

**Fermentation, Isolierung und Strukturaufklärung der ribosomal  
synthetisierten Thiazol/Oxazol-Peptide Plantazolicin A und B  
aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42  
und  
Strukturaufklärung der Langkocycline aus *Streptomyces* sp.  
Acta 3034**

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

Bahar Kalyon

Berlin

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Peter Hildebrandt

Erster Bericht: Prof. Dr. rer. nat. Roderich D. Süßmuth

Zweiter Bericht: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Fiedler

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03. Juni 2013

Berlin 2013

D 83



## Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit befasste sich mit zwei verschiedenen Aufgabenstellungen.

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Fermentation, Isolierung und Strukturaufklärung des ribosomal synthetisierten Peptids Plantazolicin aus *Bacillus amyloliquifaciens* FZB42. Plantazolicin besitzt ein Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin (TOMM)-Biosynthesecluster. Dementsprechend durchläuft das Vorläuferpeptid eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen, bevor das aktive Biosyntheseprodukt Plantazolicin entsteht. Plantazolicin wurde isoliert und aufgereinigt. Die Strukturaufklärung des Peptids wurde durch die hohe Anzahl an quartären Kohlenstoffatomen erschwert, so dass neben der Tandem-Massenspektrometrie und 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -korrelierten NMR-Spektroskopie auch  $^{15}\text{N}$ -Fütterungsexperimente durchgeführt werden mussten. Anhand des so gewonnenen  $^{15}\text{N}$ -markierten Plantazolicins konnte mit Hilfe der Aufnahme von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektren die Struktur erfolgreich aufgeklärt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Strukturaufklärung der Langkocycline A1, A2, A3, B1 und B2, einer neuen Naturstofffamilie aus dem *Streptomyces*-Stamm Acta 3034 beschrieben. Die Strukturaufklärung der im Zuge eines chemischen Screening-Programms isolierten Sekundärmetabolite erfolgte mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie und der Kernresonanzspektroskopie. Es wurde herausgefunden, dass die Langkocycline zu der Gruppe der Angucyclin-Antibiotika, der größten Gruppe polyzyklischer aromatischer Polyketide, gehören und eine strukturelle Verwandtschaft zu Urdamycin A und Urdamycin D besitzen. Da die Vertreter der Angucycline über diverse biologische Aktivitäten verfügen, überwiegend zytotoxische und antibakterielle Wirkung, wurden Bioaktivitätsassays mit den Langkocyclinen durchgeführt. Getestet wurden die Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* und humane Krebszelllinien. Es wurde eine bakterizide Aktivität gegen den grampositiven Stamm *Bacillus subtilis* und zytotoxische Aktivität gegen das menschliche hepatozelluläre Leberkarzinom HepG2 und gegen die Krebszelllinie NIH 3T3 beobachtet.





Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kalyon, B., Helaly, S. E., Scholz, R., Nachtigall, J., Vater, J., Borriss, R., Süssmuth, R. D. „*Plantazolicin A and B: Structure Elucidation of Ribosomally Synthesized Thiazole/Oxazole Peptides from Bacillus amyloliquefaciens FZB42*“ *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2996-2999.



für meine Familie

## Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth für die hilfreiche Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit, die Vergabe der sehr interessanten Themen und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler möchte ich mich recht herzlich für die gute und geduldvolle Zusammenarbeit und die Übernahme der zweiten Berichterstattung bedanken.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Peter Hildebrandt für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Großen Dank bin ich Eva Mösker und Herrn Dr. Soleiman Helaly schuldig für die zahlreichen Gespräche, Ideen und Anregungen, die zur Bereicherung meiner Forschungsprojekte führten.

Dr. Jutta Wiese aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff vom Kieler Wirkstoff-Zentrum am GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung möchte ich für die Durchführung der Bioaktivitätsassays danken.

Herrn Dr. Peter Schmieder danke ich für die Durchführung der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Experimente.

Herrn Dr. Sebastian Kemper bin ich sehr dankbar für die Hilfeleistung bei allen Problemen und Fragen bezüglich der NMR-Spektroskopie.

Bei Herrn Todor Baramov bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft bei der CD-Spektroskopie.

Meinen Kollegen möchte ich herzlich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken.

Ich danke Eva Mösker, Sevilay Cosgun und Meltem Yanova ganz herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Unendlich dankbar bin ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die grenzenlose Unterstützung, Geduld und das in mich gesetzte Vertrauen. Ohne sie könnte ich nicht in der Position sein, in der ich jetzt glücklicherweise bin.

Zu guter Letzt danke ich meinem Ehemann Mustafa vom ganzen Herzen dafür, dass er bei allem, was ich tue, hinter mir steht, mir stets Vertrauen schenkt, mich motiviert, mir Kraft gibt und für all das, was man nicht mit Worten ausdrücken kann.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Naturstoffe - die Quelle für neue biologisch aktive Moleküle.....	1
1.2 Die Bedeutung der Naturstoffe in der pharmazeutischen Forschung.....	2
1.3 Peptide.....	4
1.3.1 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPP) .....	5
1.4 Polyketide .....	7
1.4.1 Aromatische Polyketide (Typ II PKS).....	9
1.4.2 Desoxyzucker.....	13
<b>2 Grundlagen</b> .....	<b>15</b>
2.1 Chromatographie .....	15
2.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	16
2.1.2 Normal- und Umkehrphasenchromatographie .....	17
2.2 Massenspektrometrie .....	18
2.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers .....	18
2.2.2 Ionenquelle .....	19
2.2.3 Massenanalysator .....	22
2.2.4 Detektion.....	27
2.3 Kernresonanzspektroskopie .....	27
2.3.1 Eindimensionale Kernresonanzspektroskopie .....	28
2.3.2 Zweidimensionale Kernresonanzspektroskopie.....	30
<b>3 Zielsetzung</b> .....	<b>33</b>
<b>4 Plantazolicin</b> .....	<b>34</b>
4.1 Sekundärmetabolit-Produktion in <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42.....	34
4.2 Fermentation und Isolierung.....	38
4.3 Strukturaufklärung.....	39
4.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen.....	39
4.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen .....	42
4.3.3 Tandem-Massenspektrometrie.....	63
4.4 Zusammenfassung und Diskussion.....	68
<b>5 Langkocycline</b> .....	<b>72</b>
5.1 Screening.....	72
5.2 Fermentation und Isolierung.....	73

---

5.3	Strukturaufklärung .....	74
5.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	74
5.3.2	NMR-spektroskopische Untersuchungen .....	78
5.3.3	Strukturen der Langkocycline .....	98
5.3.4	Konfigurationsbestimmung der Zucker .....	100
5.3.5	CD-spektroskopische Untersuchungen .....	103
5.4	Biologische Aktivität .....	105
5.5	Zusammenfassung und Diskussion .....	106
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>114</b>
6.1	Chemisches Screening mittels HPLC-DAD .....	114
6.2	HPLC-DAD-ESI-Massenspektroskopie.....	114
6.3	HPLC-ESI-FT-Orbitrap-Massenspektrometrie .....	115
6.4	NMR-Spektroskopie .....	116
6.5	CD-Spektroskopie .....	117
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>133</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
APT	Attached Proton Test
CI	chemische Ionisation
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CRM	<i>charge-residue model</i>
Da	Dalton
DAD	Dioden Array Detektor
DBE	Doppelbindungsäquivalente
dd	Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FT-ICR	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Analysator
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
GC	Gaschromatographie
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>

---

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IEM	<i>ion evaporation model</i> (Ionenevaporationsmodell)
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kb	Kilobasen
KS	Ketosynthase
LAP	<i>linear azol(in)e-containing peptide</i>
LC	Flüssigchromatographie
<i>m</i>	Masse
<i>m/z</i>	<i>Masse-zu-Ladungs-Verhältnis</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
mAU	<i>milliabsorbance units</i>
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
n.d.	nicht detektierbar
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)

---

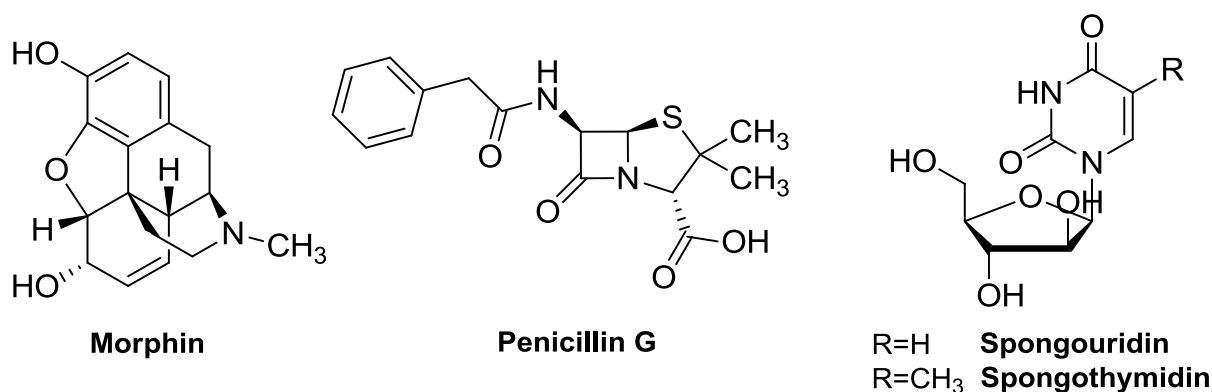
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement (effect) spectroscopy</i> (Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie)
NP	Normalphase
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>parts per million</i>
pt	Pseudotriplett
PZN	Plantazolicin
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SI	Sekundärionen-Ionisation
SIDT	<i>single ion in droplet theory</i>
TIC	Totalionenchromatogramm
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TOMM	Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
UV	ultraviolettes Licht
Vis	sichtbares Licht
λ	Wellenlänge



# 1 Einleitung

## 1.1 Naturstoffe - die Quelle für neue biologisch aktive Moleküle

Die Nutzung von Naturstoffen als Quelle für neue biologisch aktive Moleküle basiert auf einer Jahrhunderte alten Tradition. Im Jahr 1805 gelang dem Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner die Isolierung des ersten Alkaloids Morphin (Abbildung 1-1) aus dem Mohngewächs *Papaver somniferum*, welches heute noch als Analgetikum eingesetzt wird.<sup>[1],[2]</sup> Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen wurden im 19. Jahrhundert daher die Blicke auf die Sekundärmetabolite von Samenpflanzen gerichtet. Mit der Entdeckung der antibiotischen Wirkung von Penicillin (Abbildung 1-1) aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* durch Alexander Fleming im Jahr 1928 gewannen dann die Mikroorganismen als Quelle neuer Antibiotika zunehmend an Bedeutung.<sup>[1]</sup> Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden im Zuge der Wirkstoffsuche nahezu alle Sekundärmetabolit-produzierenden Organismen in die Untersuchungen mit eingebunden.<sup>[2]</sup> So gelang es Bergmann und Feeney im Jahr 1951 die beiden Nucleosid-Antibiotika Spongouridin und Spongothymidin (Abbildung 1-1) aus dem karibischen Meeresschwamm *Cryptotethya crypta* zu isolieren.<sup>[3]</sup> Durch diese Entdeckung trat Ende des 20. Jahrhunderts die Analyse der Sekundärmetabolite von marinen Organismen, wie beispielsweise Schwämmen, Nesseltieren, Weichtieren und Stachelhäutern, in den Vordergrund.<sup>[1],[4]</sup> Trotz intensivster Forschungsarbeiten ist zum heutigen Zeitpunkt nur ein Bruchteil der globalen Artenvielfalt in Hinblick auf biologisch aktive Naturstoffe untersucht.<sup>[2]</sup>

