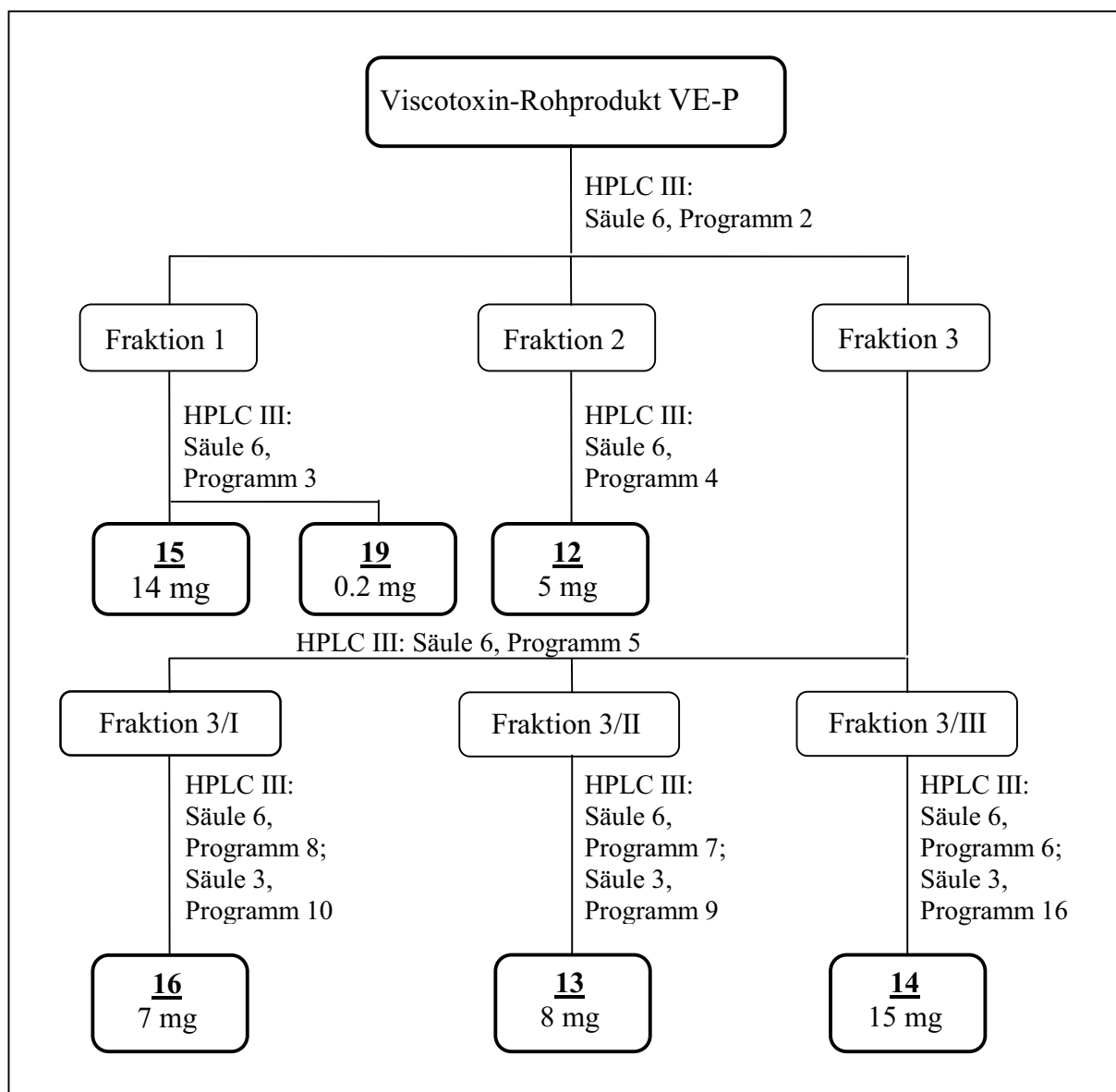
Material (2.0 kg) in einer Planetenmühle (*Retsch* PM 4000) gemahlen. Es wurden 1.7 kg Mistelpulver erhalten.

100 g Mistelpulver wurden durch 24 stündiges suspendieren in 2.5 L 2 %iger Essigsäure (pH 4) bei 4 °C und anschließende Behandlung im Ultraschallbad (30 min) aufgeschlossen und durch einen Büchnertrichter abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend über einen Kationenaustauscher SE-Sephadex<sup>®</sup> C-25 (äquilibriert mit 0.02 M Ammoniumacetatlösung, 23.0 x 5.5 cm) gegeben. Die Säule spülte man mit 700 ml 0.02 M Ammoniumacetatlösung bis sich das Säulenmaterial von braun nach hellbeige entfärbt hatte, eluierte dann mit 500 ml 1 M Ammoniumacetatlösung und engte das aufgefangene Eluat im Vakuum bis fast zur Trockne ein. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit 0.02 M Ammoniumacetat-Lösung regeneriert.

Der Rückstand wurde zur Entfernung der Salze an einer MPLC (Säule: LiChroprep RP-8, Fluß 20 mL, Druck 0.8 MPa) weiter aufgereinigt, indem nach Aufgabe der Probe die Säule zuerst mit 450 mL bidestilliertem Wasser, dann mit 450 mL 20 %iger Acetonitrillösung, 0.1 % TFA enthaltend, gespült wurde. Das Viscotoxin-Rohprodukt wurde mit 450 mL 40 %iger Acetonitrillösung, 0.1 % TFA enthaltend, eluiert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die Analyse des Viscotoxinmusters im Rohprodukt (VE-P) erfolgte an der analytischen HPLC I (Säule 1, Programm 1). Das Rohprodukt (VE-P) wurde bei 4 °C gelagert.

## **2.2. Aufreinigung der Viscotoxine aus dem Rohprodukt**

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Viscotoxin-Rohprodukt an der präparativen HPLC III unter Verwendung verschiedener präparativer und semi-präparativer Säulen chromatographiert. Das Isolierungsschema dafür ist in Abbildung 65 dargestellt. Jede aufgefangene Fraktion wurde anschließend an der analytischen HPLC I (Säule 1, Programm 1) mit dem Viscotoxin-Standard verglichen.



**Abbildung 65:** Isolierung der Viscotoxine A1 (12), A2 (13), A3 (14), B (15), 1-PS (16) und B2 (19) aus Pappelmitselextrakt VE-P.

### Viscotoxin A1 (12)

$C_{200}H_{330}N_{62}O_{68}S_6$  (4883.60)<sup>55</sup>

$R_t$  (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 21.9 min.

ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1628.8 [M+3H]^{3+}$ ,  $1227.9 [M+3H+Na]^{4+}$ ,  $1222.2 [M+4H]^{4+}$ ,  $1010.9 [M+2H+3Na]^{5+}$ ,  $978.3 [M+5H]^{5+}$ .

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen):  $m/z = 977.26610 [M_{mo}+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4881.29732, berechnet: 4880.25940, Abweichung: 212.7 ppm.

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3423$  (br), 2964 (sh), 1652, 1542, 1404 (sh), 1204, 1136, 837, 802, 723, 601 (br)  $cm^{-1}$ .

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.27), 281 (3.75) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.25), 280 (3.62) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (5.21), 286 (3.12) nm.

CD (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 210 (-152.8), 220 (sh, -129.8) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45^\circ$  (c = 0.07, H<sub>2</sub>O).

**P-Gehalt der Probe:** gefunden: 0.03 %, berechnet für Phosphataddukt: 0.62 %.

### Phosphataddukt

**C<sub>200</sub>H<sub>333</sub>N<sub>62</sub>O<sub>72</sub>PS<sub>6</sub>** (4981.59)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1661.7 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+3H]<sup>3+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 996.85902 [M<sub>mo</sub>+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+5H]<sup>5+</sup>.

gefunden: 4979.27307, berechnet: 4978.23639, Abweichung: 208.2 ppm.

<sup>31</sup>P-NMR (202.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 2.03$  ppm.

### Viscotoxin A2 (13)

**C<sub>199</sub>H<sub>318</sub>N<sub>62</sub>O<sub>66</sub>S<sub>6</sub>** (4827.49)<sup>55</sup>

R<sub>t</sub> (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 25.2 min.

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1207.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 966.7 [M+5H]<sup>5+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 1207.06311 [M<sub>mo</sub>+4H]<sup>4+</sup>.

gefunden: 4824.21780, berechnet: 4824.17575, Abweichung: 8.7 ppm.

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3421$  (br), 2964, 1665, 1543, 1435 (sh), 1204, 1137, 838, 802, 724, 556 (br) cm<sup>-1</sup>.

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.19), 279 (3.52) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.22), 278 (3.61) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (4.99), 279 (3.30) nm.

CD (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-151.2), 220 (sh, -111.3) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44^\circ$  (c = 0.08, H<sub>2</sub>O).

**P-Gehalt der Probe:** gefunden: 0.03 %, berechnet für Phosphataddukt: 0.63 %.

### Phosphataddukt

**C<sub>199</sub>H<sub>321</sub>N<sub>62</sub>O<sub>70</sub>PS<sub>6</sub>** (4925.49)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1642.3 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+3H]<sup>3+</sup>, 1232.3 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+4H]<sup>4+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 1231.55585 [M<sub>mo</sub>+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+4H]<sup>4+</sup>.

gefunden: 4922.19397, berechnet: 4922.15262, Abweichung: 8.4 ppm.

**Viscotoxin A3 (14)** $C_{201}H_{328}N_{62}O_{64}S_6$  (4829.59)<sup>27</sup> $R_t$  (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 25.7 min.ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1610.5 [M+3H]^{3+}$ , 1208.5  $[M+4H]^{4+}$ , 967.3  $[M+5H]^{5+}$ .ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen):  $m/z = 1207.57642 [M_{mo}+4H]^{4+}$ , 966.26132  $[M_{mo}+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4826.27337, berechnet: 4826.26416, Abweichung: 1.9 ppm.

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3397$  (br), 2963, 1665, 1541, 1452, 1202, 1136, 836, 801, 722, 600 (br)  $cm^{-1}$ .UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.20), 280 (3.51) nm;(MeOH/HCl):  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.18), 280 (3.28) nm;(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (5.13), 280 (9.94) nm.CD (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 211 (-144.6), 220 (sh, -115.6) nm.Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -68^\circ$  (c = 0.07, H<sub>2</sub>O).

P-Gehalt der Probe: gefunden 0.03 %, berechnet für Phosphataddukt: 0.63 %.

**Phosphataddukt** $C_{201}H_{331}N_{62}O_{68}PS_6$  (4927.59)ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1642.6 [M+H_3PO_4+3H]^{3+}$ , 986.5  $[M+H_3PO_4+5H]^{5+}$ .ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen):  $m/z = 1642.42693 [M_{mo}+H_3PO_4+3H]^{3+}$ , 1232.07039  $[M_{mo}+H_3PO_4+4H]^{4+}$ , 985.85632  $[M_{mo}+H_3PO_4+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4924.24920, berechnet: 4924.24100, Abweichung: 1.7 ppm.

**Viscotoxin B (15)** $C_{197}H_{322}N_{64}O_{67}S_6$  (4851.51)<sup>56</sup> $R_t$  (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 18.9 min.ESI-MS (positive Ionen):  $m/z = 1618.3 [M+3H]^{3+}$ , 1213.7  $[M+4H]^{4+}$ , 971.6  $[M+5H]^{5+}$ .ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen):  $m/z = 970.65953 [M_{mo}+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4848.26065, berechnet: 4848.20810, Abweichung: 10.8 ppm.

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3411$  (br), 2963, 1666, 1544, 1434, 1204, 1137, 838, 802, 724, 602 (br)  $cm^{-1}$ .

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.23), 282 (3.76) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (5.20), 286 (3.37) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 210 (4.70), 284 (3.55) nm.

CD (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-143.3), 220 (sh, -106.3) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43^\circ$  (c = 0.07, H<sub>2</sub>O).

**P-Gehalt der Probe:** gefunden: 0.02 %, berechnet für Phosphataddukt: 0.63 %.

### Phosphataddukt

**C<sub>197</sub>H<sub>325</sub>N<sub>64</sub>O<sub>71</sub>PS<sub>6</sub>** (4949.59)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1650.3 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+3H]<sup>3+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 990.25414 [M<sub>mo</sub>+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+5H]<sup>5+</sup>.

gefunden: 4946.23747, berechnet: 4946.18494, Abweichung: 10.6 ppm.

### Viscotoxin 1-PS (16)

**C<sub>202</sub>H<sub>324</sub>N<sub>64</sub>O<sub>66</sub>S<sub>6</sub>** (4897.58)<sup>57</sup>

**R<sub>t</sub>** (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 24.0 min.

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1632.8 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1225.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 980.5 [M+5H]<sup>5+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 979.86436 [M<sub>mo</sub>+5H]<sup>5+</sup>.

gefunden: 4894.28273, berechnet: 4894.22888, Abweichung: 11.0 ppm.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3410$  (br), 3286 (sh), 2964, 1655, 1544, 1434, 1203, 1138, 839, 802, 723, 602 (br) cm<sup>-1</sup>.

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 202 (5.06), 282 (3.73) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 201 (5.15), 278 (3.75) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (5.21), 286 (3.48) nm.

CD (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-146.8), 223 (sh, -83.5) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37^\circ$  (c = 0.07, H<sub>2</sub>O).

**P-Gehalt der Probe:** gefunden: 0.086 %, berechnet für Phosphataddukt: 0.62 %.

### Phosphataddukt

**C<sub>202</sub>H<sub>327</sub>N<sub>64</sub>O<sub>70</sub>PS<sub>6</sub>** (4995.58)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 1665.7 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+3H]<sup>3+</sup>, 1249.7 [M+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+4H]<sup>4+</sup>.

ESI-FT-ICR-MS (positive Ionen): m/z = 999.45967 [M<sub>mo</sub>+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+5H]<sup>5+</sup>.

gefunden: 4992.26547, berechnet: 4992.20572, Abweichung: 11.9 ppm.

**Viscotoxin B2 (19)**

(4853.0)<sup>XI</sup>

**R<sub>t</sub>** (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 20.3 min.

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1618.1 [M+3H]^{3+}$ , 1214.4  $[M+4H]^{4+}$ , 971.8  $[M+5H]^{5+}$ .

**ESI-FT-ICR-MS** (positive Ionen):  $m/z = 970.85634 [M_{mo}+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4849.24387, berechnet: -, Abweichung: - ppm.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3423$  (br), 2964, 1680, 1543, 1403, 1205, 1136, 839, 803, 724, 602 (br)  $\text{cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 199$  (5.26), 279 (4.32) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 199$  (5.27), 279 (4.17) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 204$  (5.42), 283 (4.32) nm.

**CD** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\Delta\epsilon) = 208$  (-112.9), 220 (sh, -84.6) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26^{\circ}$  ( $c = 0.05$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**Phosphataddukt**

(4948.9)<sup>XI</sup>

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1650.4 [M+H_3\text{PO}_4+3H]^{3+}$ , 1238.4  $[M+H_3\text{PO}_4+4H]^{4+}$ .

**ESI-FT-ICR-MS** (positive Ionen):  $m/z = 990.45122 [M_{mo}+H_3\text{PO}_4+5H]^{5+}$ .

gefunden: 4847.22000, berechnet: -, Abweichung: - ppm.