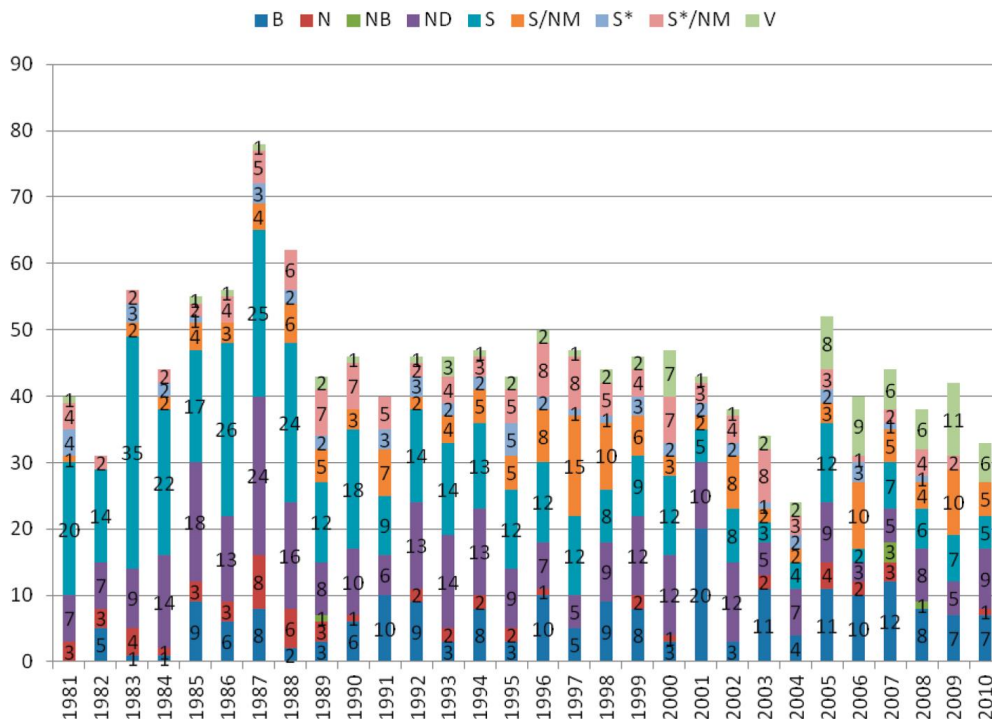


**Abbildung 1-1:** Strukturen von Morphin, Penicillin G, Spongouridin und Spongothymidin.

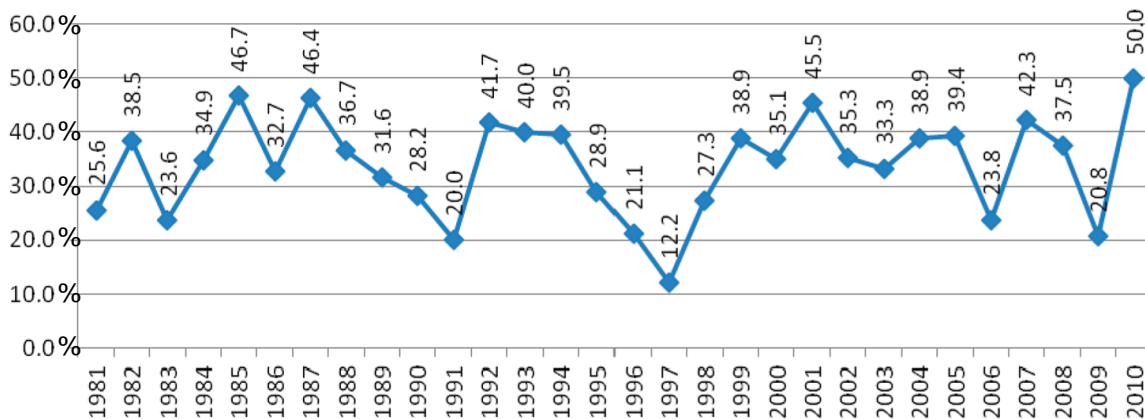
## 1.2 Die Bedeutung der Naturstoffe in der pharmazeutischen Forschung

Aufgrund der durch Bakterien, Viren, Parasiten und Krebszellen hervorgerufenen zahlreichen, nicht behandelbaren menschlichen Erkrankungen ist es von hohem Interesse, neue biologisch aktive Verbindungen zu finden bzw. zu entwickeln.<sup>[5]</sup> Da viele Naturstoffe über verschiedene Wirkprofile verfügen, haben sie das Potential als Antibiotika, Zytostatika, Immunsuppressiva oder aber auch Hemmstoffe der Cholesterinbiosynthese Einsatz zu finden.<sup>[6]</sup> Auch die Resistenzentwicklung der Krankheitserreger gegenüber bereits wirksamen Antibiotika, größtenteils hervorgerufen durch unsachgemäßen Einsatz, ist einer der Gründe für die intensive Suche nach neuen Wirkstoffen.<sup>[6]</sup> Um neuen aussichtsreichen und vielversprechenden Therapeutika auf die Spur zu kommen, können verschiedenste Methoden angewendet werden. Hierzu gehören beispielsweise das biologische und chemische Screening. Beim biologischen Screening wird anhand von Plattendiffusionstests nach biologisch aktiven Substanzen in Kulturfiltratextrakten gesucht. Die chemische Variante beruht auf der Suche nach strukturell neuen Verbindungen, die nach der Isolierung auf biologische Aktivität getestet werden. Auch ist es möglich mittels Genomsequenzierungen neue Biosynthesegencluster in Organismen zu finden, die für die Produktion von bisher unbekanntem Naturstoffen verantwortlich sind.<sup>[7]</sup> Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung neuer klinisch einsetzbarer Substanzen ist die kombinatorische Biosynthese, bei der Gene, Genclusterabschnitte oder sogar ganze Gencluster aus einem Organismus isoliert und in einem anderen Organismus heterolog exprimiert werden.<sup>[8]</sup> Ebenso können Naturstoffe mittels chemischer Synthese modifiziert werden. Man spricht dann von semisynthetisch modifizierten Naturstoffen.<sup>[9]</sup>

Die in Abbildung 1-2 dargestellte Grafik, zeigt die in dem Zeitraum von 1981 bis 2010 neu zugelassenen Arzneimittel eingeteilt nach Quelle und Jahr,<sup>[10]</sup> wobei in Abbildung 1-3 der prozentuale Anteil von Naturstoffen (N/NB/ND) gezeigt ist. Bildet man den Mittelwert des prozentualen Naturstoffanteils des analysierten Zeitraums (1981-2010), so stellt man fest, dass durchschnittlich 34 % der neu zugelassenen Therapeutika von Naturstoffen abstammen. Bemerkenswert hoch ist der Naturstoffanteil von 50 % im Jahr 2010. Nicht außer Acht zu lassen sind die in Abbildung 1-3 nicht mit eingebundenen, aber den Naturprodukten nachempfundenen und synthetisch hergestellten Wirkstoffe. All diese Fakten spiegeln die unverzichtbare Rolle der Naturstoffe in der pharmazeutischen Forschung wider.



**Abbildung 1-2:** Alle neu zugelassenen Medikamente eingeteilt nach Quelle und Jahr;<sup>[10]</sup> B: Biopharmazeutika (große Peptide bzw. Proteine, *Biologics*), N: Naturstoffe, NB: botanische Naturstoffe, ND: Naturstoffderivate (semisynthetisch), S: synthetisch, S\*: synthetisch, wobei das Pharmakophor von einem Naturstoff stammt, V: Impfstoffe (*Vaccines*), Untergruppe „NM“:<sup>[9]</sup> *Natural product mimic*.



**Abbildung 1-3:** Prozentualer Anteil von Naturstoffen (N: Naturstoffe, NB: botanische Naturstoffe, ND: Naturstoffderivate) in neu zugelassenen Medikamenten eingeteilt nach Jahr für den Zeitraum 1981-2010.<sup>[10]</sup>

Ob eine Wirksubstanz tatsächlich eine medizinische Anwendung findet, wird anhand von mehreren aufeinanderfolgenden Testreihen entschieden. Bevor der Wirkstoff in die klinische Studie zur Erprobung am Menschen gelangt, muss er mehrere präklini-

sche Testreihen durchlaufen. Erst wenn er die in ihn gesetzten Erwartungen erfüllt und keine gefährlichen Nebenwirkungen beobachtbar sind, kommt ein medizinischer Einsatz in Frage.<sup>[11]</sup>

Nur 38 % der neu entdeckten bzw. entwickelten Wirkstoffe gelangen in die Phase I der klinischen Studien.<sup>[12]</sup> Die restlichen Substanzen scheiden aufgrund ihrer Toxizität aus. 63 % der Wirkstoffe, die die erste Phase durchlaufen, schaffen es wegen mangelnder Wirksamkeit und schlechter Bioverfügbarkeit nicht in die Phase II. Hiernach ist es nur für etwa die Hälfte der Substanzen aus der zweiten Phase möglich die klinische Phase III zu erreichen. Hiervon werden in den USA allein 23 % von der Arzneimittelzulassungsbehörde ausgeschlossen.<sup>[12]</sup> Somit kommt nur ein kleiner prozentualer Anteil von weniger als 10 % der untersuchten Entwicklungskandidaten für den Einsatz als Medikament in Frage.<sup>[12]</sup>

Die Forschung des 20. Jahrhunderts ermöglichte die Einteilung der Naturstoffe in die vier Hauptgruppen der Terpene, Alkaloide, Polyketide und nichtribosomalen Peptide.<sup>[13]</sup> Eine fünfte Gruppe sind die ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptide (RiPP, engl. ribosomally-synthesized and post-translationally-modified peptides).<sup>[14]</sup> Durch die Molekülmassengrenze von 10 kDa wurden posttranslational modifizierte Proteine aus dieser Gruppe ausgeschlossen.<sup>[13]</sup> In den nächsten Abschnitten wird aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit näher auf die ribosomal synthetisierten Peptide und die Polyketide eingegangen.

### 1.3 Peptide

Bis vor kurzer Zeit wurden biologisch aktive Peptide als ungeeignete Arzneimittelkandidaten angesehen. Hierbei spielen mehrere Faktoren eine große Rolle. Beispielsweise verfügen Peptide über eine schlechte orale Bioverfügbarkeit verbunden mit einer geringen proteolytischen Stabilität, so dass der Großteil von therapeutisch eingesetzten Peptiden intravenös verabreicht werden muss.<sup>[12]</sup> Außerdem sind Peptide sehr hydrophil, was eine schlechte Membranpermeation zur Folge hat.<sup>[12]</sup> Des Weiteren zeichnen sich Peptide durch eine hohe konformative Flexibilität aus, was einen Selektivitätsverlust gegenüber Targets mit sich bringt.<sup>[12]</sup> Auch sind die Produktionskosten von einem Peptid mit einer Molekülmasse von 5000 Da mehr als zehnmal so hoch wie die eines Kleinmolekül-Therapeutikums mit einer Molekül-



masse von etwa 500 Da.<sup>[12]</sup> Da die Resistenzen vieler Mikroorganismen gegenüber klinisch eingesetzten Antibiotika immer weiter steigen, ist es dringend notwendig neue Substanzen zu finden, die in Zukunft als Antibiotika Einsatz finden können. In Anlehnung an die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antibiotika wurden synthetische Strategien entwickelt, um die oben aufgeführten Defizite der Peptide zu verbessern. Die Optimierung der strukturellen Stabilität der Wirksubstanz kann zum Beispiel durch den Einbau von D-Aminosäuren und die metabolische Stabilität durch das Einführen von nichtproteinogenen Aminosäuren erfolgen.<sup>[15]</sup>

Die natürlich vorkommenden Peptide lassen sich in die zwei Gruppen der ribosomal synthetisierten Oligopeptide bzw. Proteine und der nichtribosomal synthetisierten Peptidantibiotika einteilen.<sup>[16]</sup> Während ribosomale Peptide von jeder Art von Organismus produziert werden, beschränkt sich die Herkunft der nichtribosomalen Peptide auf Bakterien und Pilze.<sup>[16]</sup> Die ribosomal synthetisierten Peptide werden im nächsten Abschnitt näher erläutert, da sie die für diese Arbeit relevante Peptidart darstellen.

### **1.3.1 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPP)**

Im Gegensatz zu nichtribosomal synthetisierten Peptiden (NRP), die neben den proteinogenen auch aus nicht-proteinogenen Aminosäuren bestehen, ist bei der ribosomalen Synthese nur die Verwendung der 20 natürlichen Aminosäuren als Baustein möglich.<sup>[17]</sup> Erst durch die posttranslationale Modifikation dieser ribosomal synthetisierten Peptide wird die zunächst limitierte strukturelle Vielfalt erhöht. Die erzeugten Peptide besitzen dabei ähnliche Eigenschaften wie die nichtribosomal synthetisierten Peptide. Der Vorteil von ribosomal synthetisierten Peptiden besteht allerdings darin, dass die Manipulation des Genclusters, d. h. insbesondere der Aminosäuresequenz, zur Erzeugung von alternativen Produkten einfacher durchzuführen ist.<sup>[18]</sup>

Die ribosomal synthetisierten Peptide können in eine Vielzahl von unterschiedlichen Klassen mit verschiedensten biologischen Aktivitäten eingeteilt werden. Zu den wichtigen Untergruppen gehören unter anderem die Lantibiotika. Diese Art von Peptid ist dafür bekannt, dass sie die Aminosäuren Lanthionin und Methyllanthionin in ihrer Struktur beinhaltet. Nisin, eines der am längsten bekannten Lantibiotika, besitzt antibiotische Wirkung gegen grampositive Bakterien.<sup>[19],[20]</sup> Die Eigenschaften,

dass das Nisin ungiftig ist, schnell abgebaut wird und nicht therapeutisch verwendet wird, ermöglichen den Einsatz als Konservierungsstoff in der Lebensmittelindustrie.<sup>[21]</sup> Ein weiteres Beispiel für die Lantibiotika stellt die Familie der Labyrinthopeptide aus dem Stamm *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 dar,<sup>[22]</sup> die interessanterweise eine hohe Wirksamkeit gegen neuropathischen Schmerz besitzen.<sup>[22]</sup>

Eine weitere nennenswerte Untergruppe der ribosomal synthetisierten Peptide repräsentieren die Lasso peptide. Sie werden hauptsächlich von Streptomyceten und Rhodokokken produziert und bestehen aus 16-21 Aminosäuren deren N-terminale Aminofunktion ein Makrolaktam mit der Carboxygruppe von Glutamat oder Aspartat an Position 8 oder 9 bildet.<sup>[13]</sup> Ein Beispiel hierfür ist das RP 71955, welches die HIV-1 Aspartatprotease und die Produktion der Reversen Transkriptase des Humanen Immundefizienz-Virus hemmt.<sup>[23]</sup>

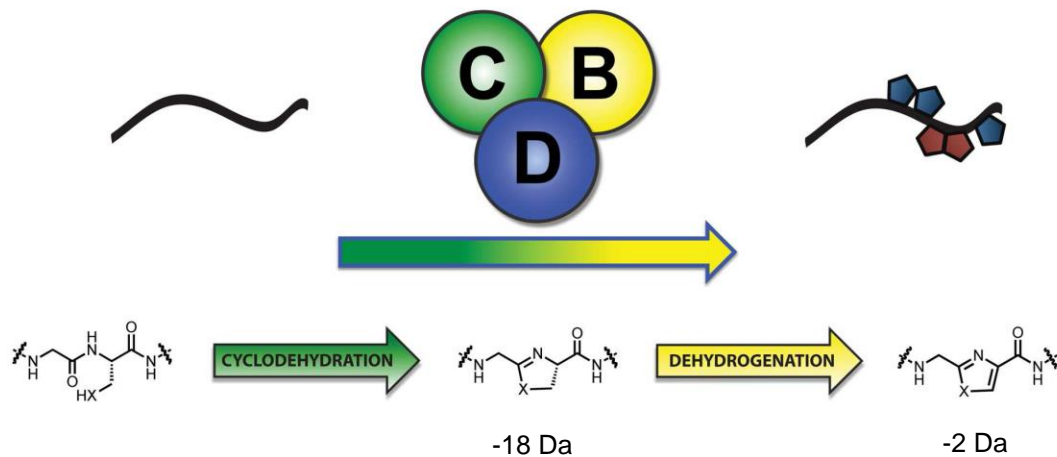
In dieser Arbeit sind die *linear azol(in)e-containing peptides* (LAP)<sup>[13]</sup> von großer Bedeutung und werden deshalb im nächsten Abschnitt näher erläutert.

### 1.3.1.1 LAP's- *linear azol(in)e-containing peptides*

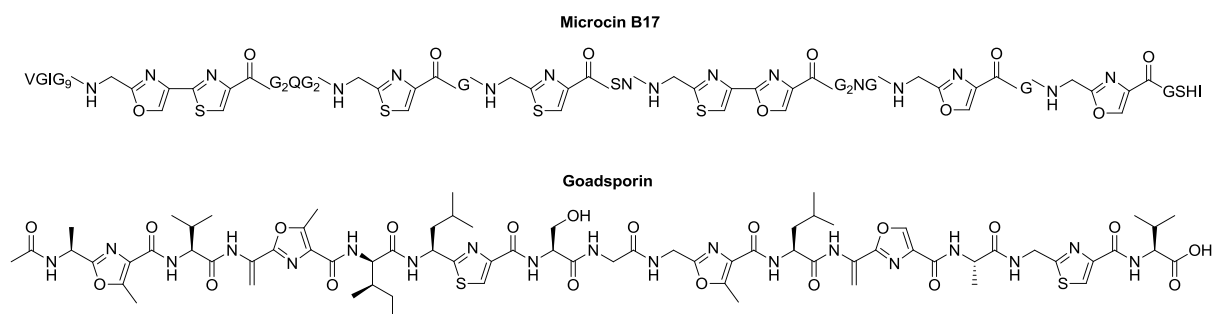
LAP's (*linear azol(in)e-containing peptides*)<sup>[13]</sup> werden auch als lineare Thiazol/Oxazol-modifizierte Peptide (TOMMs) bezeichnet. Ihre Biosynthese erfolgt anhand von TOMM-Biosyntheseclustern, die aus einem trimeren „BCD“-Synthetase-Komplex bestehen, zusammengesetzt aus einer Dehydrogenase (B), einer Cyclodehydratase (C) und einem „docking“-Protein (D) (Abbildung 1-4).<sup>[24]</sup> Das Vorläuferpeptid wird zunächst über Erkennungssequenzen am N-terminalen Ende an den „BCD“-Synthetase-Komplex gebunden.<sup>[25]</sup> Die Aufgabe des „docking“-Proteins (D) ist es dabei, die Bindung zu vermitteln. Hiernach findet die Cyclodehydratisierung von Threonin und Serin zu (Methyl-)Oxazolin und von Cystein zu Thiazolin statt, katalysiert durch die Cyclodehydratase (C) und verbunden mit einem Massenverlust von -18 Da pro Ringbildung. Durch die Dehydrogenase (B) erfolgt anschließend die Oxidation zu (Methyl-)Oxazolen und Thiazolen mit einem zusätzlichen Massenverlust von -2 Da pro Ring.

Wichtige Vertreter der LAP's sind das Microcin B17 und das Goadsporin, deren Strukturen in Abbildung 1-5 dargestellt sind. Das von Enterobakterien produzierte Microcin B17<sup>[26]</sup> besitzt vier Oxazole und vier Thiazole und wirkt als Gyrasehemmer.<sup>[27]</sup> Goadsporin wird von *Streptomyces* sp. TP-A0584 produziert und bein-

hält zwei Thiazole, vier (Methyl-)Oxazole, zwei Dehydroalanine und einen acetylierten *N*-Terminus.<sup>[13]</sup> Das genaue Target von Goadsporin konnte noch nicht identifiziert werden, jedoch ist bekannt, dass es eine antibiotische Wirkung gegen *Streptomyces*-Spezies besitzt.<sup>[13]</sup>



**Abbildung 1-4:** Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcin (TOMM)-Biosynthese. Der trimere „BCD“-Synthetase-Komplex, bestehend aus einer Cyclodehydratase (C, grün), Dehydrogenase (B, gelb) und einem „docking“-Protein (D, blau), katalysiert die Thiazol- und (Methyl-) Oxazolbildung am Peptidgerüst (schwarz). Die Heterozyklen entstehen aus den Aminosäuren Serin/Threonin ( $X = O$ ;  $R = H/CH_3$ ) und Cystein ( $X = S$ ;  $R = H$ ) des inaktiven Präkursors. Auch gezeigt sind die chemische Umsetzung und der Massenverlust in Dalton pro modifizierter Aminosäure ausgehend vom Präkursor. Modifiziert nach Scholz et al. 2011.<sup>[24]</sup>



**Abbildung 1-5:** Strukturen von Microcin B17 und Goadsporin.

## 1.4 Polyketide

Die Polyketide stellen eine der größten und wichtigsten Gruppen der Naturstoffe dar.<sup>[28]</sup> Sie sind von großer Bedeutung, da sie einen hohen Anteil an biologisch

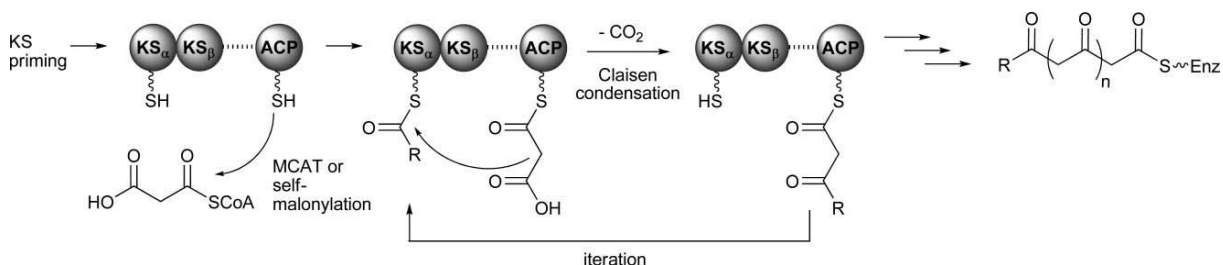
aktiven Substanzen beherbergen, die zum Teil zu klinisch einsetzbaren Medikamenten entwickelt wurden. Zu den biologischen Aktivitäten gehören die Wirkungen als Antibiotika, Antimykotika, Zytostatika, Immunsuppressiva, cholesterinsenkende Mittel, Schmerzmittel, Antiparasitika und Neurotoxine.<sup>[29]</sup> Die breite Wirkungsvielfalt ist auf die hohe strukturelle Diversität der Polyketide zurückzuführen, die sich von Polyethern, Polyenen, Polyphenolen, Makroliden bis hin zu Endiinen erstreckt.<sup>[28]</sup> Erstaunlicherweise erfolgt die Herstellung dieser unterschiedlichen Substanzklassen hauptsächlich aus dem einfachen Baustein Essigsäure. Die hohe strukturelle Diversität haben die Polyketide den post-PKS-Modifikationen zu verdanken, wie beispielsweise Glykosylierungen, Hydroxylierungen und Halogenierungen mittels spezifischer Enzyme.<sup>[30]</sup> Je nach strukturellem Aufbau und Wirkmechanismus lassen sich die Polyketide in die in Tabelle 1-1 aufgeführten fünf Untergruppen einteilen. Die für diese Arbeit relevante Gruppe stellen die Typ II Polyketide dar. Auf die Typ II Polyketide, auch aromatische Polyketide genannt, wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

**Tabelle 1-1:** Überblick über die verschiedenen PKS-Typen, ihre Bausteine und ihr Vorkommen.<sup>[28]</sup>

<b>PKS-Typen</b>	<b>Bausteine</b>	<b>Vorkommen</b>
Modulare Typ I PKS	ACP, verschiedene Verlängerungseinheiten möglich	Bakterien
Iterative Typ I PKS	ACP, nur Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit	hauptsächlich Pilze, einige Bakterien
Iterative Typ II PKS	ACP, nur Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit	Bakterien
Iterative Typ III PKS	Acyl-CoA, nur Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit	hauptsächlich Pflanzen, einige Bakterien und Pilze
PKS/NRPS-Hybride	ACP, Malonyl-CoA und Aminosäuren als Verlängerungseinheit	Bakterien (modular), Pilze (iterativ)

### 1.4.1 Aromatische Polyketide (Typ II PKS)

Aromatische Polyketide, die zum größten Teil bakterieller Herkunft sind, werden anhand von Typ II Polyketidsynthasen hergestellt, die aus mehreren distinkten Enzymen bestehen. Drei dieser Enzyme, die beiden Ketosynthasen  $KS_\alpha$  und  $KS_\beta$  und ein Acyl-Carrier-Protein (ACP), bilden die „minimale PKS“, einen Multienzymkomplex, der iterativ arbeitet und für die Synthese der Polyketidkette verantwortlich ist.<sup>[31]</sup> Die schematische Darstellung der Biosynthese ist in Abbildung 1-6 dargestellt. Den ersten Schritt stellt das sogenannte „PKS priming“ dar, bei dem die Starterereinheit an die „minimale PKS“ gebunden wird. In den meisten Fällen dient Acetat als Starterereinheit.<sup>[31]</sup> Hierfür wird der Malonylrest von Malonyl-CoA an das ACP gebunden und anschließend unter Decarboxylierung an die Ketosynthase  $KS_\alpha$  übertragen.<sup>[32]</sup> Alternativ können auch Propionate, Butyrate und Benzoate als Starterereinheit fungieren.<sup>[33]</sup> Nach dem „PKS priming“ folgt die Kettenverlängerung. Bei aromatischen Polyketiden kommt nur Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit in Frage. Dazu wird zunächst erneut ein Malonylrest von Malonyl-CoA an das ACP gebunden. Das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der ACP-Thioestergruppe greift dann das partiell positiv geladene Carbonylkohlenstoffatom der Acetyl-Startereinheit an der Ketosynthase  $KS_\alpha$  an. Somit erfolgt über eine Claisen-Kondensation unter  $CO_2$ -Verlust der Transfer der Acetylgruppe der Starterereinheit zum Acetylrest, der am ACP hängt. Bevor ein weiterer Verlängerungsschritt vonstattengeht, wird die Polyketidkette auf  $KS_\alpha$  zurück übertragen.<sup>[31]</sup> Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis die für die Entstehung des Polyketids erforderliche Kettenlänge zustande kommt.