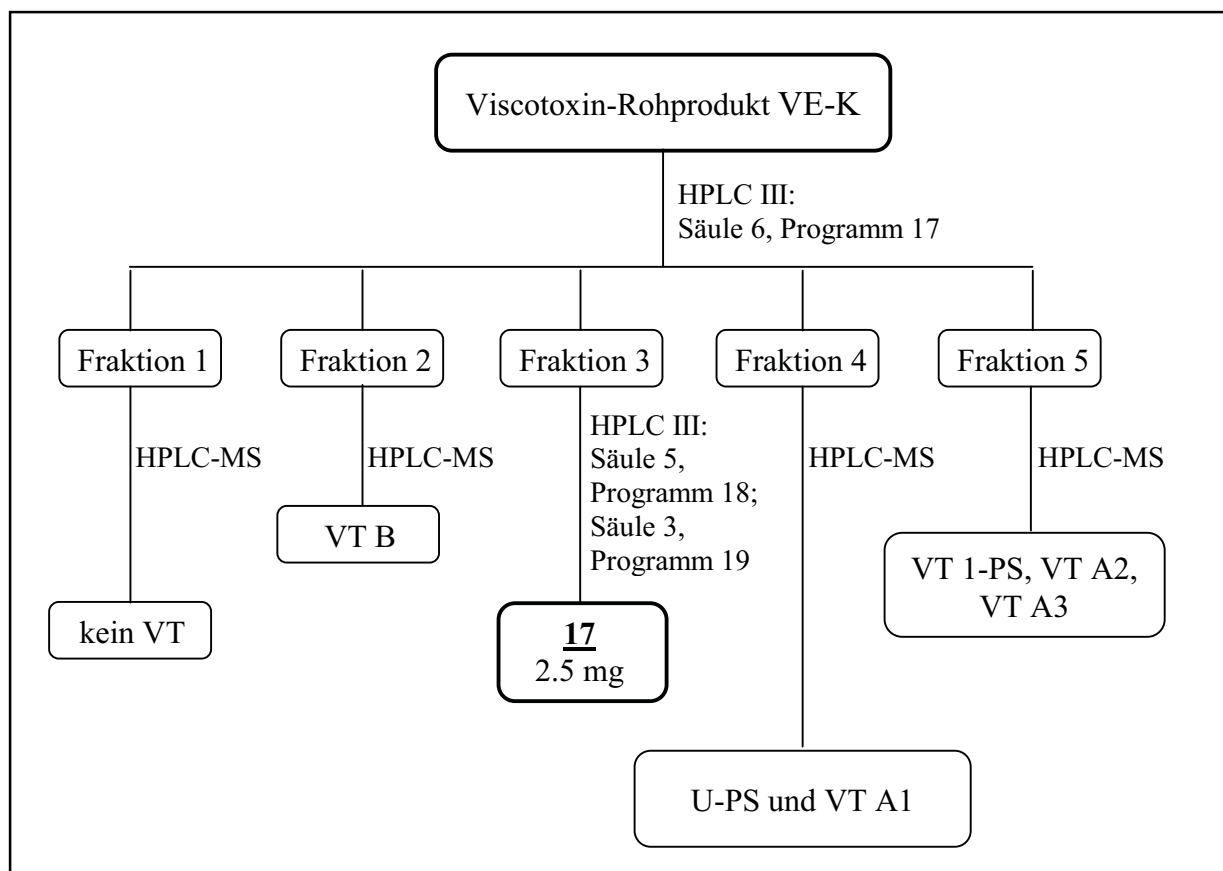
**2.3. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial und Isolierung von U-PS (17) aus Kiefernmisteln**

2 kg Frischmaterial weiblicher Misteln wurde von dem Wirtsbaum Kiefer geerntet und 5 Tage bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pflanzenmaterial in einer Planetenmühle (*Retsch* PM 4000) gemahlen und man erhielt 760 g Mistelpulver. Die weitere Aufarbeitung bis zum Viscotoxin-Rohprodukt VE-K erfolgte wie unter Kap. B.II.2.1 beschrieben am Kationenaustauscher und an der MPLC. Die Zusammensetzung der Viscotoxine im VE-K wurde sowohl anhand des Viscotoxin-Standardchromatogramms als auch mit HPLC-ESI-MS (Säule 1, System B) bestimmt und anschließend wurde das Rohprodukt an der präparativen HPLC III unter Verwendung verschiedener präparativer und semi-präparativer Säulen aufgetrennt. Die

<sup>XI</sup> Berechnete Masse aus dem ESI-MS-Experiment.



Isolierung von U-PS (**17**) ist in Abbildung 66 dargestellt. Die Viscotoxine in den restlichen Fraktionen wurden per HPLC-ESI-MS (Säule 1, System B) identifiziert und nicht weiter aufgereinigt.



**Abbildung 66:** Isolierung von U-PS (**17**) aus Kiefernmittelextrakt VE-K.

### U-PS (17)

(4760.0)<sup>XI</sup>

**R<sub>t</sub>** (HPLC I: Säule 1, Programm 1): 20.2 min.

**HPLC-ESI-MS** (Säule 1, System B, positive Ionen): R<sub>t</sub> = 18.1 min, m/z = 1587.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1190.5 [M+4H]<sup>4+</sup>.

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 1587.6 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1190.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 953.2 [M+5H]<sup>5+</sup>.

**ESI-FT-ICR-MS:** 1586.64947 [M<sub>mo</sub>+3H]<sup>3+</sup>.

gefunden: 4756.92493, berechnet: -, Abweichung: - ppm.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3431, 2917 (sh), 1635, 1404, 1054, 564 (br) cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (4.76), 283 (3.84), 327 (sh), 386 (sh) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (4.52), 284 (3.41), 320 (sh), 345 (sh) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (4.45), 244 (sh), 289 (3.82), 346 (sh) nm.

CD (MeOH):  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 210 (-28.0) \text{ nm}$ .

Drehwert:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \sim 0^\circ$  ( $c = 0.02, \text{H}_2\text{O}$ ).

### 3. Versuche zur Stabilität der Viscotoxine

Zur Bestimmung der Stabilität von Viscotoxinen unter sauren und basischen Bedingungen, sowie unter UV-Bestrahlung und bei erhöhter Temperatur wurde eine Lösung des jeweiligen Viscotoxins in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/mL}$  untersucht. Für den Test auf Säurestabilität wurden 500  $\mu\text{l}$  dieser Viscotoxinlösung mit 50  $\mu\text{l}$  konzentrierter Salzsäure versetzt (Endkonzentration: 1.1 mol/L Salzsäure). Die resultierende Lösung wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Test auf Basenstabilität erfolgte wie oben beschrieben durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  5 M NaOH (Endkonzentration: 0.5 mol/L NaOH) an Stelle von Salzsäure.

Zur Bestimmung der UV- und Hitzebeständigkeit, sowie für eine Vergleichsprobe wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Stammlösung mit 50  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser versetzt. Die UV-Bestrahlung (254 nm, 4 Watt, Abstand: 6 cm) erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur, zur Untersuchung auf thermische Stabilität wurde 2 Stunden auf 80 °C erwärmt. Die Vergleichsprobe blieb unbehandelt.

Im Anschluß wurden alle Proben an der analytischen HPLC I (Säule 4, Programm 1) vermessen, indem jeweils 60  $\mu\text{l}$  der behandelten Viscotoxinlösung injiziert wurde. Anhand der Chromatogramme (relative Peakfläche) wurde der Grad der Zersetzung jeder Viscotoxinprobe (Tabelle 14 auf S. 44) im Vergleich zur Blindprobe bestimmt.

### 4. Quantitative photometrische Analyse von Phosphor

Zu 2.5 mg des jeweiligen Viscotoxins, gelöst in 10 mL destilliertem Wasser, wurden 7 mL 2 M NaOH hinzugegeben und 12 h bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH 4 eingestellt, 500  $\mu\text{l}$  10 %ige Ascorbinsäure und 2.5 mL Molybdat-Reagenz hinzugegeben und mit destilliertem Wasser auf 25 mL aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 715 nm im Photometer vermessen. Die Mengenbestimmung in  $\mu\text{g}$

erfolgte nach Erstellung einer Eichkurve über das Analysenprogramm des Photometers.

### **Eichung des Photometers**

Das Photometer wurde mit einer Blindprobe (0 µg Phosphor enthaltend) tariert und anschließend mit einer 16.31 µg enthaltenen Phosphorlösung kalibriert. Zur Kontrolle dieser Zweipunkt-Eichung stellte man Referenzlösungen mit folgenden Phosphorkonzentrationen her: 1.631 µg, 3.261 µg, 6.524 µg, 9.786 µg, 13.048 µg. Alle Referenzlösungen sowie die Blindprobe wurden entsprechend obiger Vorschrift behandelt. Die Abweichung der Kontrollmessung betrug im Durchschnitt 0.8 %.

Molybdat-Reagenz: 144 mL konzentrierte Schwefelsäure, 17.2 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 3.5 g KSb(III)-oxid-tartrat und 5 g Weinsäure gelöst in 1 L destilliertem Wasser.

## **5. Primärstrukturanalyse von Viscotoxin A3 (14) und U-PS (17)**

### **5.1. Reduktion und Carboxymethylierung**

150 µg des jeweiligen Mikroproteins wurden lyophilisiert und in 50 mM Tris-Puffer (pH 8.5) zu einer Endkonzentration von 1 µg/µL gelöst. Unter Argon wurde zu der Lösung 8 µL 0.2 M Dithiothreitol zugegeben und 60 min bei 53 °C im Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur gab man 12 µL 0.4 M Ammoniumiodacetatlösung unter Schutzgas zu. Die Alkylierung der freien Thiole erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12 µL 0.2 M Dithiothreitol abgestoppt.

Sowohl das Edukt als auch die Produkte nach der Reduktion (r) bzw. nach der Carboxymethylierung (rcm) wurden an der HPLC I (Säule 1, Programm 11) bzw. durch HPLC-ESI-MS-Messungen (Säule 1, System C) kontrolliert. HPLC-MS-Daten des Eduktes und der jeweiligen Produkte für Viscotoxin A3 (14) siehe Tabelle 29, für U-PS (17) siehe Tabelle 30. Nach der reduktiven Carboxymethylierung wurde das Mikroprotein an der HPLC I (Säule 1, Programm 11) aufgereinigt. Das eluierte Produkt wurde im Vakuum bis zur Trockne eingedampft und für ein Verdauungsexperiment mit Trypsin eingesetzt.

**Tabelle 29:** HPLC-MS-Daten von Viscotoxin A3 (**14**) nach Reduktion bzw. nach Carboxymethylierung.

Substanz	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]			
		[M+3H] <sup>3+</sup>	[M+4H] <sup>4+</sup>	[M+5H] <sup>5+</sup>	[M+6H] <sup>6+</sup>
<b>14</b> <sub>nativ</sub>	21.02	1611.0	1209.0	967.2	-
<b>14</b> <sub>r</sub>	15.66	1612.5	1210.0	968.2	807.0
<b>14</b> <sub>rcm</sub>	14.92	1729.0	1297.3	1038.1	865.3

Nicht aufgeführt sind die mehrfach geladenen Ionen der jeweiligen gebildeten TFA-Addukte.

**Tabelle 30:** HPLC-MS-Daten von U-PS (**17**) nach Reduktion bzw. nach Carboxymethylierung.

Substanz	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]			
		[M+3H] <sup>3+</sup>	[M+4H] <sup>4+</sup>	[M+5H] <sup>5+</sup>	[M+6H] <sup>6+</sup>
<b>17</b> <sub>nativ</sub>	17.18	1587.5	1191.1	953.1	-
<b>17</b> <sub>r</sub>	19.68	1589.9	1192.9	954.6	795.6
<b>17</b> <sub>rcm</sub>	17.90	1744.9	1309.2	1047.4	873.5

Nicht aufgeführt sind die mehrfach geladenen Ionen der jeweiligen gebildeten TFA-Addukte.

## 5.2. Tryptischer Abbau am nativen Mikroprotein

100 µg des jeweiligen nativen Mikroproteins wurde in 100 µL 0.1 % Ammoniumacetat (pH 8.8, 10 % Acetonitril in bidestilliertem Wasser) gelöst, 2 µg Trypsin (*Roth*, Karlsruhe) hinzugefügt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die tryptischen Peptide wurden an der HPLC-ESI-MS vermessen. Für die Messung wurde das System C mit der Säule 1 verwendet. HPLC-MS-Daten der tryptischen Peptide des nativen Viscotoxin A3 (**14**) und des nativen U-PS (**17**) sind in Tabelle 31 dargestellt.

**Tabelle 31:** HPLC-MS-Daten nach tryptischem Abbau des nativen VT A3 (**14**) und des nativen U-PS (**17**).

<b>Tryptischer Verdau des nativen Viscotoxin A3 (<b>14</b>)</b>				
Tryptische Peptide	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]		
Lys1-Lys46	21.16	1610.9 [M+3H] <sup>3+</sup>	1208.4 [M+4H] <sup>4+</sup>	967.0 [M+5H] <sup>5+</sup>
<b>Tryptischer Verdau des nativen U-PS (<b>17</b>)</b>				
Tryptische Peptide	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]		
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>2+</sup>	[M+3H] <sup>3+</sup>
Peptid I	7.11	1883.4	542.5	-
Peptid II	10.10	660.4	330.9	-
Peptid III	12.54	-	1407.0	938.9
Peptid IV	13.00	-	1545.5	1030.7
Peptid V	13.26	-	1808.8	1206.7
Peptid VI	13.50	-	1946.6	1298.5
Peptid VII	13.68	-	1865.1	1244.4
U-PS	17.10	1587.6 [M+3H] <sup>3+</sup>	1191.2 [M+4H] <sup>4+</sup>	-

Nicht aufgeführt sind die mehrfach geladenen Ionen der jeweiligen gebildeten TFA-Addukte.

### 5.3. Tryptischer Abbau von reaktiv-carboxymethylierten Mikroproteinen

Das an der HPLC I aufgereinigte reaktiv-carboxymethylierte Viscotoxin wurde in 100 µL 0.1 % Ammoniumacetat (pH 8.8, 10 % Acetonitril in bidestilliertem Wasser) gelöst, mit 2 µg Trypsin (*Roth*, Karlsruhe) versetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die durch die Trypsinspaltung entstandenen Peptide wurden im Anschluß durch HPLC-ESI-MS vermessen. Sowohl für das voll-scan-MS<sup>1</sup>-Experiment (VT A3 (**14**) siehe Tabelle 32, U-PS (**17**) siehe Tabelle 34) als auch für das Tandem-MS-Experiment (VT A3 (**14**) siehe Tabelle 33, U-PS (**17**) siehe Tabelle 35) wurde das System C mit der Säule 1 verwendet. Im MS<sup>2</sup>-Experiment (CID 35 %) wurden hauptsächlich y- und b-Ionen erhalten.

**Tabelle 32:** HPLC-MS<sup>1</sup>-Daten des reduktiv-carboxymethylierten VT A3 (**14**) nach tryptischem Verdau. (Fett gedruckte Ionen wurden im MS<sup>2</sup>-Experiment zerstoßen).

<b>Tryptischer Verdau des reduktiv-carboxymethylierten Viscotoxin A3 (<b>14</b>)</b>				
Tryptische Peptide	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]		
		[2M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>
Lys <sup>1</sup> -Arg <sup>10</sup>	7.90	-	1182.6	<b>592.2</b>
Asn <sup>11</sup> -Arg <sup>17</sup>	10.20	-	911.5	<b>456.7</b>
Leu <sup>18</sup> -Arg <sup>28</sup>	9.68	-	1172.8	<b>587.4</b>
Leu <sup>29</sup> -Lys <sup>33</sup>	6.28	1129.1	<b>565.3</b>	-
Ile <sup>34</sup> -Lys <sup>46</sup>	11.06	-	1425.7	<b>713.9</b>

**Tabelle 33:** Tochterionen-Analyse von VT A3 (**14**) nach tryptischem Verdau. (Drei-Buchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang, weitere Erklärungen siehe Kapitel A.III.7.1.2 auf S.49).