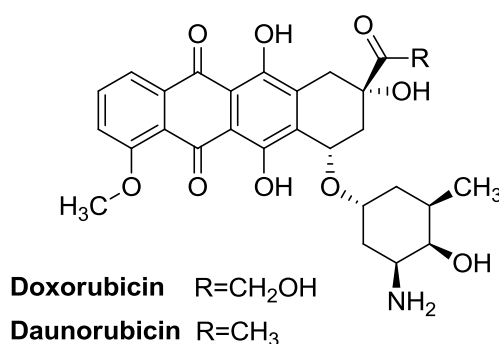


**Abbildung 1-6:** Schematische Darstellung der Biosynthese der Polyketidkette.<sup>[31]</sup>

Die anschließende Zyklisierung der Polyketidkette wird von Ketoreduktasen, Zykласen und Aromatasen katalysiert. Bei der Synthese aromatischer Polyketide gibt es wenige Cyclisierungsmuster. Bis auf einige wenige Ausnahmen können die Poly-

ketide des Typs II in zwei Gruppen eingeteilt werden. Entweder sind sie wie die Anthracycline, Aureolsäuren, Tetracenomycine und Tetracycline linear aufgebaut oder angular, wie es bei den Angucyclinen und den Pradimicin-Typ-Polyketiden der Fall ist.<sup>[31]</sup> Die biologischen Aktivitäten haben die Polyketide vielfach den post PKS-Modifikationen mittels beispielsweise Oxygenasen bzw. Glycosyl- und Methyltransferasen zu verdanken.<sup>[29]</sup>

Zu den wichtigsten Vertretern der aromatischen Polyketide gehören die hoch zytotoxisch wirksamen Anthracycline. Beispiele hierfür sind die in den 60er Jahren isolierten Polyketide Doxorubicin<sup>[34]</sup> und Daunorubicin<sup>[35]</sup> (Abbildung 1-7). Sie zählen zu den effektivsten Zytostatika, die bis zur heutigen Zeit entwickelt wurden und werden zur Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt.<sup>[36]</sup> Die zytostatische Aktivität dieser Substanzen beruht auf verschiedenen Wirkmechanismen. Neben der Fähigkeit die Topoisomerase II zu hemmen, die eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation spielt,<sup>[37]</sup> können sie in die DNA interkalieren<sup>[36]</sup> oder aber auch reaktive Sauerstoffradikale produzieren.<sup>[38]</sup> Diese freien Radikale scheinen auch der Grund für die schweren Nebenwirkungen der Chemotherapie wie zum Beispiel die Doxorubicin-induzierte Herzmuskelschädigung zu sein.<sup>[39]</sup>



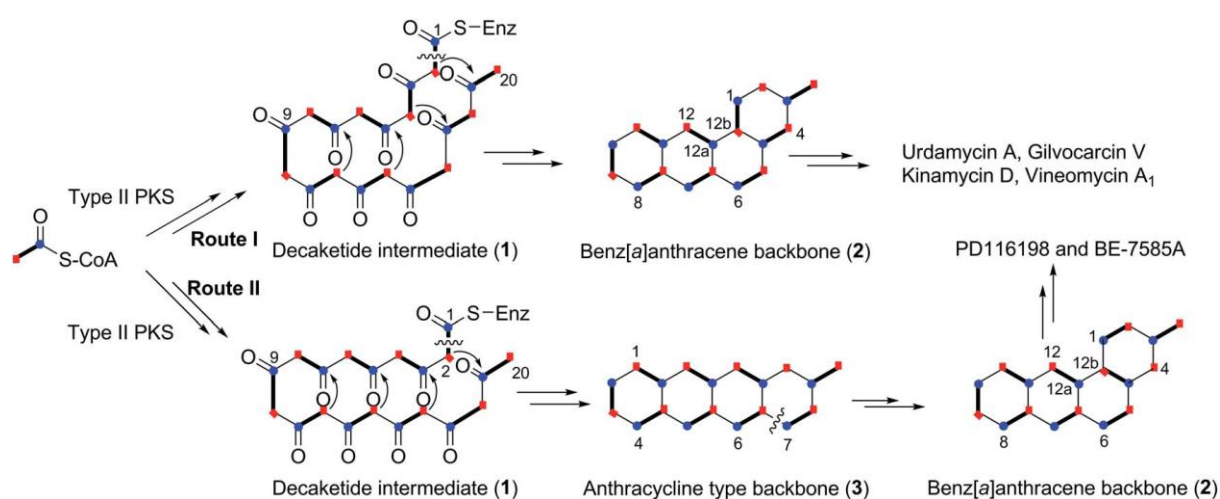
**Abbildung 1-7:** Strukturen von Doxorubicin und Daunorubicin.

Die für diese Arbeit relevanten aromatischen Polyketide stellen die Angucycline dar. Auf diese wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

#### 1.4.1.1 Angucycline

Angucycline gelten als die größte Gruppe der polyzyklischen aromatischen Polyketide.<sup>[40]</sup> Der Begriff Angucyclin- bzw. Angucyclinon-Antibiotika, der im Jahr 1986

von Drautz *et al.* eingeführt wurde,<sup>[41]</sup> stammt aus dem lateinischen „angus“ (engl. *angle*) und ist auf die winkelige, tetrazyklische Benz[*a*]anthracen-Struktur des Aglycons zurückzuführen. Besitzt das Polyketid hydrolysierbare Saccharidreste spricht man von Angucyclinen und bei Substanzen ohne Zuckerreste von Angucyclinonen.<sup>[42]</sup> Die erste in der Literatur beschriebene Struktur dieser Substanzklasse stellt das Angucyclinon Tetrangomycin dar.<sup>[43]</sup> Die Biosynthese des Polyketidrückgrats der Angucycline erfolgt aus einer Decaketid-Kette, bestehend aus einer Startereinheit, meist Acetyl-CoA, und neun Malonyl-CoA-Verlängerungseinheiten. Anhand von Fütterungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Benz[*a*]anthracen-Rückgrats auf zwei verschiedene Weisen vonstattengeht (Abbildung 1-8). Bei den meisten Verbindungen, wie beispielsweise Urdamycin A,<sup>[44]</sup> Vineomycin A1,<sup>[45]</sup> Gilvocarcin V,<sup>[46]</sup> Ravidomycin V,<sup>[47]</sup> Chrysomycin A,<sup>[48]</sup> Landomycin A,<sup>[49]</sup> und Kinamycin D<sup>[50]</sup> kommt es zu einer enzymkatalysierten Ringschlussreaktion der Decaketid-Kette, was direkt zum Benz[*a*]anthracen-Rückgrat führt (erste Route des Biosyntheseschemas, Abbildung 1-8). In einigen wenigen Fällen jedoch, wie zum Beispiel bei PD116198<sup>[51]</sup> und BE7585A,<sup>[52]</sup> wird aus der Decaketid-Kette zunächst eine Anthracyclinon-Zwischenstufe gebildet. Erst nach anschließendem Bindungsbruch zwischen den Kohlenstoffatomen C10a und C11 und erneuter Verknüpfung zwischen C3 und C11 entsteht das Benz[*a*]anthracen-Rückgrat.<sup>[40]</sup> (zweite Route des Biosyntheseschemas, Abbildung 1-8).

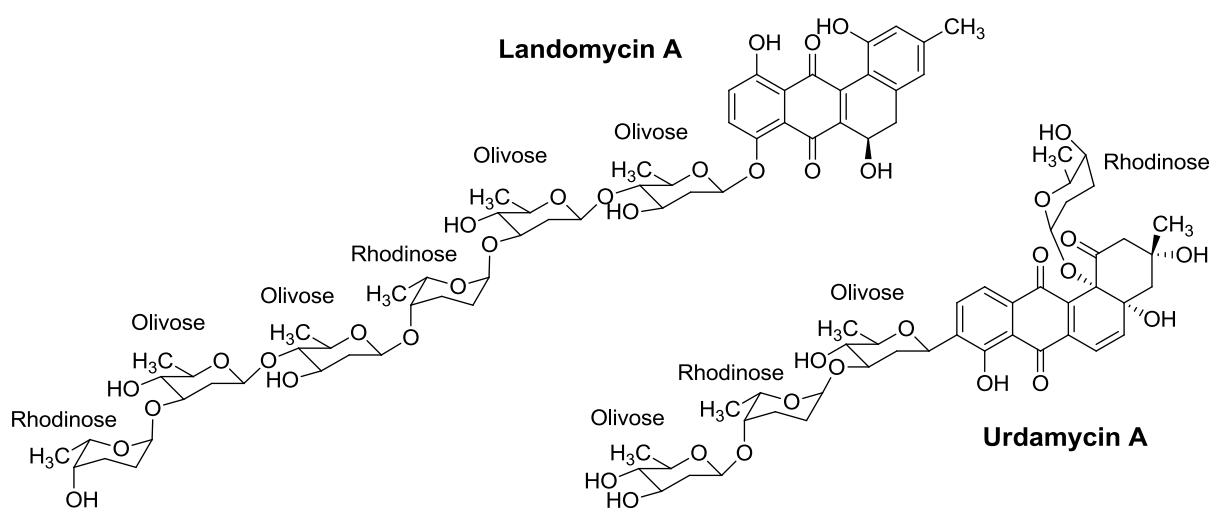


**Abbildung 1-8:** Zwei verschiedene Biosynthesewege zur Herstellung des Polyketidrückgrats der Angucycline.<sup>[40]</sup>

Damit aus dem biologisch inaktiven Benz[a]anthracen-Rückgrat ein biologisch aktives Sekundärmetabolit entsteht, müssen post-PKS-Modifikationen stattfinden. Hierbei kommen Oxidoreduktasen, wie Oxygenasen und Kettoreduktasen, Transferasen wie Glykosyl- und Alkyltransferasen, Halogenasen und Zyklasen zum Einsatz.<sup>[29]</sup> Diese verschiedenen Modifikationsarten bieten eine hohe strukturelle Vielfalt der entstehenden Produkte und eine breite Spanne an biologischen Aktivitäten. Als biologische Aktivitäten der Angucycline werden die antibakterielle, antivirale und zytotoxische Wirkung sowie die Wirkung als Enzyminhibitor und Thrombozytenaggregationshemmer beschrieben.<sup>[42]</sup>

Die Urdamycine und die Landomycine stellen die bekanntesten und größten Subfamilien der Angucyclin-Antibiotika dar (Abbildung 1-9). Dabei gehören die Landomycine zu den aktivsten und vielversprechendsten Angucyclin-Antitumormitteln.<sup>[40]</sup> Das in Abbildung 1-9 gezeigte Landomycin A besitzt eine hohe antitumorale Aktivität gegen Prostatakrebs-Zelllinien,<sup>[31]</sup> was auf den O-glykosidisch verknüpften Hexasaccharidrest (D-Olivose-D-Olivose-L-Rhodinose-D-Olivose-D-Olivose-L-Rhodinose) zurückzuführen ist. Das Landomycin E mit nur einem Trisaccharidrest besitzt eine schwächere Antitumoraktivität.<sup>[31]</sup>

Obwohl die Angucycline für ihre antibakterielle und zytotoxische Wirkung bekannt sind,<sup>[42]</sup> hat es keines dieser Substanzen aufgrund ihrer Toxizität bzw. aus Löslichkeitsproblemen geschafft, ein klinisch anwendbares Arzneimittel zu werden.<sup>[40]</sup>



**Abbildung 1-9:** Strukturen von Landomycin A und Urdamycin A.



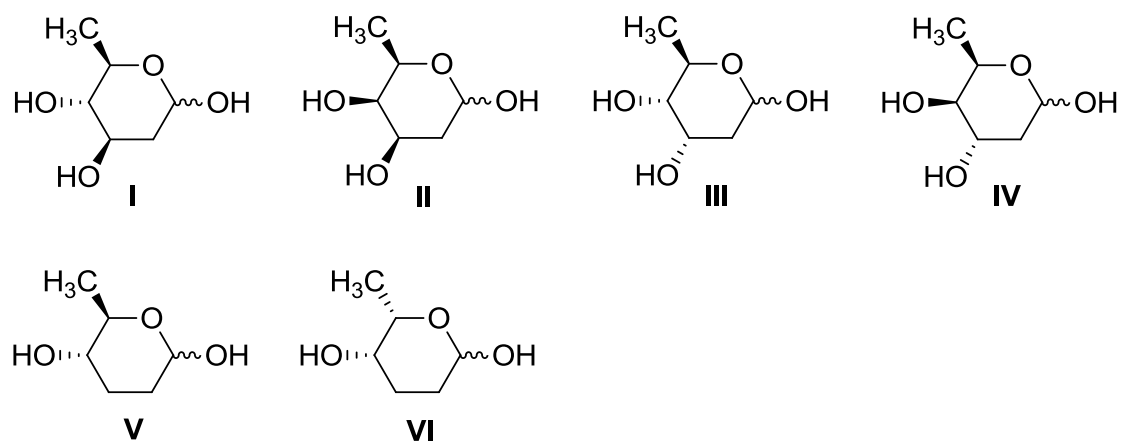
### 1.4.2 Desoxyzucker

Desoxyzucker stellen eine wichtige Untergruppe der Kohlenhydrate dar. Sie treten in Bakterien, Pilzen und Pflanzen auf und entstehen dadurch, dass eine oder mehrere Hydroxygruppen eines Monosaccharids durch Wasserstoff substituiert sind.<sup>[53]</sup> Desoxyzucker besitzen die Fähigkeiten als Epitop an Bakterienoberflächen oder als Liganden bei Zell-Zell-Interaktionen zu fungieren.<sup>[54]</sup> Des Weiteren sind sie in der Lage als Target für Toxine und Antikörper zu dienen sowie die Serumhalbwertszeit von Proteinen zu kontrollieren.<sup>[54]</sup> Bei vielen Sekundärmetaboliten ist die biologische Aktivität auf die Existenz von Desoxyzuckern zurückzuführen. Daher erhoffen sich viele Forscher anhand von kombinatorischer Biosynthese neue Naturstoffe mit ungewöhnlichen Desoxyzuckern zu produzieren, die möglicherweise eine hohe biologische Aktivität aufweisen.<sup>[54]</sup>

Die für diese Arbeit relevanten Desoxyzucker sind die 2,6-Didesoxyhexosen und die 2,3,6-Tridesoxyhexosen. Einige Beispiele hierfür sind in Tabelle 1-2 aufgeführt. Abbildung 1-10 zeigt die zugehörigen Strukturformeln.

**Tabelle 1-2:** Liste einiger 2,6-Di- und 2,3,6-Tridesoxyhexosen.<sup>[53]</sup>

Desoxyzucker	Name	Nummerierung
2,6-Didesoxy-D- <i>arabino</i> -hexose	D-Canarose, D-Chromose C, D-Olivose	<b>I</b>
2,6-Didesoxy-D- <i>lyxo</i> -hexose	D-Oliose	<b>II</b>
2,6-Didesoxy-D- <i>ribo</i> -hexose	D-Digitoxose	<b>III</b>
2,6-Didesoxy-D- <i>xylo</i> -hexose	D-Boivinose	<b>IV</b>
2,3,6-Tridesoxy-D- <i>erythro</i> -hexose	D-Amicetose	<b>V</b>
2,3,6-Tridesoxy-D- <i>threo</i> -hexose	L-Rhodinose	<b>VI</b>

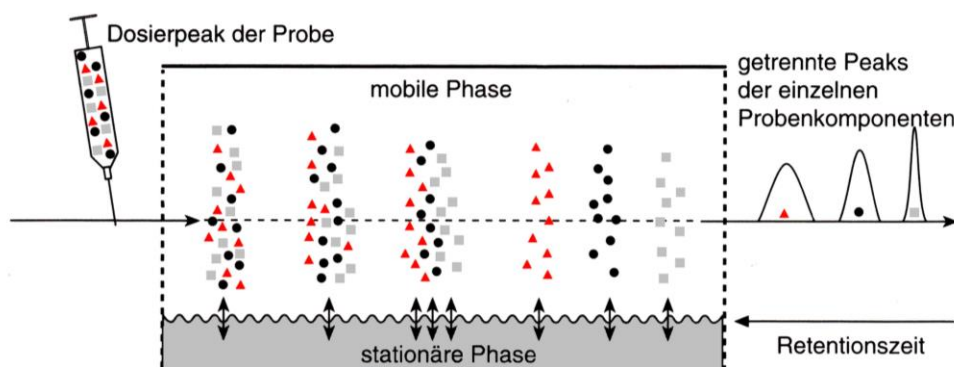


**Abbildung 1-10:** Strukturen der 2,6-Dideoxyhexosen und der 2,3,6-Trideoxyhexosen I-VI.<sup>[53]</sup>

## 2 Grundlagen

### 2.1 Chromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich um eine physikalisch-chemische Trennmethode,<sup>[55]</sup> die es ermöglicht, aus komplexen Substanzgemischen, wie zum Beispiel Rohextrakten aus Bakterienkulturen, Reinsubstanzen zu erhalten.<sup>[56]</sup> Die Trennung beruht auf der Verteilung des Analyten zwischen einer stationären (feststehenden) und einer mobilen (beweglichen) Phase.<sup>[55]</sup> Hierzu wird die Probe in der mobilen Phase gelöst und über die stationäre Phase transportiert. Aufgrund von unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen den gelösten Komponenten der zu trennenden Probe und der stationären Phase kommt es zu unterschiedlichen Retentionen der einzelnen Analyten und somit zur Trennung des Substanzgemisches (Abbildung 2-1).<sup>[56]</sup>



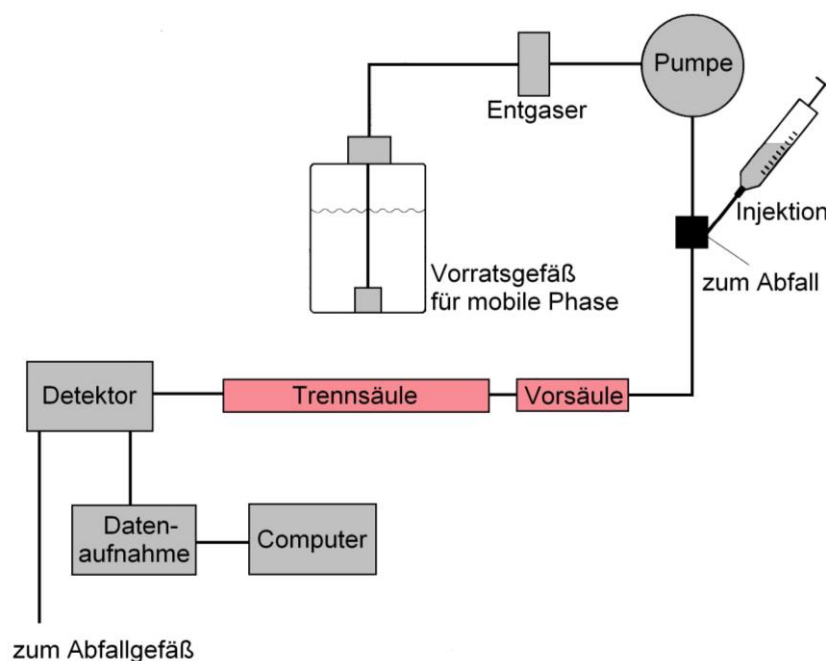
**Abbildung 2-1:** Chromatographische Trennung eines Substanzgemisches.<sup>[56]</sup>

Abhängig vom Aggregatzustand der Phasen kann die Einteilung in verschiedene Chromatographiearten erfolgen.<sup>[55]</sup> Somit spricht man bei einer gasförmigen mobilen Phase von Gaschromatographie (GC) und bei einer flüssigen mobilen Phase von Flüssigchromatographie (LC, engl. *liquid chromatography*).<sup>[55]</sup> Stationäre Phasen hingegen können in fester und in flüssiger Form vorliegen.<sup>[55]</sup> Eine Kombination der möglichen mobilen und stationären Phasen führt zu unterschiedlichen Trennmechanismen.<sup>[56]</sup> Die für diese Arbeit wichtigste Kombination besteht aus einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase, worauf in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

### 2.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um eine gute chromatographische Trennung zu erzielen, müssen die Einzelkomponenten des Extraktes so oft wie möglich zwischen der mobilen und der stationären Phase austauschen können.<sup>[57]</sup> Daher muss der Stoffaustausch zwischen beiden Phasen sehr schnell vonstattengehen.<sup>[57]</sup> Auch der Weg, den die Moleküle zwischen beiden Phasen zurücklegen, muss möglichst kurz sein, was durch kleine Korngrößen des Säulenfüllmaterials erzielt werden kann.<sup>[57]</sup> Damit das Laufmittel die stationäre Phase gut durchströmen konnte, war früher ein hoher Druck erforderlich, worauf die erste Bezeichnung *high pressure liquid chromatography* zurückzuführen ist.<sup>[55],[56]</sup> Mit der Zeit kam es zur Verbesserung der Säulenmaterialien und Geräte, so dass sich die Bezeichnung *high performance liquid chromatography* durchsetzte.<sup>[56]</sup>

Abbildung 2-2 zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC-Anlage.<sup>[56]</sup> Das sich in einem Vorratsgefäß befindende Lösungsmittel durchfließt zunächst einen Entgaser, bevor es durch die Pumpe befördert wird. In den meisten Fällen hat man zwei Lösungsmittel vorliegen, die durch zwei Pumpen befördert und anschließend in einer Mischkammer zu einem Lösungsmittelgemisch umgewandelt werden.<sup>[56]</sup> Der Einsatz von mehreren Vorratsbehältern hat den Vorteil, dass man das Mischverhältnis der beiden Lösungsmittel und somit die Zusammensetzung des Fließmittels während des Experimentes gradientenförmig variieren kann.<sup>[55]</sup> Hiernach erfolgt die Injektion der Probenlösung über ein Sechswegeventil.<sup>[56]</sup> Die zu analysierende Probe wird vorher in einem, sich mit der mobilen Phase mischenden, Lösungsmittel gelöst. Die Probe wird dann entweder manuell über eine Injektionsnadel in die Probenschleife gegeben oder automatisch mit Hilfe eines Autosamplers in die Schleife injiziert.<sup>[56]</sup> Bevor die Trennung in der chromatographischen Säule stattfindet, durchströmt die Probe im Idealfall eine Vorsäule, die zum Schutz der Trennsäule vor Verunreinigungen dient. Die Vorsäule besteht hierbei aus dem gleichen Säulenmaterial wie die Hauptsäule.<sup>[56]</sup> Die Reinsubstanzen, die aus dem Substanzgemisch isoliert werden, können dann mit Hilfe eines Detektors nachgewiesen werden. Man erhält ein Chromatogramm, bei dem die Anzahl der in dem Substanzgemisch vorliegenden Komponenten, unter der Voraussetzung, dass alle Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten besitzen, der Anzahl der im Chromatogramm vorhandenen Peaks gleicht. Die Peakfläche ist dabei proportional zur Substanzmenge.<sup>[56]</sup> Auf die verschiedenen Säulenmaterialien und Detektoren wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.