<b>Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Lys<sup>1</sup>-Arg<sup>10</sup>: 592.2 Da [M+2H]<sup>2+</sup></b>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
1054.4	y <sub>9</sub> "	[M-Lys+2H] <sup>+</sup>
1008.4	b <sub>9</sub>	[M-Arg] <sup>+</sup>
967.4	y <sub>8</sub> "	[M-Lys-Ser+2H] <sup>+</sup>
951.5	b <sub>8</sub>	[M-Arg-Gly] <sup>+</sup>
806.4	y <sub>7</sub> "	[M-Lys-Ser-CMC+2H] <sup>+</sup>
788.4	y <sub>7</sub> " <sup>o</sup>	[M-Lys-Ser-CMC-H <sub>2</sub> O+2H] <sup>+</sup>
645.4	y <sub>6</sub> "	[M-Lys-Ser-CMC-CMC+2H] <sup>+</sup>
583.2	-	[M-H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>
574.6	x <sub>5</sub>	[M-Lys-Ser-CMC-CMC-C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N] <sup>+</sup>
538.1	b <sub>4</sub>	[M-Arg-Gly-Thr-Thr-Asn-Pro] <sup>+</sup>
458.6	x <sub>4</sub>	[M-Lys-Ser-CMC-CMC-Pro-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
434.2	y <sub>4</sub> "	[M-Lys-Ser-CMC-CMC-Pro-Asn+2H] <sup>+</sup>
359.1	x <sub>3</sub>	[M-Lys-Ser-CMC-CMC-Pro-Asn-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO] <sup>+</sup>
216.2	b <sub>2</sub>	[M-Arg-Gly-Thr-Thr-Asn-Pro-CMC-CMC] <sup>+</sup>

<b>Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Asn<sup>11</sup>-Arg<sup>17</sup>: 456.7 Da [M+2H]<sup>2+</sup></b>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
808.3	-	[M-CO <sub>2</sub> H-CH <sub>4</sub> N <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>

684.3	y <sub>5</sub> "	[M-Asn-Ile+2H] <sup>+</sup>
668.3	z <sub>5</sub> '	[M-Asn-Ile-Asn+H] <sup>+</sup>
521.2	y <sub>4</sub> "	[M-Asn-Ile-Tyr+2H] <sup>+</sup>
391.2	b <sub>3</sub>	[M-Arg-CMC-Ala-Asn] <sup>+</sup>
336.1	y <sub>2</sub> "	[M-Asn-Ile-Tyr-Asn-Ala+2H] <sup>+</sup>
278.3	y <sub>2</sub> "-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M-Asn-Ile-Tyr-Asn-Ala-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> +2H] <sup>+</sup>
228.0	b <sub>2</sub>	[M-Arg-CMC-Ala-Asn-Tyr] <sup>+</sup>
200.0	a <sub>2</sub>	[M-Arg-CMC-Ala-Asn-Tyr-CO] <sup>+</sup>

**Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Leu<sup>18</sup>-Lys<sup>28</sup>: 587.4 Da [M+2H]<sup>2+</sup>**

m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
1069.7	-	[M-CO <sub>2</sub> H-CH <sub>4</sub> N <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>
1059.6	y <sub>10</sub> '	[M-Leu+H] <sup>+</sup>
1044.4	z <sub>10</sub> '	[M-Leu-NH+H] <sup>+</sup>
1026.4	z <sub>10</sub> <sup>o'</sup>	[M-Leu-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
999.1	a <sub>10</sub>	[M-Lys] <sup>+</sup>
958.5	y <sub>9</sub> "	[M-Leu-Thr+2H] <sup>+</sup>
955.5	b <sub>9</sub>	[M-Lys-Ala] <sup>+</sup>
901.5	y <sub>8</sub> "	[M-Leu-Thr-Gly+2H] <sup>+</sup>
830.5	y <sub>7</sub> "	[M-Leu-Thr-Gly-Ala+2H] <sup>+</sup>
794.1	b <sub>8</sub>	[M-Lys-Ala-CMC] <sup>+</sup>
596.2	b <sub>6</sub>	[M-Lys-Ala-CMC-Thr-Pro] <sup>+</sup>
577.6	y <sub>5</sub> "	[M-Leu-Thr-Gly-Ala-Pro-Arg+2H] <sup>+</sup>
480.0	y <sub>4</sub> "	[M-Leu-Thr-Gly-Ala-Pro-Arg-Pro+2H] <sup>+</sup>
379.3	y <sub>3</sub> "	[M-Leu-Thr-Gly-Ala-Pro-Arg-Pro-Thr+2H] <sup>+</sup>
343.1	b <sub>4</sub>	[M-Lys-Ala-CMC-Thr-Pro-Arg-Pro] <sup>+</sup>
271.9	b <sub>3</sub>	[M-Lys-Ala-CMC-Thr-Pro-Arg-Pro-Ala] <sup>+</sup>
215.1	b <sub>2</sub>	[M-Lys-Ala-CMC-Thr-Pro-Arg-Pro-Ala-Gly] <sup>+</sup>

**Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Leu<sup>29</sup>-Lys<sup>33</sup>: 565.3 Da [M+H]<sup>+</sup>**

m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
547.2	-	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
530.2	-	[M-H <sub>2</sub> O-NH <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup>
452.2	y <sub>4</sub> "	[M-Leu+2H] <sup>+</sup>
419.0	b <sub>4</sub>	[M-Lys] <sup>+</sup>
391.1	x <sub>3</sub>	[M-Leu-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO] <sup>+</sup>
365.2	y <sub>3</sub> "	[M-Leu-Ser+2H] <sup>+</sup>

Tochterionen-Analyse (MS <sup>2</sup> ) von Ile <sup>34</sup> -Lys <sup>46</sup> : 713.9 Da [M+2H] <sup>2+</sup>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
1313.5	y <sub>12</sub> "	[M-Ile+2H] <sup>+</sup>
1199.5	y <sub>11</sub> "	[M-Ile-Ile+2H] <sup>+</sup>
1112.4	y <sub>10</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser+2H] <sup>+</sup>
1055.4	y <sub>9</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly+2H] <sup>+</sup>
1020.3	b <sub>10</sub>	[M-Lys-Pro-Tyr] <sup>+</sup>
968.4	y <sub>8</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser+2H] <sup>+</sup>
867.3	y <sub>7</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser-Thr+2H] <sup>+</sup>
720.3	b <sub>7</sub>	[M-Lys-Pro-Tyr-Asp-Ser-Pro] <sup>+</sup>
706.3	y <sub>6</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser-Thr-CMC+2H] <sup>+</sup>
523.1	y <sub>4</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser-Thr-CMC-Pro-Ser+2H] <sup>+</sup>
458.2	b <sub>5</sub>	[M-Lys-Pro-Tyr-Asp-Ser-Pro-CMC-Thr] <sup>+</sup>
407.3	y <sub>3</sub> "	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser-Thr-CMC-Pro-Ser-Asp+2H] <sup>+</sup>
314.1	b <sub>3</sub>	[M-Lys-Pro-Tyr-Asp-Ser-Pro-CMC-Thr-Ser-Gly] <sup>+</sup>
243.9	y <sub>2</sub> '	[M-Ile-Ile-Ser-Gly-Ser-Thr-CMC-Pro-Ser-Asp-Tyr+H] <sup>+</sup>
227.0	b <sub>2</sub>	[M-Lys-Pro-Tyr-Asp-Ser-Pro-CMC-Thr-Ser-Gly-Ser] <sup>+</sup>

**Tabelle 34:** HPLC-MS<sup>1</sup>-Daten des reaktiv-carboxymethylierten U-PS (**17**) nach tryptischem Verdau (Fett gedruckte Ionen wurden im MS<sup>2</sup>-Experiment zerstoben).

Tryptischer Verdau des reaktiv-carboxymethylierten U-PS ( <b>17</b> )				
Tryptische Peptide	R <sub>t</sub> [min]	m/z [Da]		
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+3H] <sup>3+</sup>
Peptid A	7.57	907.4	<b>454.2</b>	-
Peptid B	10.16	<b>660.3</b>	330.8	-
Peptid C	11.54	1608.5	<b>805.3</b>	-
Peptid D	13.21	-	1181.8	<b>788.4</b>
Peptid E	13.75	-	<b>979.7</b>	653.6



**Tabelle 35:** Tochterionen-Analyse von U-PS (**17**) nach tryptischem Verdau. (Drei-Buchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang, weitere Erklärungen siehe Kapitel A.III.7.2.3 auf S. 58).

<b>Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Peptid A: 454.2 Da [M+2H]<sup>2+</sup></b>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
735.3	y <sub>7</sub>	[M-Ala-Thr] <sup>+</sup>
574.5	y <sub>6</sub>	[M-Ala-Thr-CMC] <sup>+</sup>
492.0	b <sub>5</sub>	[M-Arg-Gly-Ser-Pro] <sup>+</sup>
474.0	b <sub>5</sub> <sup>o</sup>	[M-Arg-Gly-Ser-Pro-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
445.1	-	[M-H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>
416.2	y <sub>4</sub> '	[M-Ala-Thr-CMC-Ser-Ala+H] <sup>+</sup>
173.0	b <sub>2</sub>	[M-Arg-Gly-Ser-Pro-Ala-Ser-CMC] <sup>+</sup>
<b>Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Peptid B: 660.3 Da [M+H]<sup>+</sup></b>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
642.3	-	[M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
624.4	-	[M-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
616.3	-	[M-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
559.3	y <sub>5</sub> '	[M-Thr+H] <sup>+</sup>
514.1	b <sub>5</sub>	[M-Lys] <sup>+</sup>
496.1	b <sub>5</sub> <sup>o</sup>	[M-Lys -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
486.2	a <sub>5</sub>	[M-Lys-CO] <sup>+</sup>
468.2	a <sub>5</sub> <sup>o</sup>	[M-Lys-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
446.2	y <sub>4</sub> '	[M-Thr-Leu+H] <sup>+</sup>
428.2	y <sub>4</sub> ' <sup>o</sup>	[M-Thr-Leu-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
401.1	b <sub>4</sub>	[M-Lys-Leu] <sup>+</sup>
383.1	b <sub>4</sub> <sup>o</sup>	[M-Lys-Leu-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
365.1	b <sub>4</sub> <sup>oo</sup>	[M-Lys-Leu-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
344.1	b <sub>3</sub>	[M-Lys-Leu-Gly] <sup>+</sup>
317.2	y <sub>3</sub> "	[M-Thr-Leu-Glu+2H] <sup>+</sup>
215.0	b <sub>2</sub>	[M-Lys-Leu-Gly-Glu] <sup>+</sup>
<b>Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Peptid C: 805.3 Da [M+2H]<sup>2+</sup></b>		
m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
1481.5	y <sub>12</sub> "	[M-Gly-Ala+2H] <sup>+</sup>
1463.2	b <sub>13</sub>	[M-Lys] <sup>+</sup>
1320.3	b <sub>12</sub>	[M-Lys-CMC] <sup>+</sup>

1302.3	y <sub>11</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC+2H] <sup>+</sup>
1284.3	y <sub>11</sub> " <sup>o</sup>	[M-Gly-Ala-CMC-H <sub>2</sub> O+2H] <sup>+</sup>
1172.4	y <sub>10</sub> '	[M-Gly-Ala-CMC-Phe+H] <sup>+</sup>
1085.3	y <sub>9</sub> '	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser+H] <sup>+</sup>
998.3	y <sub>8</sub> '	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser+H] <sup>+</sup>
980.2	y <sub>8</sub> " <sup>o</sup>	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
884.3	y <sub>7</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-Asn+2H] <sup>+</sup>
783.3	y <sub>6</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-Asn-Thr+2H] <sup>+</sup>
741.1	[y <sub>12</sub> '] <sup>2+</sup>	[M-Gly-Ala+H] <sup>2+</sup>
732.2	[y <sub>12</sub> " <sup>o</sup> ] <sup>2+</sup>	[M-Gly-Ala-H <sub>2</sub> O+2H] <sup>2+</sup>
622.3	y <sub>5</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-Asn-Thr-CMC+2H] <sup>+</sup>
535.1	y <sub>4</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-Asn-Thr-CMC-Ser+2H] <sup>+</sup>
524.7	b <sub>5</sub>	[M-Lys-CMC-Ile-Asn-Ser-CMC-Thr-Asn-Ser] <sup>+</sup>
437.0	b <sub>4</sub>	[M-Lys-CMC-Ile-Asn-Ser-CMC-Thr-Asn-Ser-Ser] <sup>+</sup>
308.1	y <sub>2</sub> "	[M-Gly-Ala-CMC-Phe-Ser-Ser-Asn-Thr-CMC-Ser-Asn-Ile+2H] <sup>+</sup>
290.0	b <sub>3</sub>	[M-Lys-CMC-Ile-Asn-Ser-CMC-Thr-Asn-Ser-Ser-Phe] <sup>+</sup>

#### Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Peptid D: 788.4 Da [M+3H]<sup>3+</sup>

m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
----------	--------------	--------------------------

Es wurde für das tryptische Peptid D kein aussagekräftiges Fragmentierungsmuster erhalten.

#### Tochterionen-Analyse (MS<sup>2</sup>) von Peptid E: 979.7 Da [M+2H]<sup>2+</sup>

m/z [Da]	Fragment-Ion	Fragmentierungsvorschlag
----------	--------------	--------------------------

Es wurde für das tryptische Peptid E kein aussagekräftiges Fragmentierungsmuster erhalten.

### **III. Arbeiten an Produzenten der Gilvocarcin-Reihe**

Alle mikrobiologischen Arbeiten, wie Stammhaltung, Überimpfen und Fermentation, wurden unter den hierfür üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **1. Stammhaltung**

##### **1.1. Agarplatten**

Zur Stammhaltung dienten Petrischalen mit M2Ca-Medium, die 5 - 8 Tage bei 28 °C inkubiert wurden. Sowohl Stamm Gö 3592/1 als auch Tü 2471 zeigten nach 2 - 3 Tagen ein weißes Luftmycel, welches sich nach 4 - 5 Tagen grau färbte. Ein Überimpfen auf weitere Platten erfolgte durch Ausstreichen der Sporen mit einer Platinimpföse. Die bewachsenen Platten wurden maximal 10 - 12 Wochen bei 4 °C gelagert.

##### **1.2. Langzeithaltung in flüssigem Stickstoff**

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einem einseitig zugeschweißten sterilen Halm aus Polypropylen Agarstückchen ausgestantzt. Dieser wurde in einen zweiten, mit einem kleinen Bleistück beschwerten Halm gesteckt, der daraufhin zugeschmolzen wurde. Die Proben wurden zunächst für 30 min im oberen Bereich des Kryobehälters eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Diese Methode erlaubt eine Lagerung von Kulturen über mehrere Jahre.

#### **2. Nährmedienvariationen und chemisches Screening**

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in den unter B.I.3 genannten Nährmedien in 300 mL Schüttelkolben (Schaumstoffkappen) ohne Schikanen für 96 h bei 28 °C und 250 rpm. Die Kolben wurden jeweils mit 100 mL Nährlösung und einem 1/12 Stück einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Jeder Ansatz wurde zweimal durchgeführt und bei gleichem Aussehen und Ernte-pH-Wert gemeinsam aufgearbeitet. Die vereinigten Kulturbrühen (200 mL) wurden zentrifugiert (4500 rpm, 15 min), das Mycel abgetrennt und im Ultraschallbad 15 min mit 100 mL Aceton aufgeschlossen. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 (30 mL) adsorbiert, das Adsorberharz mit 100 mL Wasser gewaschen und mit 100 mL Methanol eluiert. Das Lösungsmittel entfernte man anschließend im Vakuum.

Die erhaltenen Extrakte aus Mycel und Kulturfiltrat wurden in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) aufgenommen (1 mL pro 100 mL ursprünglicher Kulturlösung) und sowohl an der HPLC II (Säule 8, Programm 13) als auch dünnenschichtchromatographisch untersucht. Zur Dünnschichtchromatographie trug man 5 µL dieser Lösungen auf eine HPTLC-Kieselgelplatte auf und entwickelte die Chromatogramme in Chloroform/Methanol (9:1) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5). Die Analyse des Metabolitenmuster erfolgte durch UV-Licht (254 und 366 nm) und anhand von vier Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Orcin, Vanillin-Schwefelsäure, Tetrazolblau). Fermentationen, die zu interessant erscheinenden Rohprodukten führten, wurden in größerem Maßstab wiederholt.

### 3. Weitere Variationen der Kultivierungsbedingungen

Neben den Nährmedienvariationen wurden weitere Kultivierungsbedingungen abgewandelt:

#### a) Zusatz von Oberflächenmaterialien

Zugabe von je 3 g Amberlite<sup>®</sup> XAD-2, MCI<sup>®</sup>, Siedesteine und Celite<sup>®</sup> pro 100 mL SGG-Nährlösung zu Beginn der Kultivierung. In einem zweiten Ansatz wurde Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 nach 40 h zur Kulturlösung gegeben.