**Abbildung 2-2:** Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.<sup>[56]</sup>

Dank der vielen Vorteile wie Schnelligkeit, hohe Auflösung, Automatisierbarkeit, hervorragende Reproduzierbarkeit der Analysen in Hinblick auf die Retentionszeit und die Entwicklung von immer besseren Trennsäulen und Detektoren ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie die heutzutage am häufigsten eingesetzte chromatographische Trennmethode in der Bioanalytik.<sup>[56],[58]</sup>

### 2.1.2 Normal- und Umkehrphasenchromatographie

Die in der Flüssigchromatographie verwendeten stationären Phasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Normalphasen (NP, engl. *normal phase*) und die Umkehrphasen (RP, engl. *reversed phase*).<sup>[56]</sup> Bei der Normalphasenchromatographie werden Kieselgel ( $\text{SiO}_2$ ) oder Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) als Säulenmaterial eingesetzt, wobei ersteres aufgrund höherer Beladbarkeit und niedrigeren Preisen bevorzugt wird.<sup>[56]</sup> Beide Materialien besitzen polare Hydroxygruppen an ihrer Oberfläche.<sup>[56]</sup> Als Laufmittel werden unpolare Lösungsmittel, wie Pentan, Hexan, Heptan und Octan eingesetzt.<sup>[56]</sup> Werden nun polare Substanzen, die sich in einem unpolaren Laufmittel befinden über eine polare stationäre Phase geleitet, so kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Analyt und zur Bildung von

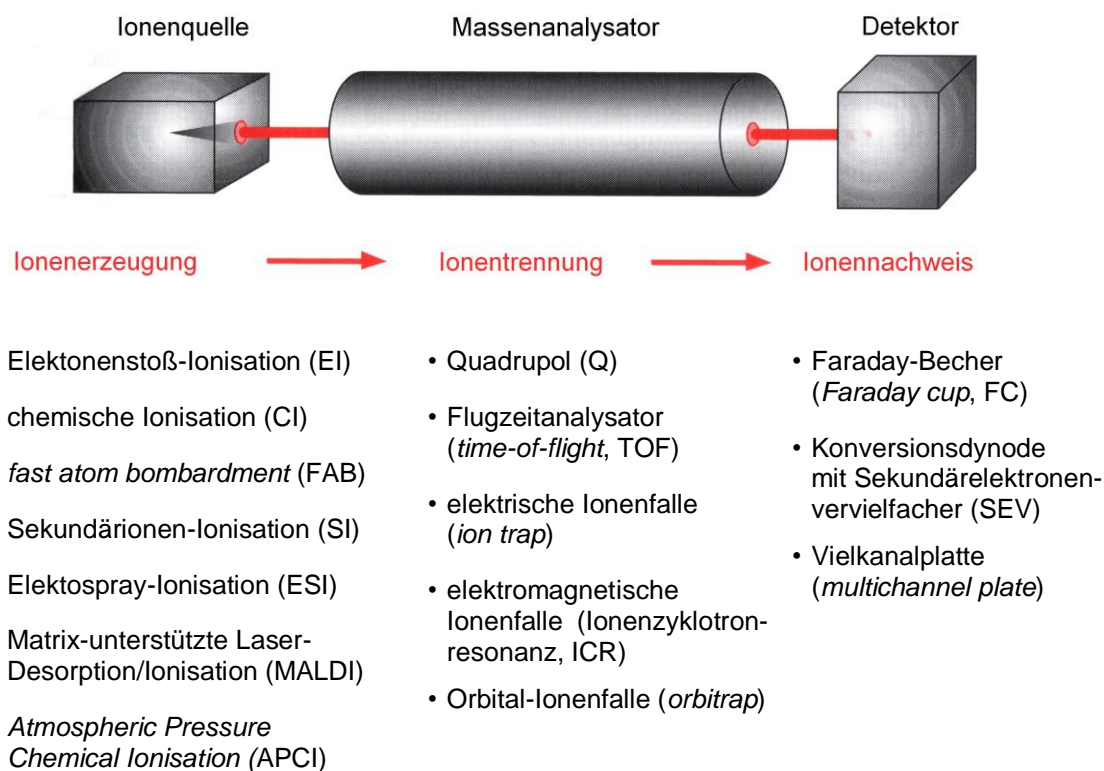
Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[55]</sup> Die polaren Substanzen werden zurückgehalten, so dass sich deren Retentionszeit verlängert.<sup>[55]</sup> Die Retentionszeit verhält sich dabei proportional zur Polarität der Substanz. Durch die Wahl einer polareren mobilen Phase kann die Retentionszeit allerdings verkürzt werden.<sup>[55]</sup> Somit besitzt das gleiche Molekül in Hexan eine höhere Retentionszeit als beispielsweise in Dichlormethan. Die Normalphasenchromatographie wird bevorzugt für die Aufreinigung von Substanzen eingesetzt, die sich gut in unpolaren Lösungsmitteln lösen.<sup>[56]</sup> Hierzu gehören organische Moleküle, wie zum Beispiel Kohlenwasserstoffe jeglicher Art.<sup>[56]</sup> Zur Trennung von kleinen Peptiden und Aminosäuren oder allgemein von mittelpolaren und polaren Komponenten kommt die Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz.<sup>[57]</sup> Es werden unpolare stationäre Phasen verwendet, die in den meisten Fällen auf Kieselgelbasis aufgebaut sind.<sup>[56]</sup> Um den unpolaren Charakter zu erhalten, werden chemische Modifikationen auf der Phasenoberfläche durchgeführt.<sup>[56]</sup> Hierzu werden lange Alkylketten kovalent an die Hydroxygruppen der Siliziumoxidoberfläche gebunden.<sup>[56]</sup> Die Länge und Art der Alkylkette kann dabei beliebig variiert werden, so dass die Zahl der Umkehrphasen, die neu entwickelt werden, immer weiter steigt.<sup>[56]</sup> Aufgrund der großen Vielfalt ist es möglich, für jedes Trennproblem eine geeignete stationäre Phase zu finden.<sup>[56]</sup> Als Laufmittel werden polare Lösungsmittel wie Wasser, Acetonitril, Methanol oder Gemische aus diesen eingesetzt.<sup>[56]</sup> Dies hat zur Folge, dass unpolare Substanzen stärkere Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen und somit eine höhere Retentionszeit im Vergleich zu polaren Stoffen besitzen.<sup>[55]</sup>

## 2.2 Massenspektrometrie

### 2.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers

Mit Hilfe eines Massenspektrometers kann das *Masse-zu-Ladungs-Verhältnis* ( $m/z$ ) von Ionen im Hochvakuum bestimmt werden.<sup>[58]</sup> Wenn die Ladung  $z$  bekannt ist, kann aus dem Verhältnis die Masse  $m$  des Molekülions berechnet werden. Der Aufbau eines Massenspektrometers ist in Abbildung 2-3 gezeigt. Es besteht im einfachsten Fall aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor.<sup>[58]</sup> Die Ionenquelle hat die Aufgabe aus einer Substanz oder einem Substanzgemisch

Ionen zu erzeugen, die dann im Massenanalysator im Hinblick auf ihr *Masse-zu-Ladungs-Verhältnis* aufgetrennt werden.<sup>[58]</sup> Im Detektor erfolgt dann die Messung des Ionenstroms.<sup>[58]</sup> Durch das Auftragen der relativen Häufigkeiten der Ionen gegen  $m/z$  wird ein Massenspektrum erhalten.<sup>[58]</sup> In den folgenden Kapiteln wird näher auf die in Abbildung 2-3 aufgelisteten Arten von Ionenquellen, Massenanalysatoren und Detektoren eingegangen.



**Abbildung 2-3:** Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers und Auflistung der Arten von Ionenquellen, Massenanalysatoren und Detektoren, modifiziert nach Lottspeich, 2012.<sup>[58]</sup>

## 2.2.2 Ionenquelle

Die Ionisationsmethoden, die in der Massenspektrometrie eingesetzt werden, können im Allgemeinen in die drei Kategorien Verdampfungs-, Desorptions- und Zerstäubungsmethoden eingeteilt werden (Tabelle 2-1).<sup>[59]</sup>

**Tabelle 2-1:** Einteilung der Ionisationsmethoden.

Verdampfungsmethoden	EI, CI
Desorptionsmethoden	MALDI, SI, FAB
Zerstäubungsmethoden	ESI, APCI

Zu den als erstes entwickelten Verdampfungsmethoden gehören die Elektronenstoß-Ionisation (EI) und die chemische Ionisation (CI).<sup>[59]</sup> Das Prinzip beruht darauf, dass die Probe im Vakuum über einen Temperaturgradienten verdampft und anschließend zur Ionenquelle überführt wird, wo die Ionisation stattfindet.<sup>[59]</sup> Da die Probe flüchtig und thermisch stabil sein muss, ist nur die Analytik von relativ kleinen organischen Molekülen möglich.<sup>[59]</sup> Substanzen mit großer Molmasse und hoher Polarität hingegen sind nicht geeignet.<sup>[59]</sup>

Um größere, höher substituierte und nicht flüchtige Naturstoffe zersetzungsfrei ionisieren zu können, wurden Ende der 70er Jahre zunächst Desorptionsmethoden entwickelt.<sup>[59]</sup> Die Probe wird hierbei in fester Form auf die Oberfläche eines Targets aufgebracht und durch Bestrahlung mit Licht oder Partikeln direkt, ohne vorherige Verflüchtigung, in die Gasphase überführt.<sup>[59]</sup> Wichtige Vertreter der Desorptionsmethoden sind die Sekundärionen-Ionisation (SI), die FAB-Ionisierungsmethode (*fast atom bombardment*) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI).<sup>[59]</sup>

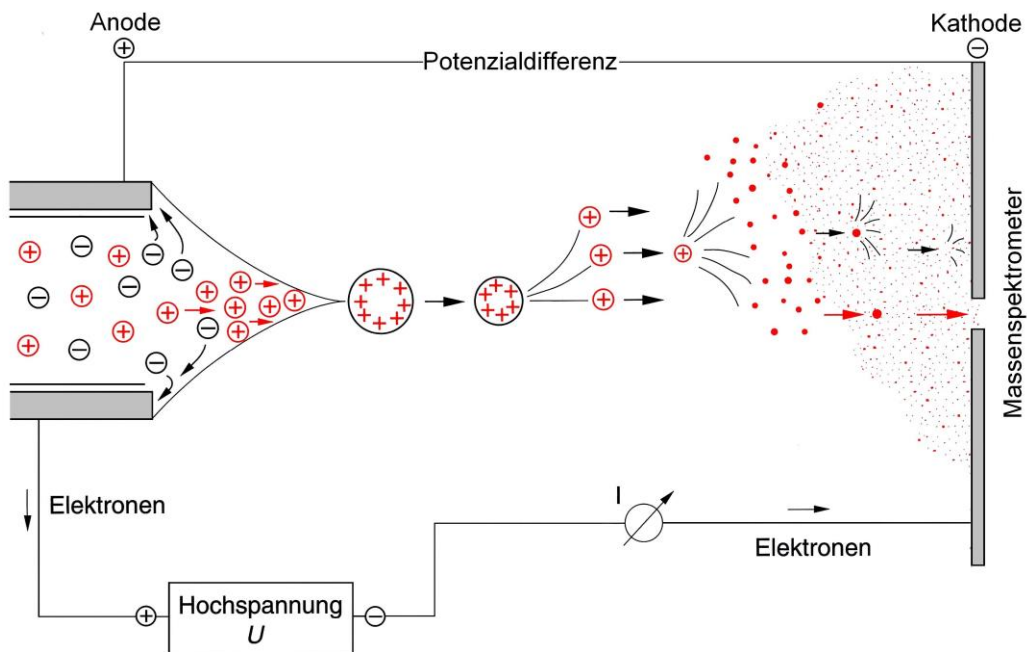
Es folgte die Entwicklung der Zerstäubungsmethoden, bei denen die Ionen direkt aus der Probelösung erzeugt werden.<sup>[59]</sup> Dabei wird die Analytlösung im temperierten Stickstoffstrom zerstäubt, ionisiert und anschließend das Lösungsmittel verdampft.<sup>[59]</sup> Um eine effiziente Ionenbildung zu gewährleisten, wird eine Kombination aus polaren Lösungsmitteln (wie z. B. Wasser, Methanol oder Acetonitril) mit flüchtigen Puffern (wie z. B. Ameisensäure oder Trifluoressigsäure) als mobile Phase eingesetzt.<sup>[59]</sup> Als Vertreter der Zerstäubungsmethoden sind die *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI) und die Elektrospray-Ionisation (ESI) zu nennen.<sup>[59]</sup> Letztere stellt die in dieser Arbeit überwiegend verwendete Ionisationsmethode dar und wird deshalb im Folgenden detailliert besprochen.