#### b) Variation der Fermentationsgefäße

<b>Fermentationsgefäße</b>	<b>Medium</b>
Schüttelkolben 300 mL mit 3 Schikanen 180 bzw. 250 rpm	M2-, M2Ca-, SM-, SGG-, Ha-Medium
Schüttelkolben 300 mL ohne Schikanen 180 rpm	M2-, M2Ca-, SM-, SGG-, Ha-Medium
Biostat B, 5 L	M2-Medium
Biostat E, 10 L	SGG-Medium
P-Kolben, 1 L, 4 Wochen	M2-, SGG-, SM-Medium

Für das Screening in Schüttelkolben wurden alle Variationen wie unter B.III.2 beschrieben durchgeführt. Bei dem Zusatz von Oberflächenmaterialien wurde das Mycel zusätzlich mit Methanol extrahiert. Zu Fermentationen im größeren Maßstab siehe B.III.4.3.

#### **4. *Streptomyces griseoflavus* Stamm Gö 3592/1**

##### **4.1. Vorkulturen**

Die Fermentation der Vorkultur erfolgte in mit Schaumstoffkappen verschlossenen Erlenmeyerkolben (300 mL) ohne Schikanen. Die Erlenmeyerkolben waren mit jeweils 100 mL Nährlösung gefüllt und wurden mit einem 1/12 Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 28 °C und 250 rpm für 48 h. Für die Vor- und Hauptkultur verwendete man durchgängig jeweils das gleiche Nährmedium.

##### **4.2. Variationen der Hauptkultur**

###### **Variation A: Kultivierung in Schüttelkulturen**

(**Variation A1:** NL SM, **Variation A2:** NL SGG, **Variation A3:** NL M2S )

In Schüttelkolben wurden zwischen 1 L und 4 L (10 – 40 Kolben) fermentiert. Die Fermentation erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, bei 28 °C und 250 rpm. Als Verschluss dienten Schaumstoffkappen. Angeimpft wurde mit 8 mL der oben aufgeführten Vorkultur. Geerntet wurde nach 4 Tagen, der pH-Wert betrug in den Variationen A1 - A3 7.8, 7.6 und 7.4.

###### **Variation B: Kultivierung im Biostat-B-Fermenter**

Die Kultivierung im 5 L Biostat-B-Fermenter führte man bei einer Temperatur von 28 °C, einer Luftzufuhr von 2 vvm und einer Rührgeschwindigkeit von 400 rpm durch. Beimpft wurde mit 400 mL M2-Vorkultur. Die Ernte erfolgte nach 4 Tagen bei einem Ernte-pH-Wert von 5.5.

###### **Variation C: Kultivierung im Biostat-E-Fermenter**

Die Fermentation wurde im 15 L Fermenter durchgeführt, der mit 9.2 L SGG-Nährlösung unter Zusatz von 300 mL 10 % Niax-Entschäumer in 70 % Ethanol gefüllt war. Beimpft wurde mit 800 mL 48 h alter Vorkultur. Der Fermenter wurde bei

28 °C, 300 rpm und 1 vvm Belüftung über 96 h betrieben. Der Ernte-pH-Wert der Fermentationslösung betrug 6.9.

#### Variation D: Kultivierung in P-Kolben in Flüssigkultur

Für die Ruhefermentation wurde in P-Kolben mit 1 L des Nährmediums SM bei 28 °C 4 Wochen inkubiert. Schaumstoffkappen dienten auch hier als Verschluss. Das Beimpfen erfolgte mit 10 mL der unter B.III.4.1 beschriebenen Vorkultur. Der Ernte-pH-Wert betrug 8.7.

#### 4.3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen

Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte analog zu B.III.2, wobei das Mycel dreimal mit insgesamt 1 L Aceton je Liter Kulturlösung extrahiert und das Kulturfiltrat je Liter an ca. 250 mL XAD-2 adsorbiert, mit 500 mL Wasser gewaschen und mit 500 mL Methanol eluiert wurde. Die so erhaltenen Rohprodukte wurden chromatographisch aufgetrennt.

#### 4.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus Gö 3592/1

##### Gilvocarcin V (22)

Das gelbe kristalline Gilvocarcin V (**22**) wurde in den Kultivierungsvariationen (A - D) in Mengen von 5 - 160 mg/L produziert. Die Aufreinigung erfolgte zunächst an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 19:1 → 5:1), wobei man ein Gemisch aus **22** und **28** in einem Verhältnis von ungefähr 7:1 erhielt. Durch anschließende Chromatographie an der HPLC III (Säule 10, Programm 12) konnte die reine Substanz isoliert werden.

**C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>** (494.50)

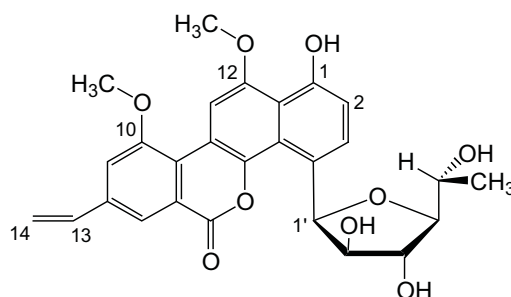
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.46 (Chloroform/Methanol 9:1),  
0.19 (Chloroform/Methanol 19:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 18.3 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:** m/z (%) = 494 (14) [M]<sup>+</sup>, 390 (41), 361 (100).

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 1504.6 [3M+Na]<sup>+</sup>, 1011.1 [2M+Na]<sup>+</sup>, 517.5 [M+Na]<sup>+</sup>.



**ESI-MS** (negative Ionen):  $m/z = 1480.5 [3M-H]^-$ ,  $987.0 [2M-H]^-$ ,  $493.1 [M-H]^-$ ,  $389.2 [M-C_4H_6O_3-H]^-$ .

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3424, 1688, 1622, 1452$  (sh),  $1427, 1376, 1249, 1135$   $\text{cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 205$  (4.15),  $249$  (4.33),  $286$  (4.37),  $308$  (sh),  $320$  (sh),  $334$  (sh),  $349$  (sh),  $397$  (3.87) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 202$  (4.21),  $248$  (4.34),  $287$  (4.38),  $308$  (sh),  $318$  (sh),  $333$  (sh),  $349$  (sh),  $397$  (3.89) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 231$  (4.33),  $246$  (4.28),  $287$  (4.21),  $336$  (3.81),  $350$  (3.76),  $397$  (3.63) nm.

**CD** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\Delta\epsilon) = 211$  (-10.3),  $220$  (+8.3),  $228$  (-9.4),  $239$  (-11.4),  $249$  (+5.8),  $259$  (+3.2) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -203^\circ$  ( $c = 0.02$ , DMSO).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta = 1.25$  (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>),  $3.53$  (dd,  $J = 8.0, 5.0$  Hz, 1H, 4'-H),  $3.83$ - $3.92$  (m, 2H, 3'-H, 5'-H),  $4.10$  (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>),  $4.15$  (s, 3H, 10-OCH<sub>3</sub>),  $4.42$  (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, 3'-OH),  $4.60$ - $4.70$  (m, 1H, 2'-H),  $4.76$  (m<sub>c</sub>, 1H, 2'-OH),  $5.08$  (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 5'-OH),  $5.48$  (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H, 14-H<sub>a</sub>),  $6.10$  (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, 14-H<sub>b</sub>),  $6.19$  (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, 1'-H),  $6.91$  (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 2-H),  $6.93$  (dd,  $J = 17.5, 10.5$  Hz, 1H, 13-H),  $7.77$  (s, 1H, 9-H),  $7.95$  (s, 1H, 7-H),  $8.05$  (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 3-H),  $8.45$  (s, 1H, 11-H),  $9.65$  (s, 1H, 1-OH) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.7 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta = 20.1$  (q, C-6'),  $56.2$  (q, 12-OCH<sub>3</sub>),  $56.6$  (q, 10-OCH<sub>3</sub>),  $66.5$  (d, C-5'),  $78.8$  (d, C-3'),  $78.9$  (d, C-2'),  $80.9$  (d, C-1'),  $85.9$  (d, C-4'),  $101.4$  (d, C-11),  $112.0$  (d, C-2),  $112.8$  (s, C-10b),  $114.4$  (d, C-9),  $114.9$  (s, C-12a),  $117.0$  (t, C-14),  $119.0$  (d, C-7),  $122.1$  (s, C-6a),  $122.9$  (s, C-10a),  $123.6$  (s, C-4a),  $126.1$  (s, C-4),  $129.0$  (d, C-3),  $135.2$  (d, C-13),  $138.7$  (s, C-8),  $142.2$  (s, C-4b),  $151.8$  (s, C-12),  $152.6$  (s, C-1),  $157.3$  (s, C-10),  $159.6$  (s, C-6) ppm.

**Gilvocarcin M (28)**

In Ausbeuten von 0.7 - 21.0 mg/L wurde Gilvocarcin M (**28**) als gelbe kristalline Substanz bei Fermentationen nach Variationen A, B und C vom Stamm produziert. Die Aufreinigung erfolgte gemäß der von **22**.

**C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>** (482.50)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (Chloroform/Methanol 9:1),  
0.18 (Chloroform/Methanol 19:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 17.5 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:** m/z (%) = 482 (24) [M]<sup>+</sup>, 378 (36), 365 (44), 349 (100).

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 987.2 [2M+Na]<sup>+</sup>, 1468.8 [3M+Na]<sup>+</sup>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3444, 1634, 1459, 873 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 243 (3.82), 265 (sh, 3.58), 274 (3.68), 306 (3.22),  
327 (3.17), 342 (3.09), 384 (3.03) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 243 (3.87), 265 (sh, 3.63), 274 (3.72), 306 (3.28),  
327 (3.22), 343 (3.12), 384 (3.12) nm;

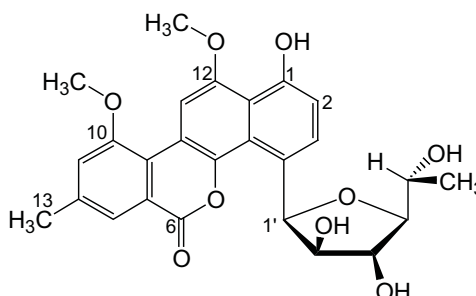
(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 243 (3.79), 265 (sh, 3.51), 274 (3.61), 307 (3.17),  
317 (3.17), 351 (3.03), 384 (3.05) nm.

**CD** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 213 (+4.5), 222 (-8.7), 231 (+4.9), 240 (-11.1), 251 (+5.9),  
261 (-2.3) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40^{\circ}$  (c = 0.02, DMSO).

**<sup>1</sup>H-NMR**\* (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 1.25 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3H, 3-H<sub>3</sub>), 3.51 (dd, J = 6.0, 4.0 Hz, 1H, 4'-H), 3.82-3.92 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.06 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3H, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.50 (br s, 1H, 3'-OH), 4.65 (br s, 1H, 2'-H), 4.85 (br s, 1H, 2'-OH), 5.01 (br s, 1H, 5'-OH), 6.15 (d, J = 5.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 2-H), 7.35 (s, 1H, 9-H), 7.64 (s, 1H, 7-H), 8.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 8.28 (s, 1H, 11-H), 9.64 (s, 1H, 1-OH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR**\* (75.5 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 20.3 (q, C-6'), 21.1 (q, C-13), 56.2 (q, 12-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (q, 10-OCH<sub>3</sub>), 66.5 (d, C-5'), 78.7 (d, C-3'), 78.9 (d, C-2'), 80.9 (d, C-1'), 85.7 (d, C-4'), 101.3 (d, C-11), 112.0 (d, C-2), 112.8 (s, C-10b), 118.4 (d, C-9), 114.83 (s, C-12a), 121.2 (d, C-7), 122.1 (s, C-6a), 122.9 (s, C-10a), 123.7 (s, C-4a),



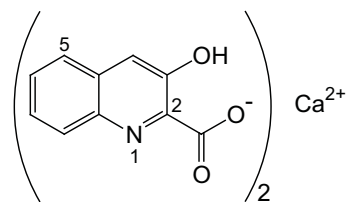


126.2 (s, C-4), 129.0 (d, C-3), 140.0 (s, C-8), 142.3 (s, C-4b), 151.8 (s, C-12), 152.7 (s, C-1), 157.3 (s, C-10), 159.6 (s, C-6) ppm.

\*  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten wurden aus einem Mischspektrum von **22** und **28** ermittelt.

### **Calcium-3-hydroxychinolin-2-carboxylat (23)**

Die Verbindung (**23**) fiel bei den Kultivierungsbedingungen A, C und D als hellgelber, kristalliner Feststoff in einer Ausbeute von 2 - 35 mg/L an. Zur Aufreinigung chromatographierte man an Kieselgel (1. Dichlormethan/Methanol 19:1  $\rightarrow$  5:1 und 2. Essigester/Methanol/Wasser 10:2:1) und anschließend an Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (Methanol).



**C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Ca** (416.40)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.72 (Essigester/Methanol/Wasser 10:2:1),

0.45 (Chloroform /Methanol 1:1).

**Anfärbeverhalten:** keine Anfärbung mit Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure und Tetrazolblau.

**EI-MS:** m/z (%) = 189 (85) [M]<sup>+</sup>, 171 (19) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 145 (68) [M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 143 (100) [M-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup>, 117 (37) [M-CO<sub>2</sub>-CO]<sup>+</sup>, 115 (90) [M-H<sub>2</sub>O-2CO]<sup>+</sup>, 89 (29) [M-CO<sub>2</sub>-2CO]<sup>+</sup>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3509 (br), 1651, 1584, 1511 (sh), 1469, 1450 (sh), 1383, 1240 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 216 (4.56), 227 (4.54), 237 (sh), 289 (3.55), 350 (3.65) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 210 (4.40), 235 (4.45), 314 (sh), 327 (3.67), 369 (3.66) nm;

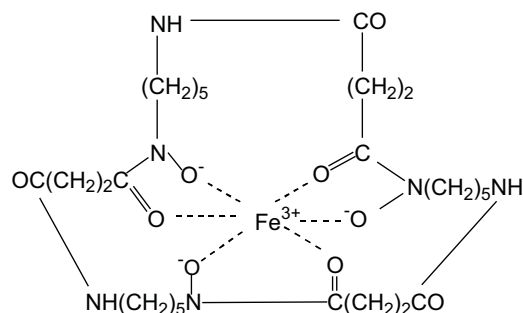
(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 216 (4.53), 227 (4.51), 289 (3.51), 351 (3.64) nm.

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz, d<sub>5</sub>-Pyridin):  $\delta$  = 7.28 (dd,  $J$  = 8.5, 8.5 Hz, 2H, 7-H), 7.35 (dd,  $J$  = 8.5, 8.5 Hz, 2H, 6-H), 7.64 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, 5-H), 7.73 (s, 2H, 4-H), 8.42 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, 8-H) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (125.5 MHz, d<sub>5</sub>-Pyridin):  $\delta$  = 118.9 (s, C-4), 126.0 (d, C-6), 126.3 (d, C-5), 127.7 (d, C-8), 129.9 (d, C-7), 132.1 (s, C-4a), 141.8 (s, C-8a), 143.2 (s, C-2), 156.6 (s, C-3), 173.0 (s, C-9) ppm.

**Ferrioxamin E (29)**

Bei der Kultivierungsvariation D konnte Ferrioxamin E (**29**) als roter kristalliner Feststoff in einer Ausbeute von 22 mg/L erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel (1. Dichlormethan/Methanol 9:1 → 5:1, 2. Essigester/Methanol/Wasser 10:2:1).



**C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>Fe** (653.54)

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.0 (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5),

0.12 (Dichlormethan/Methanol/Eisessig/Wasser/Triethylamin 100:10:10:2:0.1).

**Anfärbeverhalten:** keine Anfärbung mit Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure und Tetrazolblau.

**EI-MS\***

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1329.1 [2M+Na]^+$ ,  $676.6 [M+Na]^+$ .

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3439, 2931, 2850$  (sh), 1634, 1574, 1455,  $1004 \text{ cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 200$  (4.26), 246 (3.63) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 200$  (4.29), 246 (3.65) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 210$  (4.02), 248 (3.65) nm.

**<sup>1</sup>H-NMR\*\***

**<sup>13</sup>C-NMR\*\***

\* Es wurde kein aussagekräftiges EI-Massenspektrum erhalten.

\*\* Es waren keine auswertbaren NMR-Spektren erhältlich.

## **5. *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2471**

### **5.1. Vorkulturen**

Die Vorkulturen für den Stamm Tü 2471 wurden analog zu denen des Stammes Gö 3592/1 (Kapitel B.III.4.1) fermentiert.

### **5.2. Variationen der Hauptkultur**

#### **Variation A: Kultivierung in Schüttelkulturen**

(**Variation A1:** NL SM, **Variation A2:** NL SGG)

In Schüttelkolben wurde im 2 L-Maßstab (20 Kolben) fermentiert. Die Fermentation erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, bei 28 °C und 250 rpm. Als Verschuß dienten Schaumstoffkappen. Angeimpft wurde mit 8 mL der oben aufgeführten Vorkultur. Geerntet wurde nach 4 Tagen bei einem Ernte-pH-Wert von 7.8 bzw. 7.0.

#### **Variation B: Kultivierung im Biostat-E-Fermenter**

Die Fermentation wurde in einem 15 L Fermenter durchgeführt, der mit 9.2 L SGG-Nährlösung gefüllt war. Beimpft wurde mit 800 mL 48 h alter Vorkultur. Der Fermenter wurde bei 28 °C, 200 rpm und 1 vvm Belüftung über 96 h betrieben. Der Ernte-pH-Wert betrug 7.1.

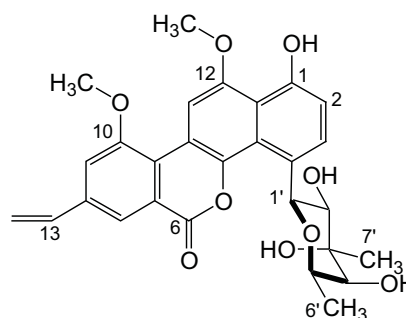
### **5.3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen**

Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte analog der des Stammes Gö 3592/1 (Kapitel B.III.4.3).

## 5.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus Tü 2471

### Chrysomycin A (11)

Gelb-kristallines Chrysomycin A (**11**) konnte in Ausbeuten von 120 - 155 mg/L bei Fermentationen nach Variationen A und B erhalten werden. Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (19:1 → 1:1) und (15:1) als Laufmittelsysteme und anschließender Chromatographie an HPLC III (Säule 10, Programm 12).



**C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>** (508.53)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 18.9 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:** m/z (%) = 508 (90) [M]<sup>+</sup>, 377 (100), 361 (30).

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 1039.0 [2M+Na]<sup>+</sup>, 1016.9 [2M+H]<sup>+</sup>, 509.1 [M+H]<sup>+</sup>, 491.4 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 391.5 [M-118+H]<sup>+</sup>, 361.6 [M-148+H]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen): m/z = 1015.1 [2M-H]<sup>-</sup>, 507.5 [M-H]<sup>-</sup>, 389.3 [M-118-H]<sup>-</sup>.

**HREI-MS:** 508.1733 gefunden wie berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3426, 2974 (sh), 2932, 1707, 1623, 1607 (sh), 1589 (sh), 1508 (sh), 1451, 1428 (sh), 1369, 1246, 1064 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 248 (4.47), 287 (4.51), 309 (sh), 322 (sh), 335 (sh), 349 (sh), 393 (4.04) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 249 (4.46), 287 (4.50), 309 (sh), 320 (sh), 336 (sh), 349 (sh), 394 (4.02) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 248 (4.45), 287 (4.45), 321 (sh), 335 (sh), 348 (sh), 394 (3.95) nm.

**CD** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 209 (-106.5), 219 (+6.0), 230 (+3.9), 244 (-7.9), 256 (+2.3), 266 (-1.7), 287 (-2.5) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11^{\circ}$  (c = 0.04, DMSO),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1^{\circ}$  (c = 0.21, MeOH).

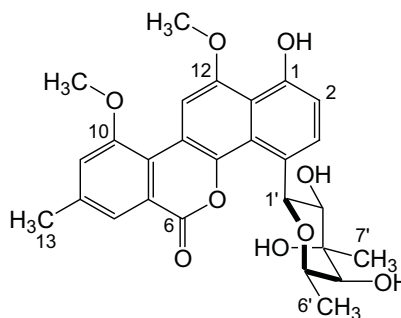
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 1.03 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.26 (s, 3H, 7'-H<sub>3</sub>), 3.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.65-3.75 (m, 1H, 2'-H), 4.04 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 4.08 (s, 3H, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.15-4.25 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 4.54 (q, J = 6.3 Hz, 1H, 5'-H), 4.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 4'-OH), 5.45 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 14-H<sub>a</sub>), 6.01 (d,

$J = 9.6$  Hz, 1H, 1'-H), 6.08 (d,  $J = 17.6$  Hz, 1H, 14-H<sub>b</sub>), 6.87 (dd,  $J = 11.0, 17.5$  Hz, 1H, 13-H), 6.94 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 2-H), 7.60 (s, 1H, 9-H), 7.83 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 3-H), 7.91 (s, 1H, 7-H), 8.34 (s, 1H, 11-H), 9.77 (s, 1H, 1-OH) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta = 17.1$  (q, C-6'), 23.9 (q, C-7'), 56.2 (q, 12-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (q, 10-OCH<sub>3</sub>), 70.7 (d, C-5'), 72.4 (s, C-3'), 72.6 (d, C-2'), 74.7 (d, C-1'), 75.8 (d, C-4'), 101.4 (d, C-11), 112.1 (d, C-2), 113.3 (s, C-10b), 114.5 (d, C-9), 115.1 (s, C-12a), 117.1 (t, C-14), 118.9 (d, C-7), 121.9 (s, C-6a), 122.8 (s, C-10a), 125.1 (s, C-4a), 128.1 (s, C-4), 129.3 (d, C-3), 135.2 (d, C-13), 138.3 (s, C-8), 142.4 (s, C-5), 151.8 (s, C-12), 153.2 (s, C-1), 157.3 (s, C-10), 159.8 (s, C-6) ppm.

### Chrysomycin B (34)

Bei den Fermentationen nach den Variationen A und B wurde **34** als gelber kristalliner Feststoff in Ausbeuten von 80 - 100 mg/L produziert. Die Aufreinigung erfolgte analog zu **11**, es wurden 2 mg **34** isoliert.



**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>** (496.52)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.59 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 18.1 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:** m/z (%) = 496 (24) [M]<sup>+</sup>, 365 (22), 327 (20), 255 (28), 199 (100) 126 (44).

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 1487.0 [3M+H]<sup>+</sup>, 1014.9 [2M+Na]<sup>+</sup>, 993.0 [2M+H]<sup>+</sup>, 497.0 [M+H]<sup>+</sup>, 479.4 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 379.5 [M-118+H]<sup>+</sup>, 349.6 [M-148+H]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen): m/z = 1486.6 [3M-H]<sup>-</sup>, 991.1 [2M-H]<sup>-</sup>, 495.3 [M-H]<sup>-</sup>, 377.4 [3M-118-H]<sup>-</sup>.

**HREI-MS:** 496.1733 gefunden wie berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3429, 2925, 1703, 1618, 1590$  (sh), 1450, 1369, 1247, 1064 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 243 (4.53), 266 (sh, 4.28), 274 (4.39), 305 (3.89), 317 (3.88), 327 (3.85), 382 (3.85) nm;

**CD** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-11.2), 218 (sh, -2.6), 228 (+9.5), 242 (-11.0), 256 (+0.3), 265 (-1.7), 277 (-1.3) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2^{\circ}$  (c = 0.14, MeOH).

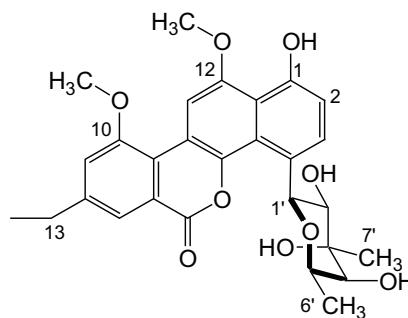
**$^1\text{H-NMR}^*$**  (300 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 1.03$  (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.26 (s, 3H, 7'-H<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3H, 13-H<sub>3</sub>), 3.15 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.65-3.75 (m, 1H, 2'-H), 4.04 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 4.08 (s, 3H, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.15-4.25 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 4.54 (q,  $J = 6.3$  Hz, 1H, 5'-H), 4.61 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 4'-OH), 6.01 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, 1'-H), 6.93 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 2-H), 7.32 (s, 1H, 9-H), 7.65 (s, 1H, 7-H), 7.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 3-H), 8.31 (s, 1H, 11-H), 9.77 (s, 1H, 1-OH) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}^*$**  (75.5 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 17.1$  (q, C-6'), 21.1 (q, C-13), 23.9 (q, C-7'), 56.2 (q, 12-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (q, 10-OCH<sub>3</sub>), 70.7 (d, C-5'), 72.4 (s, C-3'), 72.6 (d, C-2'), 74.7 (d, C-1'), 75.8 (d, C-4'), 101.4 (d, C-11), 112.1 (d, C-2), 113.3 (s, C-10b), 115.1 (s, C-12a), 118.8 (d, C-9), 121.7 (d, C-7), 121.9 (s, C-6a), 122.8 (s, C-10a), 125.1 (s, C-4a), 128.1 (s, C-4), 129.3 (d, C-3), 139.7 (s, C-8), 142.4 (s, C-4b), 151.8 (s, C-12), 153.2 (s, C-1), 157.3 (s, C-10), 159.8 (s, C-6) ppm.

\*  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten wurden aus einem Mischspektrum von **11** und **34** ermittelt.

### Chrysomycin C (35)

Chrysomycin C (**35**) wurde in einer Kultivierung nach Variante A in Ausbeuten von 5.5 - 7.0 mg/L von dem Stamm produziert. Nach Aufreinigung analog zu der von **11** wurden 0.3 mg isoliert.



**C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>** (510.54)

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.65 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 19.3 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 510 (62) [M]<sup>+</sup>, 392 (10), 379 (100), 363 (42), 350 (8).

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1043.1$  [2M+Na]<sup>+</sup>, 1021.1 [2M+H]<sup>+</sup>, 533.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 511.2 [M+H]<sup>+</sup>, 493.5 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 393.5 [M-118+H]<sup>+</sup>, 363.6 [M-148+H]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen):  $m/z = 1019.2$  [2M-H]<sup>-</sup>, 509.6 [M-H]<sup>-</sup>, 391.4 [M-118-H]<sup>-</sup>.

**HREI-MS:** 510.1890 gefunden wie berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3433, 2924, 1643$  (sh), 1631, 1367, 1061 cm<sup>-1</sup>.

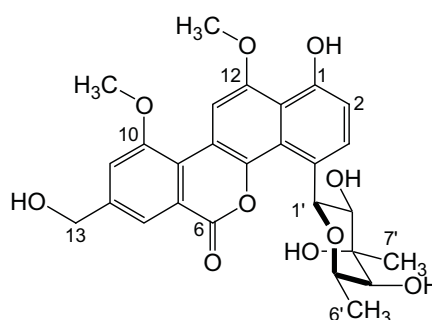
**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (4.24), 243 (4.61), 267 (sh, 4.37), 274 (4.48),  
306 (3.99), 318 (3.98), 326 (3.96), 383 (3.94) nm;

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2^\circ$  (c = 0.10, MeOH).

Aufgrund zu geringer Substanzmengen wurde auf die Aufnahme NMR-spektroskopischer Daten verzichtet.

### **Chrysomycin D (36)**

Das gelbe kristalline Chrysomycin D (**36**) wurde bei der Fermentation nach Variante A2 in Mengen von 0.6 mg/L isoliert. Die Aufreinigung von **36** erfolgte durch zweimalige Säulenchromatographie mit 1. Dichlormethan/Methanol (19:1 → 1:1) und 2. Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittelsysteme und durch anschließende Trennung an der HPLC III (Säule 9, Programm 14).



**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>** (512.51)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 14.4 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), lila (Tetrazolblau).

**EI-MS:** m/z (%) = 512 (16) [M]<sup>+</sup>, 394 (20), 381 (27), 365 (46), 74 (48), 43 (100).

**ESI-MS** (positive Ionen): m/z = 1047.0 [2M+Na]<sup>+</sup>, 1024.9 [2M+H]<sup>+</sup>, 788.9 [2M-236+H]<sup>+</sup>, 513.0 [M+H]<sup>+</sup>, 495.3 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 395.5 [M-118+H]<sup>+</sup>, 365.5 [M-148+H]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen): m/z = 1023.2 [2M-H]<sup>-</sup>, 511.3 [M-H]<sup>-</sup>, 393.5 [2M-118-H]<sup>-</sup>.

**HREI-MS:** 512.1682 gefunden wie berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3438 br, 2952 (sh), 1634, 1376, 1064 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (4.22), 243 (4.28), 267 (sh, 4.06), 276 (4.15),  
305 (3.74), 318 (3.72), 326 (sh), 383 (3.63) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 199 (4.07), 243 (4.25), 267 (sh, 4.03), 275 (4.12),  
305 (3.68), 318 (3.65), 329 (sh), 384 (3.63) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (4.18), 243 (4.17), 267 (sh, 3.91), 275 (3.99),  
305 (3.59), 319 (3.59), 323 (3.58), 382 (3.45) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8^{\circ}$  (c = 0.08, MeOH).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 1.01 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.35 (s, 3H, 7'-H<sub>3</sub>), 3.16 (s, 1H, 4'-H), 3.68 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.01 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 2'-OH), 4.12 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 4.13 (s, 3H, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.51 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, 5'-H), 4.69 (s, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 6.03 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H,

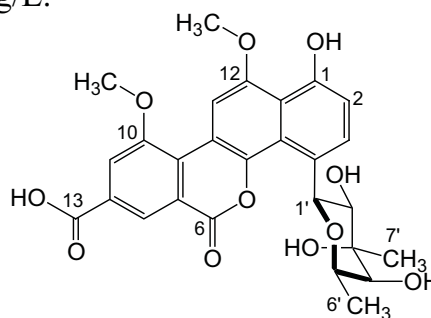
2-H), 7.60 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, 9-H), 7.83 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 3-H), 7.95 (s, 1H, 7-H), 8.51 (s, 1H, 11-H), 9.84 (s, 1H, 1-OH) ppm.

Die 3'-OH-, 4'-OH- und 13-OH-Signale sind nicht detektierbar.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.5 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 17.7$  (q, C-6'), 24.6 (q, C-7'), 57.1 (q, 12-OCH<sub>3</sub>), 57.4 (q, 10-OCH<sub>3</sub>), 62.9 (t, C-13), 71.4 (d, C-5'), 73.3 (d, C-2'), 73.8 (s, C-3'), 75.4 (d, C-1'), 75.6 (d, C-4'), 102.2 (d, C-11), 112.7 (d, C-2), 114.1 (s, C-10b), 115.9 (s, C-12a), 116.7 (d, C-9), 119.2 (d, C-7), 122.4 (s, C-6a), 122.7 (s, C-10a), 125.9 (s, C-4a), 128.8 (s, C-4), 129.9 (d, C-3), 143.0 (s, C-8), 146.1 (s, C-5), 152.6 (s, C-12), 153.9 (s, C-1), 157.8 (s, C-10), 160.7 (s, C-6) ppm.

### Chrysomycin E (37)

Bei der Kultivierung nach Variante A2 wurde **37** nach zweimaliger Säulenchromatographie an Kieselgel (1. Dichlormethan/Methanol 19:1 → 1:1, 2. Chloroform/Methanol 9:1) und anschließender Trennung an der HPLC III (Säule 9, Programm 15) isoliert. Die Ausbeute betrug 0.2 mg/L.



$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  (526.50)

$R_f$ -Wert: 0.28 (Chloroform/Methanol 9:1).

$R_t$  (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 15.1 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), blau (Tetrazolblau).

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1075.0$   $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1053.1  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 810.1  $[2\text{M}-243+\text{H}]^+$ , 550.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 527.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 509.4  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ .

**ESI-MS** (negative Ionen):  $m/z = 1051.3$   $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , 525.5  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 407.4  $[\text{M}-118-\text{H}]^-$ .