### 2.2.2.1 Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI, engl. *electrospray ionization*) wird die Probelösung durch eine dünne Kapillare in ein elektrisches Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze und dem Massenspektrometer angelegt ist (Abbildung 2-4).<sup>[58].</sup><sup>[59]</sup> Bedingt durch das elektrische Feld kommt es zu einer Ionentrennung in der Analytlösung, wobei im Positiv-Ionenmodus die Kationen an die Flüssigkeitsoberfläche wandern.<sup>[58]</sup> Die negativen Ionen dagegen wandern in die entgegengesetzte Richtung.<sup>[58]</sup> Dadurch, dass die positiven Ionen immer weiter in Richtung Kathode gezogen werden, kommt es zu einer Deformation der Flüssigkeitsoberfläche und es entsteht ein Taylor-Konus.<sup>[58]</sup> Wenn nun die elektrostatische Abstoßung der sich an der Flüssigkeitsoberfläche befindenden Kationen die Oberflächenspannung übersteigt, werden von der Konusspitze aus hochgeladene Tröpfchen emittiert.<sup>[59]</sup> Während die Tröpfchen zur Kathode wandern, verdampft das Lösungsmittel und die Ladungsdichte an den Tröpfchenoberflächen nimmt zu.<sup>[59]</sup> Damit erhöht sich die elektrostatische Abstoßung und die Tröpfchen zerfallen explosionsartig in kleinere Tröpfchen, die dann immer weiter zerfallen.<sup>[59]</sup> Man spricht von Coulomb-Explosion.<sup>[59]</sup> Die Entstehung der freien Gasphasenionen kann anhand von zwei Modellvorstellungen erklärt werden, das *charge-residue model* (CRM) und das *ion evaporation model* (IEM).<sup>[58]</sup> Ersteres stammt von Dole<sup>[60]</sup> und wurde dann von Friedrich Röllgen überarbeitet und zur *single ion in droplet theory* (SIDT)<sup>[61]</sup> umbenannt. Bei diesem Prinzip geht man davon aus, dass nach den Coulomb-Explosionen Tröpfchen mit einem Durchmesser von 2 nm entstehen, die nur ein Analytmolekül beinhalten.<sup>[58]</sup> An der Schnittstelle zum Massenspektrometer werden die einem Stickstoff-Gasstrom ausgesetzten Tröpfchen schließlich desolvatisiert.<sup>[58]</sup> Nach dem *ion evaporation model* (IEM), das von J. Iribane und B. Thomson entwickelt wurde,<sup>[62]</sup> erfolgt eine Ionenemission aus Tröpfchen, die einen Durchmesser von 16 nm besitzen und noch ca. 70 Analytmoleküle beinhalten.<sup>[58]</sup>

Die Elektrospray-Ionisation ist eine sehr schonende Methode, die es ermöglicht Moleküle mit mehreren zehntausend Da zu analysieren, ohne dass eine Quellenfragmentierung stattfindet.<sup>[55]</sup> Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass es sich um eine kontinuierliche Methode handelt, bei der der Ionenquelle ein konstanter Strom an gelösten Analyten zugeführt wird. Somit ist diese Ionisationsmethode gut zur Kopplung mit der Flüssigchromatographie (LC-MS) geeignet.<sup>[57]</sup>



**Abbildung 2-4:** Schematische Darstellung des ESI-Prozesses.<sup>[58]</sup>

### 2.2.3 Massenanalysator

Im Massenanalysator werden die in der Ionenquelle erzeugten Ionen nach ihren *Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen* aufgetrennt.<sup>[59]</sup> Es wurden verschiedene Analysetypen entwickelt, die sich in die drei Untergruppen der Ionenstrahl-Analysatoren, Ionenfallen-Analysatoren und Flugzeitanalysatoren einteilen lassen (Tabelle 2-2).<sup>[59]</sup> Bei einer Kombination von Analysetypen innerhalb eines Gerätes spricht man von Hybridinstrumenten.<sup>[59]</sup>

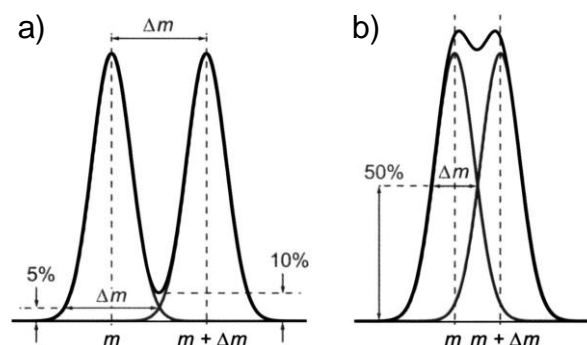
**Tabelle 2-2:** Einteilung der Massenanalysatoren.

Ionenstrahl-Analysatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sektorfeld-Analysator</li> <li>• Quadrupol-Analysator</li> </ul>
Ionenfallen-Analysatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quadrupol-Ionenfalle</li> <li>• Orbitrap</li> <li>• Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Analysator (FT-ICR)</li> </ul>
Flugzeitanalysator	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flugzeitanalysator (TOF)</li> </ul>

Die Auswahl eines Analysortyps hängt von dem Massenbereich, der Scangeschwindigkeit, der Genauigkeit und dem Auflösungsvermögen des Gerätes ab.<sup>[59]</sup> Mit dem Auflösungsvermögen  $R$  wird die Fähigkeit des Gerätes beschrieben Ionen, die einen geringen Massenunterschied besitzen, noch gut voneinander trennen zu können.<sup>[58]</sup>  $R$  ist definiert als:<sup>[58]</sup>

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Dabei wird zwischen zwei Definitionen unterschieden, der 10%-Tal-Definition und der Halbwertsbreite (FWHM, engl. *full width at half maximum*) eines Signals (Abbildung 2-5).<sup>[59]</sup> Bei der 10%-Tal-Definition spricht man von zwei aufgelösten Signalen, wenn beide Peaks nicht mehr als zu 10% überlappen.<sup>[59]</sup> Wie in Abbildung 2-5a) dargestellt, beschreibt  $\Delta m$  hierbei die Massendifferenz zwischen den zwei gleichintensiven Signalen und  $m$  entspricht der Massenzahl des ersten Signals.<sup>[59]</sup> Das gleiche Verhältnis ist gegeben, wenn man die Massenzahl  $m$  eines der beiden Signale durch die Peakbreite  $\Delta m$  desselben Signals bei 5% seiner Gesamtintensität teilt.<sup>[59]</sup> Allerdings ist es schwierig, in einem Massenspektrum zwei intensitätsgleiche und sich zu 10% überlappende Signale zu finden bzw. die Breite eines Signals bei 5% seiner Gesamtintensität identifizieren zu können ohne, dass es im Grundrauschen untergeht.<sup>[59]</sup> Daher erfolgt die Auflösungsbestimmung eines Gerätes in der Regel über die Halbwertsbreite eines Signals (Abbildung 2-5b)).<sup>[59]</sup> Bei dieser Definition steht  $\Delta m$  für den FWHM-Wert und  $m$  ist die Massenzahl des Peaks.<sup>[59]</sup>

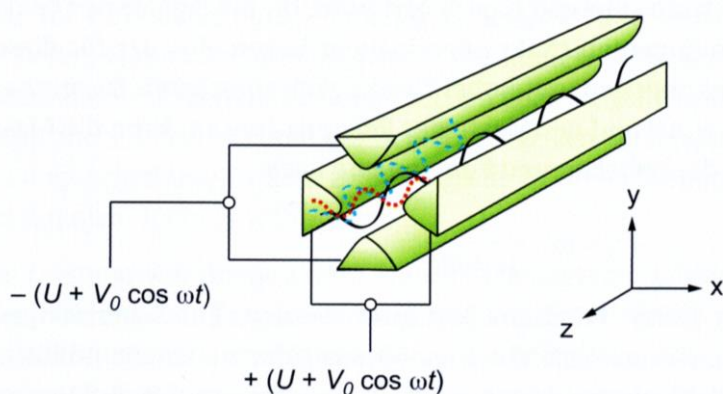


**Abbildung 2-5:** Beschreibung des Auflösungsvermögens  $R$  eines Massenanalysators anhand a) der 10%-Tal-Definition und b) der Halbwertsbreite FWHM.<sup>[59]</sup>

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Massenanalysatoren näher erläutert.

### 2.2.3.1 Quadrupol-Analysator

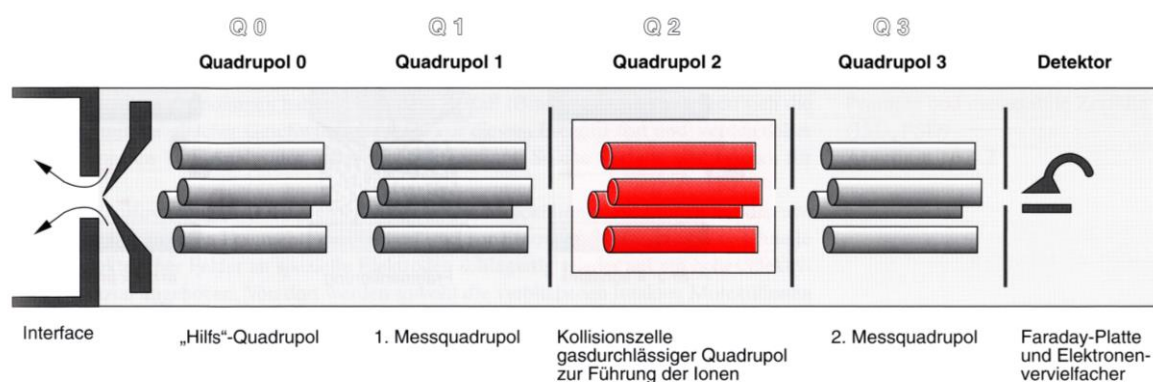
Ein Quadrupol-Analysator besteht aus vier hyperbolisch geformten Metallstäben, die einen Kreis um die in Abbildung 2-6 gezeigte z-Achse bilden.<sup>[58],[59]</sup> Die jeweils gegenüberliegenden Metallelektroden sind paarweise an entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquellen angeschlossen.<sup>[56]</sup> An allen vier Stäben wird der Gleichspannung  $U$  eine Wechselspannung  $V_0 \cos \omega t$  überlagert.<sup>[58],[59]</sup> Somit baut sich in der Nähe der z-Achse ein elektrisches Feld auf, in dem nur Ionen mit bestimmten  $m/z$ -Verhältnissen dazu berechtigt sind, das Stabsystem entlang einer oszillierenden Bahn zu durchfliegen und den nachgeschalteten Detektor zu erreichen.<sup>[59]</sup> Ionen mit anderen  $m/z$ -Verhältnissen dagegen prallen auf die Stäbe und werden entladen (gestrichelte Bahnen).<sup>[59]</sup>



**Abbildung 2-6:** Funktionsweise eines linearen Quadrupols.<sup>[59]</sup>

Um Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnissen erfassen zu können, werden im Normalfall bei einem konstanten  $\omega$ -Wert  $U$  und  $V_0$  variiert, ohne dass das  $U/V_0$ -Verhältnis dabei verändert wird.<sup>[59]</sup> Ein Quadrupol-Analysator ist also nicht in der Lage, Ionen mit unterschiedlichen Massen gleichzeitig zu detektieren.<sup>[59]</sup> Es ist allerdings möglich, die Spannungen an den Elektroden in  $\mu\text{s}$ -Abständen zu verändern, so dass ein rasches Scannen ( $5000 \text{ m/z s}^{-1}$ ) und somit eine kontinuierliche Detektion erfolgt.<sup>[59]</sup>

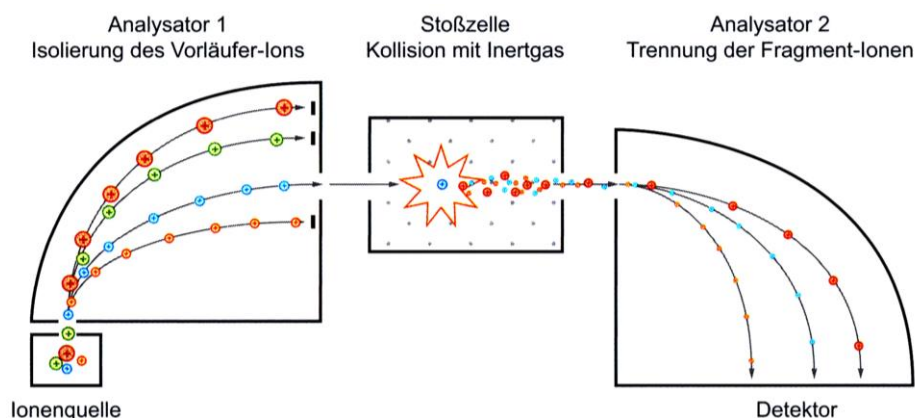
Der Quadrupol-Analysator ist aus Kostengründen und aufgrund der einfachen Handhabung, der am weitesten verbreitete Massenspektrometer-Typ.<sup>[59]</sup> Zwar besitzt er einen relativ kleinen Massenbereich (bis ca. 4000  $m/z$ ) und ein geringes Auflösungsvermögen (bis ca. 3000), jedoch ist er aufgrund der hohen Scangeschwindigkeit gut mit chromatographischen Methoden und den meisten Ionenquellen kombinierbar.<sup>[59]</sup> Eine Kombination aus drei in Reihe geschalteten Quadrupol-Analysatoren führt zum Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Q1Q2Q3),<sup>[59]</sup> das in Abbildung 2-7 dargestellt ist. Mit diesem Gerät ist es möglich, verschiedene Tandem-MS-Experimente durchzuführen, die besonders bei der Quantifizierung und Strukturaufklärung von unbekannt Substanzen eine große Rolle spielen.<sup>[59]</sup>