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3435, 2929, 1682, 1631, 1383, 1211, 1135, 804$   $\text{cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 243 (3.61), 267 (sh, 3.36), 275 (3.47), 307 (3.01), 332 (2.95), 385 (2.88) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 244 (3.57), 267 (sh, 3.32), 275 (3.44), 307 (2.93), 329 (2.88), 386 (2.79) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 243 (3.40), 267 (sh, 3.03), 275 (3.20), 307 (2.44), 327 (2.57), 388 (2.29) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6^\circ$  ( $c = 0.03$ , MeOH).



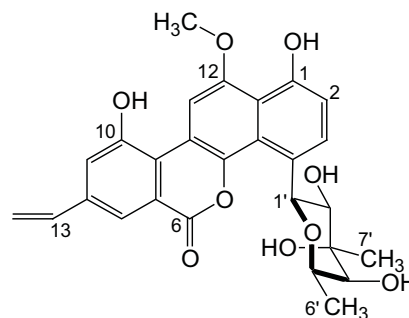
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 1.19$  (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, 6'- $\text{H}_3$ ), 1.43 (s, 3H, 7'- $\text{H}_3$ ), 3.93 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 2'-H), 4.18 (s, 6H, 10- $\text{OCH}_3$ , 12- $\text{OCH}_3$ ), 6.25 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 1'-H), 6.98 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 2-H), 7.62 (s, 1H, 9-H), 7.92 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 3-H), 8.05 (s, 1H, 7-H), 8.63 (s, 1H, 11-H) ppm.

Die 4'-H- und 5'-H-Signale sind von den Lösungsmittelsignalen überlagert. 5'-H-Signal ( $\delta_{\text{H}} = 4.83$  ppm) ist über COSY-Korrelation beobachtbar.

Aufgrund zu geringer Substanzmengen waren keine  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren erhältlich.

### Chrysomycin A<sub>2</sub> (38)

**38** konnte als gelbe kristalline Substanz bei der Fermentation nach Variante A2 isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte gemäß der von **37**. Die Ausbeute lag bei 0.4 mg/L.



**C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>** (494.50)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 16.1 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), blau (Tetrazolblau).

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1482.6$  [ $3\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 1011.0 [ $2\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 989.0 [ $2\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 495.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 477.2 [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 377.4 [ $\text{M}-118+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 347.4 [ $\text{M}-148+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen):  $m/z = 1480.9$  [ $3\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>, 987.2 [ $2\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>, 493.5 [ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3433, 2925, 1682, 1633$  (sh), 1383, 1211, 1135, 804  $\text{cm}^{-1}$ .

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (3.76), 248 (3.56), 277 (3.43), 286 (3.42), 308 (sh), 320 (sh), 334 (sh), 345 (sh), 392 (3.02) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 225 (sh), 248 (3.49), 277 (3.35), 286 (3.34), 306 (sh), 317 (sh), 331 (sh), 345 (sh), 393 (2.92) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 230 (3.16), 267 (4.41), 343 (2.65), 407 (sh, 2.90), 423 (2.94) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7^\circ$  (c = 0.08, MeOH).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 1.21$  (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, 6'- $\text{H}_3$ ), 1.44 (s, 3H, 7'- $\text{H}_3$ ), 3.99 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 2'-H), 4.13 (s, 3H, 12- $\text{OCH}_3$ ), 5.40 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, 14- $\text{H}_a$ ), 5.91 (d,  $J = 17.5$  Hz, 1H, 14- $\text{H}_b$ ), 6.25 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 1'-H), 6.78 (dd,  $J = 17.5, 11.0$  Hz, 1H, 13-H), 6.95 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 2-H), 7.34 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,

9-H), 7.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 3-H), 7.92 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H, 7-H), 8.74 (s, 1H, 11-H) ppm.

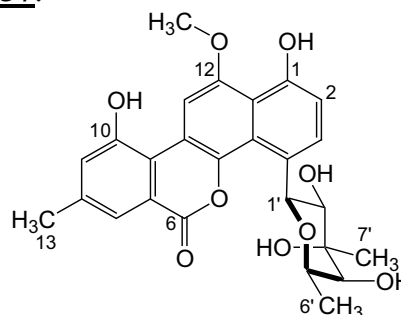
Die 4'-H- und 5'-H-Signale sind vom Lösungsmittelsignal überdeckt. Das 5'-H-Signal ( $\delta_{\text{H}} = 4.77$  ppm) ist über COSY-Korrelation beobachtbar.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.01$  (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.23 (s, 3H, 7'-H<sub>3</sub>), 3.14-3.17 (m, 1H, 4'-H), 3.67 (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H, 2'-H), 4.10 (s, 1H, 12-OCH<sub>3</sub>), 4.12-4.14 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 4.50 (m<sub>c</sub>, 2H, 5'-H, 4'-OH), 5.44 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, 14-H<sub>a</sub>), 5.92 (d,  $J = 17.8$  Hz, 1H, 14-H<sub>b</sub>), 6.03 (d,  $J = 9.8$ , 1H, 1'-H), 6.87 (dd,  $J = 17.8$ , 11.0 Hz, 1H, 13-H), 6.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 2-H), 7.52 (s, 1H, 9-H), 7.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 3-H), 7.90 (s, 1H, 7-H), 8.72 (s, 1H, 11-H), 9.80 (s, 1H, 1-OH) ppm.

Aufgrund zu geringer Substanzmengen war es nicht möglich  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren aufzunehmen.

### **Chrysomycin B<sub>2</sub> (39)**

Chrysomycin B<sub>2</sub> (**39**) fiel bei der Fermentation nach Variation A2 in einer Ausbeute von 0.3 mg/L an. Die Isolierung erfolgte analog zu **37**.



**C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>** (482.49)

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.32 (Chloroform/Methanol 9:1).

**R<sub>t</sub>** (HPLC II, Säule 8, Programm 13): 15.3 min.

**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd, Vanillin/Schwefelsäure), blau (Tetrazolblau).

**ESI-MS** (positive Ionen):  $m/z = 1446.6$  [3M+H]<sup>+</sup>, 987.0 [2M+Na]<sup>+</sup>, 965.0 [2M+H]<sup>+</sup>, 506.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 483.2 [M+H]<sup>+</sup>, 465.3 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 365.5 [M-118+H]<sup>+</sup>.

**ESI-MS** (negative Ionen):  $m/z = 1445.0$  [3M-H]<sup>-</sup>, 963.2 [2M-H]<sup>-</sup>, 481.5 [M-H]<sup>-</sup>.

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3432, 2926, 1682, 1624$  (sh), 1437, 1383, 1211, 1137, 804 cm<sup>-1</sup>.

**UV** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 198 (3.66), 246 (3.73), 267 (sh, 3.44), 274 (3.50), 305 (3.14), 319 (3.13), 329 (3.09), 383 (3.00) nm;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (3.88), 245 (3.97), 267 (sh, 3.81), 274 (3.83), 305 (3.65), 318 (3.63), 379 (3.42) nm;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 222 (3.39), 252 (3.70), 284 (3.16), 340 (3.05), 345 (3.03), 397 (3.09) nm.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5^{\circ}$  (c = 0.06, MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 1.21 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.44 (s, 3H, 7'-H<sub>3</sub>), 2.44 (s, 3H, 8-CH<sub>3</sub>), 4.01 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.13 (s, 3H, 12-OCH<sub>3</sub>), 6.25 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.94 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, 2-H), 7.09 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 9-H), 7.72 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 7-H), 7.89 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 8.74 (s, 1H, 11-H) ppm.

Das 4'-H-Signal ist vom Methanolsignal überlagert, das 5'-H-Signal ( $\delta_{\text{H}} = 4.77$  ppm) ist über COSY-Korrelation beobachtbar.

Aufgrund zu geringer Substanzmengen war es nicht möglich <sup>13</sup>C-NMR-Spektren zu erhalten.

## 6. Versuche zur gegenseitigen Beeinflussung von *Streptomyces* sp. Tü 2471 und *Streptomyces* sp. Tü 6024

### 6.1. Agarplatten-Ausstriche

Auf M2Ca-Agarplatten wurden die Stämme Tü 2471 und Tü 6024 sowohl in Schlangenlinien als auch im Kreuzstrichverfahren (siehe Abbildung 62 auf S. 107) ausgestrichen. Die Platten wurde für 5 Tage bei 28 °C inkubiert und anschließend das Wachstumsverhalten und die Luftmycelbildung beider Stämme beobachtet.

### 6.2. Flüssige Mischkulturen

#### Vorkulturen

Die Vorkulturen der beiden Stämme wurde wie in Kapitel B.III.4.1 beschrieben fermentiert.

#### Hauptkulturen

Alle Ansätze wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit je 100 mL SM-Nährlösung (ohne Schikanen, Schaumstoffkappen) bei 250 rpm und 28 °C für die Dauer von 96 h kultiviert. Jeder Ansatz wurde zweimal durchgeführt. Die Inkubation der Hauptkulturen mit den beiden Stämmen erfolgte auf unterschiedliche Arten. Zum Vergleich wurden jeweils Reinkulturen mitfermentiert.

**Methode 1:** Die Kolben wurden mit je einem 1/12 Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beider Stämme beimpft.

**Methode 2:** Die Hauptkulturen sowohl von Tü 2471 als auch von Tü 6024 wurden mit einem 1/12 Agarstück angeimpft und für 8 h als Reinkultur fermentiert. Anschließend wurde zu jedem Kolben der jeweils andere Stamm in Form eines Agarstücks hinzugefügt und die Mischkultur für 96 h fermentiert.

**Methode 3:** Die Kolben wurden mit insgesamt 8 mL Vorkultur in den Verhältnissen 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3 und 2:1 (Tü 2471:Tü 6024) beimpft.

Die Kulturbrühen wurden wie in Kapitel B.III.2. beschrieben aufgearbeitet.

### **Scale-up der Methode 3: Tü 2471 : Tü 6024 (1:3)**

#### **Schüttelkolben**

Mischfermentation in Schüttelkolben (20 Kolben) erfolgte analog zu der oben beschriebenen Hauptkultur.

#### **Biostat-B-Fermenter**

Kultivierungen im Biostat-B-Fermenter (5 L) führte man bei einer Temperatur von 28 °C, einer Luftzufuhr von 2 vvm und einer Umdrehung von 400 rpm durch. Der Fermenter wurde mit 4.6 L SM-Nährlösung gefüllt und mit insgesamt 400 mL Vorkultur im Verhältnis 1:3 angeimpft. Die Ernte erfolgte nach 4 Tagen.

Die Aufarbeitung der Fermentationsansätze erfolgte gemäß Kapitel B.III.4.3 auf S. 147.

## C. Anhang

### I. Kristalldaten der Verbindungen (14) und (19)

**Tabelle 36:** Kristalldaten, Aufnahmeparameter, Intensitätsmessungen und Verfeinerung für die Verbindungen (14) und (19).

	Viscotoxin A3 in house	Viscotoxin A3 DESY (X31)	Viscotoxin B2 DESY (X13)
Kristallsystem	orthorhombisch	orthorhombisch	orthorhombisch
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Wellenlänge	1.542 Å	0.980 Å	0.801 Å
Zelldimensionen	a=25.346 Å b=47.697 Å c=68.773 Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=90^\circ$ $\gamma=90^\circ$	a=25.264 Å b=47.995 Å c=68.593 Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=90^\circ$ $\gamma=90^\circ$	a=39.819 Å b=40.392 Å c=44.694 Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=90^\circ$ $\gamma=90^\circ$
Z	2	2	2
Temperatur	100 K	100 K	100 K
Gemessene Reflexe	333486	49345	834968
Unabhängige Reflexe	4490	9690	39686
Auflösung (äußerste Schale)	2.20 (2.30-2.20)	1.70 (1.80-1.70)	1.00 (1.10-1.00)
Vollständigkeit	96.8% (75.3%)	99.7% (97.7%)	99.5% (98.4%)
R <sub>int</sub>	0.0485 (0.1082)	0.0928 (0.4068)	0.0675 (0.3415)
Redundanz	71.87 (4.16)	5.07 (3.62)	20.93 (19.73)
I/ $\sigma$	93.85 (10.61)	13.42 (3.26)	23.31 (8.73)

**Tabelle 37:** Verfeinerungsdaten für die Verbindungen (14) und (19).

	Viscotoxin A3	Viscotoxin B2
Auflösungsbereich (Å)	68.59–1.70	44.69–1.00
R <sub>work</sub> (F>4σ(F)/alle Daten)	0.1662 / 0.1963	0.1988 / 0.2067
R <sub>free</sub> (F>4σ(F)/alle Daten)	0.2443 / 0.2682	0.2279 / 0.2359
Anzahl der Aminosäurereste	92	92
Anzahl nicht-H Atome	3126	2972
Anzahl der Wassermoleküle	102	61
	Abweichung von der idealen Geometrie	
Bindungslänge (Å)	0.007	0.036
Angle distances (Å)	0.023	0.033
	Ramachandran plot	
Residues in allowed region	97.1%	95.8%
Residues in additionally allowed region	2.9%	4.2%
Residues in not allowed region	0%	0%

## II. Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Name	Drei- Buchstabencode	Ein- Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	D
Asparaginsäure	Asp	N
Carboxymethylcystein	CMC	-
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
unbekannte Aminosäure	Xaa	X

### III. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APT	Attached Proton Test
äq.	Äquivalente
ber.	berechnet
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CID	Collision Induced Dissoziation
COSY	Correlated Spectroscopy
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ED <sub>50</sub>	Mittlere Effektivdosis
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FG	Frischgewicht
FT-ICR	Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz
gef.	gefunden
GI <sub>50</sub>	Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarot(-Spektrum)
KG	Kieselgel
LC <sub>50</sub>	Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt, d. h. die 24 h nach Aussaat die vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis <sub>50</sub>
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
M <sub>av</sub>	Durchschnittsmasse
ML	Mistellektin
M <sub>mo</sub>	monoisotopische Masse



MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
nb	nicht bestimmt
NCI	National Cancer Institute
nd	nicht detektierbar
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OSMAC	One Strain-Many Compounds-Konzept
PTH	Phenylthiohydantoin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor für die Dünnschichtchromatographie
RPC	Reversed Phase Chromatography
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit / HPLC
Sdp.	Siedepunkt
TFA	Trifluoressigsäure
TGI	Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total-Ionenstrom Chromatogramm
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett(-Spektrum)
VE-K	Viscotoxin-Extrakt aus Kiefernmisteln
VE-P	Viscotoxin-Extrakt aus Pappelmisteln
VT 1-PS	Viscotoxin 1-PS
VT A1	Viscotoxin A1
VT A2	Viscotoxin A2
VT A3	Viscotoxin A3
VT A3 <sub>r</sub>	reduziertes Viscotoxin A3
VT A3 <sub>rcm</sub>	reduktiv-carboxymethyliertes Viscotoxin A3
VT A3 <sub>t</sub>	tryptisch abgebautes natives Viscotoxin A3
VT A3 <sub>trcm</sub>	tryptisch abgebautes reduktiv-carboxymethyliertes Viscotoxin A3
VT B	Viscotoxin B
VT U-PS <sub>r</sub>	reduziertes Viscotoxin U-PS
VT U-PS <sub>rcm</sub>	reduktiv-carboxymethyliertes Viscotoxin U-PS

---

VT U-PS	Viscotoxin U-PS
VT	Viscotoxin
vvm	volume per volume per minute

## IV. Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Daten des statistischen Bundesamtes Deutschland, Wiesbaden **2001**.
- <sup>2</sup> *Krebs in Deutschland – Häufigkeit und Trends*, (Hrsg.: Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut), 2. aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken **1999**.
- <sup>3</sup> J. Mann, *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2, 143-148.
- <sup>4</sup> C. G. Zubrod, *Cancer Treat. Rep.* **1984**, 68, 9-19.
- <sup>5</sup> M. V. Blagosklonny, T. Tojo, *Int. J. Cancer* **1999**, 83, 151-156.
- <sup>6</sup> G. R. Pettit, F. H. Pierson, C. L. Herald, *Anticancer Drugs from Animals, Plants and Microorganisms*, Wiley VCH, New York **1994**.
- <sup>7</sup> J. Avila, *Cancer J.* **1997**, 10, 315-318.
- <sup>8</sup> E. Jonsson, *Eur. J. Cancer* **2000**, 36, 2120-2127.
- <sup>9</sup> K. R. Hande, *Biochem. Biophys. Acta* **1998**, 1400, 173-184.
- <sup>10</sup> G. Höfle, *Angew. Chemie* **1996**, 35, 1567-1569.
- <sup>11</sup> D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 1-6.
- <sup>12</sup> D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 17, 50-65.
- <sup>13</sup> B. Nuijen, *Anti-Cancer Drugs* **2000**, 11, 793-811.
- <sup>14</sup> R. Mutter, M. Wills, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1841-1860.
- <sup>15</sup> P. A. Wender, B. Lipka, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1007-1011.
- <sup>16</sup> G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495-497.
- <sup>17</sup> P. J. Hudson, *Expert. Opin. Invest. Drugs* **2000**, 9, 1231-1242.
- <sup>18</sup> F. T. Boyle, G. F. Costelo, *Chem. Soc. Reviews* **1998**, 27, 251-261.
- <sup>19</sup> F. Schmidt, I. Ungureanu, R. Duval, A. Pompon, C. Monneret, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2129-2134.
- <sup>20</sup> F. T. Boyle, G. F. Costelo, *Chem. Soc. Reviews* **1998**, 27, 251-261.
- <sup>21</sup> J. B. Gibbs, *Science* **2000**, 287, 1969-1973.
- <sup>22</sup> O. Janssen, A. Scheffler, D. Kabelitz, *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **1993**, 43, 1221-1227.
- <sup>23</sup> T. Hajito, K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf, *Cancer Res.* **1990**, 50, 3322-3326.
- <sup>24</sup> A. Büssing, in: *Grundlagen der Misteltherapie* (Hrsg.: R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg), Hippokrates Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**, 191-196 und Zitate darin.

- <sup>25</sup> D. Schlodder, in: *Grundlagen der Misteltherapie* (Hrsg.: R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg), Hippokrates Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**, 339-351 und Zitate darin.
- <sup>26</sup> T. Olson, G. Samuelsson, *Acta. Chem. Scand.* **1972**, 26, 585-595.
- <sup>27</sup> G. Samuelsson, L. Seger, T. Olson, *Acta. Chem. Scand.* **1968**, 22, 2624-2642.
- <sup>28</sup> G. Schaller, K. Urech, *Phytother. Res.* **1996**, 10, 473-477.
- <sup>29</sup> O. Schmeil, J. Fitschen, *Flora von Deutschland und angrenzender Länder*, 89. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden **1993**.
- <sup>30</sup> H. Becker, *Oncology* **1986**, 43, suppl. 1, 2-7.
- <sup>31</sup> B. A. Barlow, in: *The Biology of Mistletoes* (Hrsg.: M. Calder, P. Bernhardt), Academic Press, Sydney **1983**, 19-46.
- <sup>32</sup> D. W. Kirkup, R. M. Polhill, D. Wiens, in: *Mistletoe The Genus Viscum* (Hrsg.: A. Büssing), Harwood Academic Publishers, Singapore, Amsterdam **2000**, 7-31.
- <sup>33</sup> G. Hegi, *Illustrierte Flora von Mitteleuropa III*, 1, Parey Verlag, Berlin **1981**, 309-321.
- <sup>34</sup> H. Becker, *Habilitationsschrift*, Universität Karlsruhe, **1973**.
- <sup>35</sup> N. Sélédzhanu, D. Galan-Fabian, *Fiziol. Rast.* **1961**, 8, 547-554.
- <sup>36</sup> G. Grazi, M. Zemp, *Über den Ginster (Genista cinera) als Sammelwirt für Laubholzmistel und Kiefern-mistel*, 8. Symp. Morphologie, Anatomie, Systematik, Hamburg **1985**.
- <sup>37</sup> R. Dorka, in: *Grundlagen der Misteltherapie* (Hrsg.: R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg), Hippokrates Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**, 21-45.
- <sup>38</sup> K. von Tubeuf, *Monographie der Mistel*, R. Oldenbourg Verlag, Berlin, München **1923**.
- <sup>39</sup> W. Nagl, B. Stein, *Plant Systematics and Evolution* **1989**, 166, 243-248.
- <sup>40</sup> O. Wolff, *Die Mistel in der Krebsbehandlung*, Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt am Main **1975**.
- <sup>41</sup> E. Teuscher, in: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Band 6, 5. Auflage (Hrsg.: R. Hänsel, K. Keller, H. Rimpler, G. Schneider), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **1994**, 1160-1183.

- <sup>42</sup> A. Büssing, in: *Mistletoe The Genus Viscum* (Hrsg.: A. Büssing), Harwood Academic Publishers, Singapore, Amsterdam **2000**, 1-6.
- <sup>43</sup> H. Franz, *Pharmazie* **1985**, *40*, 97-104.
- <sup>44</sup> R. Steiner, *Geisteswissenschaft und Medizin*, 4. Auflage, Rudolf Steiner Nachlaßverwaltung, Dornach **1961**.
- <sup>45</sup> A. Büssing, in: *Mistletoe The Genus Viscum* (Hrsg.: A. Büssing), Harwood Academic Publishers, Singapore, Amsterdam **2000**, 209-221.
- <sup>46</sup> U. Pfüller, in: *Mistletoe The Genus Viscum* (Hrsg.: A. Büssing), Harwood Academic Publishers, Singapore, Amsterdam **2000**, 101-122.
- <sup>47</sup> M. Schink, *Dissertation*, Universität Hohenheim **1990**.
- <sup>48</sup> G. Schaller, K. Urech, G. Gianfranco, in: *MistiHeinn - Beiträge zur Mistelforschung*, Hiscia **2000/01**, Verein für Krebsforschung, CH-4144 Arlesheim.
- <sup>49</sup> K. Winterfeld, *Pharmaz. Ind.* **1942**, 37-41.
- <sup>50</sup> K. Winterfeld, M. Bijl, *Ann.* **1948**, *561*, 107-115.
- <sup>51</sup> D. E. A. Florack, W. J. Stieckma, *Plant Mol. Biol.* **1994**, *26*, 25-37.
- <sup>52</sup> M. J. Carmona, A. Molina, J. A. Fernández, J. J. López-Fando, F. García-Olmedo, *Plant J.* **1993**, *3*, 457-462.
- <sup>53</sup> P. Epple, K. Apel, H. Bohlmann, *Plant Cell* **1997**, *9*, 509-520.
- <sup>54</sup> S. Rosell, G. Samuelsson, *Toxicon* **1966**, *4*, 107.
- <sup>55</sup> S. Orrù, A. Scaloni, M. Giannattasio, K. Urech, P. Pucci, G. Schaller, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 989-996.
- <sup>56</sup> G. Samuelsson, B. Pettersson, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 86-89.
- <sup>57</sup> G. Samuelsson, A. L. Jayawardene, *Acta Pharm. Suedica* **1974**, *11*, 175-184.
- <sup>58</sup> G. Ribéreau-Gayon, M. L. Jung, S. Baudino, G. Salle, J. P. Beck, *Experientia* **1986**, *42*, 594-599.
- <sup>59</sup> J. Tabiasco, F. Pont, J.-J. Fournié, A. Vercellone, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2591-2600.
- <sup>60</sup> L. Carrasco, D. Vasquez, C. Hernandez-Lucas, P. Carbonero, F. Garcia-Olmedo, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *116*, 185-195.
- <sup>61</sup> G. Schrader-Fischer, K. Apel, *Eur. J. Biochem* **1991**, *198*, 549-553.
- <sup>62</sup> A. Scheffler, C. Richter, M. Beffert, M. Errenst, R. Scheer, in: *Grundlagen der Misteltherapie* (Hrsg.: R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg), Hippokrates Verlag, K.

- und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**, 49-76.
- <sup>63</sup> G. Schrader-Fischer, K. Apel, *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 745-749.
- <sup>64</sup> P. Luther, H. Becker, *Die Mistel – Botanik, Lektine, medizinische Anwendung*, VEB Verlag, Berlin **1986**.
- <sup>65</sup> G. Schaller, K. Urech, M. Giannattasio, C. Jäggy, in: *Grundlagen der Misteltherapie* (Hrsg.: R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg), Hippokrates Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**, 105-110.
- <sup>66</sup> M. Krüpe, *Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper*, Enke, Stuttgart **1956**.
- <sup>67</sup> R. Scheer, H. Becker, P. A. Berg (Hrsg.), *Grundlagen der Misteltherapie*, Hippokrates Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Stuttgart **1996**.
- <sup>68</sup> R. Scheer, R. Bauer, H. Becker, P. A. Berg, V. Fintelmann (Hrsg.), *Die Mistel in der Tumortherapie*, KVC Verlag, K. und V. Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Essen **2001**.
- <sup>69</sup> J. Kocourek, V. Horejsi, *Nature* **1981**, *290*, 188.
- <sup>70</sup> H. Franz, *Oncology* **1986**, *43*, suppl. 1, 23-34.
- <sup>71</sup> M. H. Soler, S. Stoeva, C. Schwamborn, S. Wilhelm, T. Stiefel, W. Voelter, *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 153-157.
- <sup>72</sup> M. H. Soler, S. Stoeva, W. Voelter, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *246*, 596-601.
- <sup>73</sup> G. Lutsch, F. Noll, P. Ziska, A. Kindt, H. Franz, *FEBS Lett.* **1984**, *170*, 335-338.
- <sup>74</sup> N. Baxevanis, I. F. Vontsas, M. H. Soler, A. D. Gritzapis, O. E. Tsitsilonis, S. Stoeva, W. Voelter, P. Arsenis, M. Papamichail, *Immunopharm. Immunotox.* **1998**, *20*, 355-372.
- <sup>75</sup> W. Verwecken, S. Kleff, K. Pfüller, A. Büssing, *Int. J. Biochem. Cell* **2000**, *32*, 317-326.
- <sup>76</sup> F. Stirpe, R. Legg, L. Onyon, P. Ziska, H. Franz, *Biochem. J.* **1980**, *190*, 843-845.
- <sup>77</sup> M. Langer, B. Möckel, J. Eck, H. Zinke, H. Lentzen, *Biochem. Biophys. Res. Communic.* **1999**, *264*, 944-948.
- <sup>78</sup> A. Büssing, *Apoptosis* **1996**, *1*, 25-32.

- <sup>79</sup> S. Bardocz, U. Pfüller, A. Pusztai (Hrsg.), *Immuno-modulating and antitumour effects of Lectins of Mistletoe and Kidney Bean*, COST 98, Vol. 5, European Communities, Luxembourg **1998**.
- <sup>80</sup> J. Beuth, H.-L. Ko, L. Tunggal, G. Buss, J. Jeljaszewicz, M. K. Steuer, G. Pulverer, *Drug Res.* **1994**, *44*, 1255-1258.
- <sup>81</sup> J. Beuth, H.-L. Ko, L. Tunggal, J. Geisel, G. Pulverer, *Drug Res.* **1993**, *43*, 166-169.
- <sup>82</sup> T. Hajto, K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf, H.-J. Gabius, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3322-3326.
- <sup>83</sup> B.-M. Heiny, J. Beuth, *Anticancer Res.* **1994**, *14*, 1339-1342.
- <sup>84</sup> U. Valentiner, U. Pfüller, C. Baum, U. Schumacher, *Toxicology* **2002**, *171*, 187-199.
- <sup>85</sup> J. Eck, M. Langer, B. Möckel, A. Bauer, H. Zinke, H. Lentzen, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 275-284.
- <sup>86</sup> U. Schumacher, S. Feldhaus, U. Mengs, *Cancer Lett.* **2000**, *150*, 171-175.
- <sup>87</sup> K. Urech, in: *Parasitic Flowering Plants*, (Hrsg.: H. C. Weber, W. Forstreuter), Marburg **1987**, 781-788.
- <sup>88</sup> H. Rennenberg, R. Schupp, A. Schneider, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 975-977.
- <sup>89</sup> B. Csokay, N. Prajda, G. Weber, E. Olah, *Life Sci.* **1997**, *60*, 2157-2163.
- <sup>90</sup> H. Wagner, B. Feil, O. Seligmann, J. Petricic, Z. Kalogjera, *Planta Medica* **1986**, *2*, 102-104.
- <sup>91</sup> T. Fununaga, I. Kajikawa, K. Nishiya, Y. Watanabe, K. Takeya, H. Itokawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3292-3297.
- <sup>92</sup> E. Jordan, H. Wagner, *Oncology* **1986**, *43*, suppl. 1, 8-15.
- <sup>93</sup> G. M. Stein, U. Edlund, U. Pfüller, A. Büssing, M. Schietzel, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 3907-3914.
- <sup>94</sup> M. Aguilar, M. Hearn, *Methods Enzymol.*, **1996**, *270*, 3-26.
- <sup>95</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1998**.
- <sup>96</sup> D. R. Lide (Hrsg.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81. Auflage, CRC Press, Boca Raton, FL **2001**.
- <sup>97</sup> S. Jäger, B. Girmann, *Öschelbronner Akzente*, 35. Jahresbericht des Carl Gustav Carus-Instituts und der Klinik Öschelbronn **2002**, 45-47.

- <sup>98</sup> P. Claeson, U. Göransson, S. Johansson, T. Luijendijk, L. Bohlin, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 77-81.
- <sup>99</sup> H. Sternbach, *Chromatographische Methoden in der Biochemie*, Kapitel 5, Thieme Verlag, Stuttgart **1991**.
- <sup>100</sup> K. Urech, *Der Merkurstab*, **1992**, *45*, 445-453.
- <sup>101</sup> K. Urech, G. Schaller, *Phytother. Res.* **1995**, *9*, 49-55.
- <sup>102</sup> A. Büssing, M. Wagner, B. Wagner, G. M. Stein, M. Schietzel, G. Schaller, U. Pfüller, *Cancer Lett.* **1999**, *139*, 79-88.
- <sup>103</sup> A. Büssing, G. M. Stein, M. Wagner, B. Wagner, G. Schaller, U. Pfüller, M. Schietzel, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262*, 79-87.
- <sup>104</sup> A. Büssing, W. Verwecken, M. Wagner, B. Wagner, U. Pfüller, A. Schietzel, *Cytometry* **1999**, *37*, 131-139.
- <sup>105</sup> P. Hughes, E. Dennis, M. Whitecross, D. Llewellyn, P. Gage, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 823-827.
- <sup>106</sup> K. Thevissen, A. Ghazi, G. W. De Samblanx, C. Brownlee, R. W. Osborn, W. F. Broekart, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15018-15025.
- <sup>107</sup> A. Coulon, E. Berkane, A.-M. Sautereau, K. Urech, P. Rougé, A. Lopez, *Biochim. et Biophys. Acta* **2002**, *1559*, 145-159.
- <sup>108</sup> G. M. Stein, G. Schaller, U. Pfüller, M. Wagner, B. Wagner, M. Schietzel, A. Büssing, *Biochim. et Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 80-90.
- <sup>109</sup> J. Tabiasco, F. Pont, J.-J. Fournié, A. Vercellone, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2591-2600.
- <sup>110</sup> G. Samuelsson, *Syst. Zool.* **1973**, *22*, 566-570.
- <sup>111</sup> J. M. Woynarowski, J. Konopa, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1980**, *361*, 1535-1545.
- <sup>112</sup> M. R. Grever, S. A. Schepartz, B. A. Chabner, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622-638.
- <sup>113</sup> U. Rao, B. Stec, M. M. Teeter, *Acta Cryst.* **1995**, *D51*, 904-913.
- <sup>114</sup> B. Stec, U. Rao, M. M. Teeter, *Acta Cryst.* **1995**, *D51*, 914-924.
- <sup>115</sup> G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 13. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart **1989**.
- <sup>116</sup> D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York **2001**.



- <sup>117</sup> H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin **2000**.
- <sup>118</sup> P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- <sup>119</sup> P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*, 80-91.
- <sup>120</sup> S. Romagnoli, R. Ugolini, F. Fogolari, G. Schaller, K. Urech, M. Giannattasio, L. Ragonas, H. Molinari, *Biochem. J.* **2000**, *350*, 569-577.
- <sup>121</sup> Suche in den Datenbanken TrEMBL, TrEMBL\_new, SWISS-PROT mit dem *ExpASY BLAST2 Interface*; NCBI BLAST program reference: S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- <sup>122</sup> E. Mendez, A. Moreno, F. Colilla, F. Pelaez, G. G. Limas, R. Mendez, F. Soriano, M. Salinas, C. de Haro, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 533-539.
- <sup>123</sup> F. J. Colilla, A. Rocher, E. Mendez, *FEBS Lett.* **1990**, *270*, 191-194.
- <sup>124</sup> F. R. G. Terras, S. Torrekens, F. van Leuven, R. W. Osborn, J. Vanderleyden, B. P. A. Cammue, W. F. Broekaert, *FEBS Lett.* **1993**, *316*, 233-240.
- <sup>125</sup> M. Bruix, M. A. Jimenez, J. Santoro, C. Gonzalez, F. J. Colilla, E. Mendez, M. Rico, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 715-724.
- <sup>126</sup> A. Ducruix, R. Griegé, *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins*, 1. Aufl., Oxford University Press, New York **1992**, 73-98.
- <sup>127</sup> A. McPherson, *J. Crystal Growth* **1998**, *122*, 161-167.
- <sup>128</sup> J. E. Debreczeni, G. Bunkóczi, B. Girmann, G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2003**, *D59* in press.
- <sup>129</sup> K. H. Han, K. H. Park, H. J. Yoo, H. Cha, S. W. Suh, F. Thomas, T. S. Moon, S. M. Kim, *Biochem. J.* **1996**, *313*, 885-892.
- <sup>130</sup> A. M. Bonvin, J. A. Rullmann, R. M. Lamerichs, R. Boelens, R. Kaptein, *Proteins*, **1993**, *15*, 385-400.
- <sup>131</sup> C. J. Harrison, A. A. Bohm, H. C. Nelson, *Science* **1994**, *263*, 224-227.
- <sup>132</sup> S. Breiding-Mack, *Dissertation*, Universität Göttingen **1984**.
- <sup>133</sup> S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953-960.
- <sup>134</sup> C. Albrecht, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **1986**.
- <sup>135</sup> H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619-627.
- <sup>136</sup> R. Höfs, M. Walker, A. Zeeck, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3400-3402; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3258-3261.

- <sup>137</sup> S. Grabley, J. Wink, A. Zeeck in *Jahrbuch der Biotechnologie* Bd. 3 (Hrsg.: P. Präve, M. Schlingermann, W. Crueger, K. Essner, R. Theuner, F. Wagner), Carl Hanser Verlag, München **1990**, 379-390.
- <sup>138</sup> S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck in *Drug Discovery from Nature* (Eds.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Heidelberg **1999**, 124-148.
- <sup>139</sup> J. Fuchser, *Dissertation* (ISBN 3-9804857-1-4), Klaus Bielefeld Verlag, Göttingen **1995**.
- <sup>140</sup> J. Fuchser, A. Zeeck, *Liebigs Ann.* **1997**, *1*, 87-95.
- <sup>141</sup> H. J. Schiewe, *Dissertation* (ISBN 3-932325-30-3), Klaus Bielefeld Verlag, Göttingen **1997**.
- <sup>142</sup> R. Höfs, *Dissertation* (ISBN 3-932325-74-5), Klaus Bielefeld Verlag, Göttingen **1999**.
- <sup>143</sup> R. Höfs, S. Schoppe, R. Thiericke, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *10*, 1883-1887.
- <sup>144</sup> G. G. Yarbrough, D. P. Taylor, R. T. Rowlands, M. S. Crawford, L. L. Lasure, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 535-544.
- <sup>145</sup> W. Krueger, A. Krueger, *Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, 3. Auflage, Oldenbourg Verlag, München, Wien **1989**.
- <sup>146</sup> F. G. Bader in *The Bacteria* (Eds.: I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch, L. N. Ornston), Band 9, *Antibiotic-producing Streptomyces* (Eds.: S. W. Queener, L. E. Day), Academic Press, London **1986**, 281-321.
- <sup>147</sup> K. Ueda, Y. Tomaru, K. Endoh, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 693-695.
- <sup>148</sup> L. Krasu, A. Kocj, S. Hoffstetter-Kuhn, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York **1995**.
- <sup>149</sup> C. Boddien, *Dissertation*, Universität Göttingen **1995**.
- <sup>150</sup> C. Volkmann, *Dissertation*, Universität Göttingen **1993**.
- <sup>151</sup> O. Potterat, H. Zähler, C. Volkmann, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 346-349.
- <sup>152</sup> C. Puder, *Dissertation* (ISBN 3-89712-378-9), Cuvillier Verlag, Göttingen **1998**.
- <sup>153</sup> K. Hatano, E. Higashide, M. Shibata, Y. Kameda, S. Horii, K. Mizumo, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1157-1163.
- <sup>154</sup> H. Nakano, Y. Matsuda, K. Ito, S. Ohkubo, M. Morimoto, F. Tomita, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 266-270.

- <sup>155</sup> D. M. Balitz, F. A. O' Herron, J. Bush, D. M. Vyas, D. E. Nettleton, R. E. Grulich, W. T. Bradner, T. W. Doyle, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 1544-1555.
- <sup>156</sup> T. C. Jain, G. C. Simolike. L .M. Jackman, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 599-605.
- <sup>157</sup> K. Takahashi, M. Yoshida, F. Tomita, K. Shirahata, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 271-275.
- <sup>158</sup> S. Horii, H. Fukase, E. Mizuta, K. Hatano, K. Mizuno, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 3601-3611.
- <sup>159</sup> T. T. Wei, K. M. Byrne, D. Warnick-Pickle, M. Greenstein, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 545-548.
- <sup>160</sup> C. D. Lytle, S. J. Wagner, K. N. Prodouz, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 818-821.
- <sup>161</sup> M. Morimoto, S. Okubo, F. Tomita, H. Marumo, *J. Antibiot.* **1980**, *34*, 701-707.
- <sup>162</sup> S. Rakhit, C. Eng, H. Baker, S. Singh, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1490-1494.
- <sup>163</sup> A. Matsumoto, Y. Fujiwara, R. K. Elespuru, P. C. Hanawalt, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 225-230.
- <sup>164</sup> R. K. Elespuru, S. K. Gonda, *Science* **1984**, *223*, 69-71.
- <sup>165</sup> A. Matsumoto, P. C. Hanawalt, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3921-3926.
- <sup>166</sup> R. Oyola, R. Arce, A. E. Alegria, C. Garcia, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 802-810.
- <sup>167</sup> L. R. McGee, R. Misra, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2386-2389.
- <sup>168</sup> A. Lorico, B. H. Long, *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A*, 1985-1991.
- <sup>169</sup> K. Suzuki, in: *Classics in Total Synthesis, Targets, Strategies, Methods* (Eds.: K. C. Nicolaou et. al), VCH, Weinheim **1996**, 509-521.
- <sup>170</sup> D. H. Hua, S. Saha, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1995**, *114*, 341-355.
- <sup>171</sup> K. Takahashi, F. Tomita, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1531-1535.
- <sup>172</sup> K. Beninga, *Dissertation*, Universität Göttingen **1998**.
- <sup>173</sup> C. Fischer, C. Oelkers, J. Rohr, *Abstr. Pap. - Am. Chem. Soc.* **2001**.
- <sup>174</sup> N. Hirayama, K. Takahashi, K. Shirahata, Y. Ohashi, Y. Sasada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1338-1342.
- <sup>175</sup> T. Matsumoto, T. Hosoya, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3568-3570.
- <sup>176</sup> M. Spiteller, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* **1979**, *164*, 253-317.
- <sup>177</sup> E. Filip de Silva, S. Miao, R. J. Andersen, L. W. Schultz, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2917-2920.

- <sup>178</sup> H. Agui, T. Mitami, A. Izawa, T. Komatsu, T. Nakagome, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 791-796.
- <sup>179</sup> K. J. Shah, E. A. Coats, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1001-1006.
- <sup>180</sup> D. L. Boger, J.-H. Chen, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7369-7371.
- <sup>181</sup> Autorenkollektiv *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products*, CD-ROM Version 9:1, Chapman & Hall, CRC, London **2000**.
- <sup>182</sup> D. Wunderlich, *Dissertation*, Universität Göttingen **1997**.
- <sup>183</sup> G. Winkelmann, H. Drechsel, in: *Biotechnology*, Vol. 7, (Eds.: H.-J. Rehm et. al), VCH, Weinheim **1997**, 199-246.
- <sup>184</sup> H. Bickel, R. Bosshardt, E. Gäumann, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *260*, 2118-2128.
- <sup>185</sup> E. Fiedler, H.-P. Fiedler (Eds.), *Secondary Metabolites Isolated by Hans Zähler and his Group*, 1954-1994, Zeeb-Druck, Tübingen **1994**.
- <sup>186</sup> K. Groß, J. Aumiller, R. Gelzer (Hrsg.), *Desferrioxamin*, Symposium anlässlich der Preisverleihung in der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, MMV Medizin Verlag, München **1992**.
- <sup>187</sup> S. Dobreff, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **1986**.
- <sup>188</sup> F. Strelitz, H. Flon, I. N. Asheshov, *J. Bacteriol.* **1955**, *69*, 280-283.
- <sup>189</sup> U. Weiss, K. Joshihira, R. J. Highet, R. J. White, T. T. Wei, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1194-1201.
- <sup>190</sup> T. Yoshimura, N. Hong, K. I. Sato, *Chem. Lett.* **1980**, 1131-1132.
- <sup>191</sup> J. A. Matson, W. C. Rose, J. A. Bush, R. Myllymaki, W. T. Bradner, T. W. Doyle, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1446-1448.
- <sup>192</sup> H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*, Chemical Concepts, Weinheim **2002**.
- <sup>193</sup> P. Alvermann, *Dissertation* (3-89873-214-2), Cuvillier Verlag Göttingen **2001**.
- <sup>194</sup> I. Papastavrou, *Dissertation* (3-89873-036-0), Cuvillier Verlag Göttingen **2000**.
- <sup>195</sup> persönliche Mitteilung von Philipp Krastel.
- <sup>196</sup> Autorenkollektiv, *Römpp Lexikon Chemie*, Bd. 3, 10. Auflage (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), Georg-Thieme Verlag, New York, Stuttgart **1997**.
- <sup>197</sup> B. Bethe, *Dissertation*, Universität Göttingen **1994**.
- <sup>198</sup> K. U. Bindseil, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **1990**.
- <sup>199</sup> M. Müller, S. Strand, H. Hug, E.-M. Heinemann, H. Walczak, W. J. Hofmann, W. Stremmel, P. H. Krammer, P. R. Galle, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 403-413.

- <sup>200</sup> S. N. Sligal, H. Czerkawski, A. Kudels, K. Pandev, R. Saucier, C. Vezina, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 355-361.
- <sup>201</sup> J. A. Findlay, J.-S. Liu, L. Radics, S. Rakhit, *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 3018-3020.
- <sup>202</sup> U. Hacksell, G. D. Daver Jr., *Prog. Med. Chem.* **1985**, *22*, 1-65.
- <sup>203</sup> M. Arai, H. Tomodo, N. Tabata, N. Ishguro, S. Kobayashi, S. Omura, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 554-561 sowie 566-566.
- <sup>204</sup> T. Narita, M. Matsumoto, K. Mogi, K. Kukita, R. Kawahara, T. Nakashima, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 347-356.
- <sup>205</sup> N. Yamashita, K. Shin-Ya, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1105-1108.
- <sup>206</sup> K. Kojiri, H. Arakawa, F. Satoh, K. Kawamura, A. Okura, H. Suda, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1054-1060.
- <sup>207</sup> M. Matsumoto, M. Narita, K. Kuhita, K. Mogi, T. Nakajima, *Patent: Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP* **1987**.
- <sup>208</sup> Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie, Merck, Darmstadt **1980**.
- <sup>209</sup> W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1974**, *43*, 2923.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Jutta Gerber-Nolte für die exzellente experimentelle Mitarbeit, die sorgfältige Messung physikalischer Daten und für die Bereitstellung der Teststämme danken. Ohne sie hätten viele Teile dieser Arbeit nicht in der jetzigen Form entstehen können.

Den analytischen Abteilungen des Instituts, die oft Licht ins Dunkel gebracht und einen unschätzbaren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, danke ich herzlich: Allen voran dem Leiter der Massenspektrometrie-Abteilung, Herrn Dr. Holm Frauendorf und dessen Mitarbeiterin Györgyi Udvarnoki, die für meine massenspektrometrischen Wünsche immer ein offenes Ohr hatten.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Carola Zolke, Christiane Siebert und Martin Weitemeyer sowie den Abteilungsoperator(inn)en Dr. Isabelle Bergère, Jens Bitzer, Dr. Philipp Krastel, Sven Meyer, Dr. Ina Papastavrou, Oliver Schlörke, Martin Streibel und Diana Wolff. Bei Angelika Wraage und Susanne Petrich aus dem Analytischen Labor des Anorganischen Instituts sowie bei Wolfgang Zolke von der anorganischen NMR-Abteilung möchte ich mich bedanken für die Unterstützung bei der Phosphatanalytik. Dr. Jens Fuchser und Dr. Bernhard Schmidt gilt mein Dank für die Messung der Massen-Hochauflösungen von Viscotoxinen.

Danke auch an Hans-Peter Kroll und Karsten Ströch für die Einführung in die HPLC-Analytik. Für ihre Hilfe bei mikrobiologischen Arbeiten danke ich sehr Hans-Jörg Langer und Michaela Klingebiel.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Armin Scheffler und Sebastian Jäger vom Carl Gustav Carus-Institut sowie bei Judit Debreczeni aus der Abteilung von Prof. Sheldrick für die gute Zusammenarbeit im Rahmen unseres Viscotoxin-Projektes.

Was wären Daten wert, an die man nicht herankommt? Jens Bitzer, Dr. Meike Holzenkämpfer und Dr. Philipp Krastel haben es geschafft, daß unsere Computer und das Netzwerk praktisch störungsfrei laufen. Für diese schweißtreibende Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Für das kollegiale Arbeitsklima danke ich meinen Mitstreitern im Labor 11 Dr. Isabelle Bergère, Nicole Pöhlmann und Karsten Ströch. Den Teilnehmern der nach-dem-Essen-Kaffeerunde danke ich für die vielen und lustigen geistigen Verdauungsspaziergänge. Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung sei gedankt für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Atmosphäre und die vielen netten Stunden bei Kuchen, Feierabendbierchen oder anderen Anlässen.

Dr. Gabriela Bach, Dr. Klaus Kahle, Oliver Schlörke, Karsten Ströch sowie besonders Jens Bitzer danke ich sehr für das sorgfältige und engagierte Korrekturlesen dieses Manuskriptes.

An dieser Stelle geht ein herzliches Danke an meine Freunde — wo auch immer auf diesem Erdball ihr gerade seid — für ihre Unterstützung, Freundschaft und so manches „Carepaket“.

Nicht zuletzt ein besonderes Danke an meine Familie, die mir in allem beigestanden hat und durch deren Unterstützung mein Studium und damit diese Arbeit ermöglicht wurde.

Um Klaus meinen Dank auszusprechen, reichen Worte nicht.



## Lebenslauf

Ich wurde am 30. August 1971 als Tochter von Hildegard Girmann, geb. Kluge, und Eberhardt Girmann in Dernbach (Westerwald) geboren.

Von August 1978 bis Juni 1982 besuchte ich die Rohrerhof-Grundschule in Koblenz. Ab August 1982 war ich Schülerin am Staatl. Eichendorff-Gymnasium in Koblenz, das ich im Juni 1991 mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Zum Wintersemester 1991/1992 begann ich das Studium der Chemie an der Philipps-Universität in Marburg, wo ich im August 1994 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung bestand.

Zum Sommersemester 1995 wechselte ich an die Georg-August-Universität in Göttingen und immatrikulierte mich für die Studiengänge Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien/Sekundärstufe II. Im April 1996 legte ich meine Zwischenprüfung in Biologie ab.

In der Zeit von Juli 1998 bis Dezember 1998 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Erste Staatsexamensarbeit mit dem Titel „Fachwissenschaftliche und didaktische Ausarbeitung des Kapitels Nukleinsäuren und genetische Information innerhalb eines neu konzipierten Biochemie-Praktikums für Chemiker“ an und bestand im Juni 1999 das Erste Staatsexamen.

Seit August 1999 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.