**Abbildung 2-7:** Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupolmassenspektrometers.<sup>[58]</sup>

Genau genommen besteht ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer aus vier Quadrupolen.<sup>[58]</sup> Dem ganzen System ist nämlich ein Hilfsquadrupol Q0 vorgeschaltet, dessen Aufgabe es ist, die in der Ionenquelle erzeugten Ionen lediglich zu fokussieren.<sup>[58]</sup> Die Ionen werden dann in den ersten Messquadrupol Q1 geleitet, wo die Selektion der Vorläuferionen stattfindet, deren Masse frei wählbar ist (Abbildung 2-8).<sup>[59]</sup> Hiernach werden die selektierten Ionen in die Stoßzelle Q2 beschleunigt.<sup>[59]</sup> Die Stoßzelle, auch Kollisionskammer genannt, ist mit einem inerten Gas, wie beispielsweise Stickstoff (hoher Reinheitsgrad), Helium oder Argon, gefüllt.<sup>[58],[59]</sup> Da es in dieser Zelle zur Kollision der Vorläuferionen mit den Gasmolekülen kommt, werden die Ionen angeregt und fragmentiert.<sup>[59]</sup> Damit möglichst viele verschiedene Fragmentationen entstehen können, ist es bei diesem Experiment wichtig, die Kollisionsenergie zu optimieren.<sup>[59]</sup> Die Massenbestimmung und Auftren-

nung der entstandenen Fragmentationen erfolgt schließlich in dem Messquadrupol Q3.<sup>[58],[59]</sup>



**Abbildung 2-8:** Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie.<sup>[59]</sup>

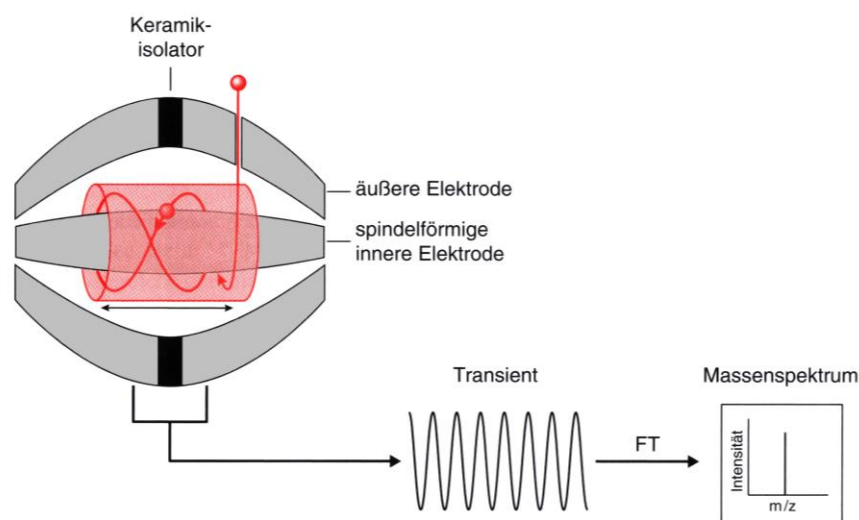
### 2.2.3.2 Orbitrap

Die Orbitrap, auch Orbital-Ionenfalle genannt,<sup>[58]</sup> stellt die jüngste Entwicklung der Ionenfallen-Analysatoren dar.<sup>[59]</sup> Sie besitzt eine zentral angeordnete, spindelförmige Elektrode, die von einer äußeren Elektrode umhüllt wird, wobei Letztere in der Mitte durch einen Keramikisolator unterbrochen ist.<sup>[58],[59]</sup> Zwischen beiden Elektroden ist ein elektrisches Feld angelegt.<sup>[59]</sup> Nach tangentialer Injektion der Ionen in dieses Feld,<sup>[59]</sup> gleichen sich die Zentrifugalkraft und die Anziehung zur zentralen Elektrode aus.<sup>[58]</sup> Wie in Abbildung 2-9 gezeigt, fangen die Ionen dann an die innere Elektrode zu umkreisen und seitliche Oszillationsbewegungen durchzuführen,<sup>[58]</sup> deren Schwingungsfrequenz  $\omega$  vom  $m/z$ -Verhältnis abhängt:<sup>[59]</sup>

$$\omega \propto \frac{1}{\sqrt{m/z}}$$

Durch diese Schwingungen werden an den äußeren Elektroden Signale erzeugt, die dann über Fourier-Transformation in  $m/z$ -Werte umgewandelt werden.<sup>[59]</sup> Existieren mehrere verschiedene Ionen, so erhält man aus der Überlagerung der verschiedenen Sinusschwingungen einen Transient, dessen Fourier Transformation das Massenspektrum liefert.<sup>[58]</sup>

Mit Hilfe von Orbitrap-Analysatoren können Massenspektren mit einem Massenbereich bis zu  $6000\text{ m/z}$ ,<sup>[59]</sup> einer Genauigkeit von  $0.5\text{-}2\text{ ppm}$  und einer Auflösung bis zu  $100\,000\text{ FWHM}$  aufgenommen werden.<sup>[58]</sup>



**Abbildung 2-9:** Schematischer Aufbau einer Orbital-Ionenfalle.<sup>[58]</sup>

## 2.2.4 Detektion

Die Detektoren haben die Aufgabe den Ionenstrom nach der Massenauftrennung in einen elektrisch messbaren Strom umzuwandeln.<sup>[56]</sup> Hierfür stehen der Faraday-Becher, die Konversionsdynode mit Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) und die Vielkanalplatte zur Verfügung.<sup>[58]</sup>

## 2.3 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) ist neben der Massenspektrometrie die wichtigste chemisch-analytische Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen.<sup>[55]</sup> Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Aufspaltung der Energieniveaus des Kernspins in mehrere Zustände bei Anwesenheit eines äußeren Magnetfeldes.<sup>[58]</sup> Durch die Einstrahlung von hochfrequenten Radiowellen, deren Frequenz mit dem Energieunterschied der Zustände übereinstimmt,<sup>[57]</sup> kommt es zu Übergängen von den Atomkernen bei denen sich ihre magnetischen Momente

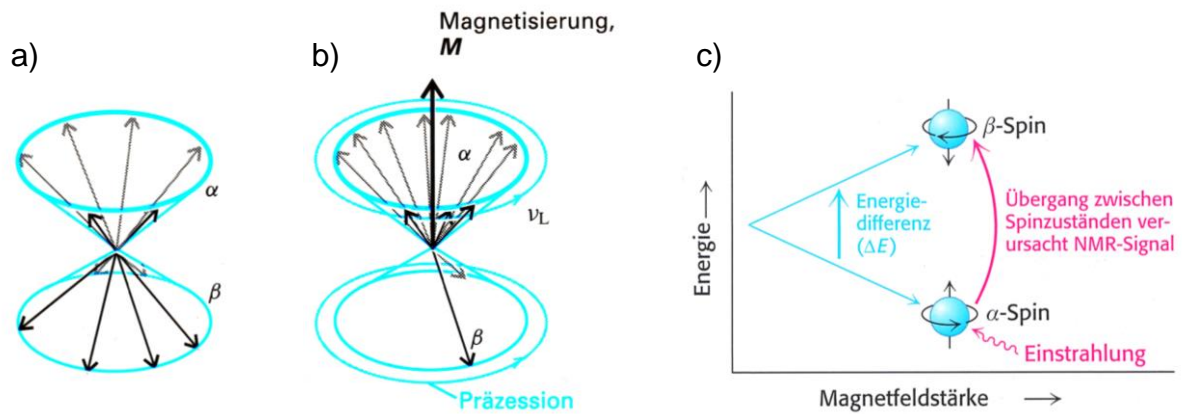
unterschiedlich orientieren.<sup>[56]</sup> Gemessen wird die Strahlungsabsorption in Abhängigkeit von der Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung.<sup>[57]</sup> Die Resonanzfrequenz der Atomkerne ist hierbei abhängig von der Elektronendichteverteilung in Kernnähe.<sup>[63],[64]</sup> Somit können gleiche Atomkerne aufgrund ihrer Umgebung unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen, was sich in differierenden chemischen Verschiebungen der Signale bemerkbar macht.<sup>[57]</sup>

Da für die Anregung langwellige, energiearme Radiowellen eingesetzt werden,<sup>[56]</sup> ist die Kernresonanzspektroskopie eine schonende Methode, bei der die Probe nicht zerstört wird. Im Gegensatz zu der Massenspektrometrie besitzt die NMR-Spektroskopie jedoch eine weitaus niedrigere Empfindlichkeit, die allerdings durch Verstärkung der Magnetfelder erhöht werden kann.<sup>[55],[58]</sup> Neben der Strukturaufklärung ist es auch möglich, zeitabhängige Phänomene wie zum Beispiel Reaktionskinetiken, allosterisch induzierte Konformationsänderungen und Faltungen von Polypeptiden mittels der Kernresonanzspektroskopie zu analysieren.<sup>[57],[58]</sup>

### 2.3.1 Eindimensionale Kernresonanzspektroskopie

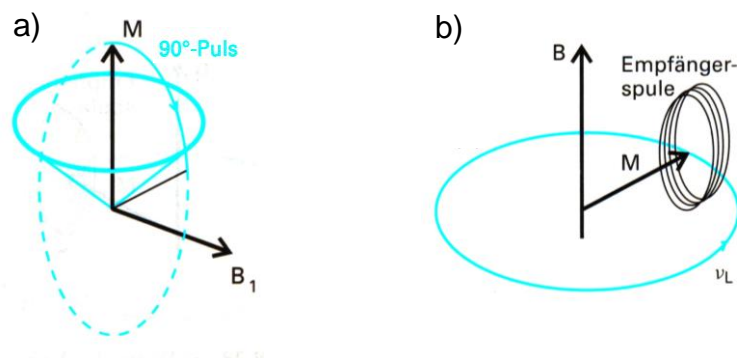
Die Voraussetzung für die Analyse von Atomkernen mittels NMR-Spektroskopie ist das Vorhandensein eines Kernspins, dessen Wert von der Kernsorte abhängt.<sup>[55]</sup> Das Prinzip der Signalerzeugung soll im Folgenden am Beispiel von Spin- $\frac{1}{2}$ -Kernen, wie  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ , näher erläutert werden. Bevor ein äußeres Magnetfeld angelegt wird, ist die Anzahl von Kernen mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spin identisch (Abbildung 2-10a).<sup>[63]</sup> Die magnetischen Momente der Kerne orientieren sich dabei willkürlich auf den Kegelmänteln um die z-Achse.<sup>[63]</sup> Nach Anlegen des äußeren Magnetfeldes spalten die beiden Spinzustände, deren Energieunterschied proportional zur Magnetfeldstärke ist (Abbildung 2-10c), auf und die Spins rotieren um die Feldrichtung.<sup>[63],[64]</sup> Man spricht von einer sogenannten Präzessionsbewegung.<sup>[55]</sup> Der  $\alpha$ -Spin ist hierbei energetisch günstiger und daher auch stärker besetzt.<sup>[63],[64]</sup> Hieraus ergibt sich eine Magnetisierung  $M$  der Probe, die in Abbildung 2-10b) in Form eines Vektors in z-Richtung eingezeichnet ist.<sup>[63]</sup>





**Abbildung 2-10:** a) Schematische Darstellung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spins vor dem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes.<sup>[63]</sup> b) Darstellung der beiden aufgespalteten Spinzustände nach dem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes.<sup>[63]</sup> c) Schematische Darstellung der Energiedifferenz zwischen den beiden Spinzuständen in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke.<sup>[64]</sup>

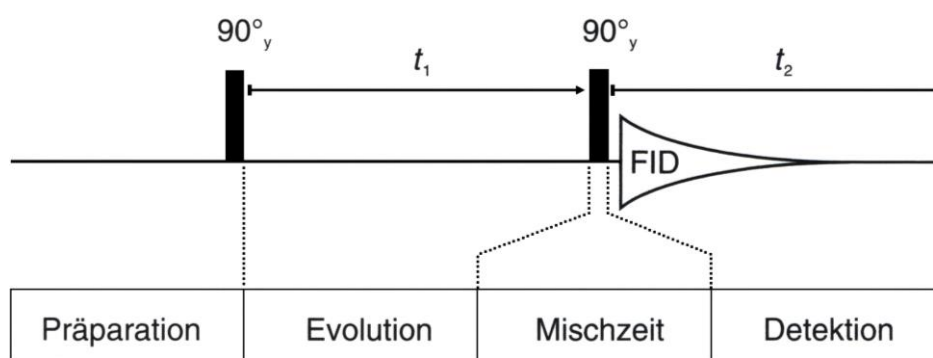
Legt man nun einen elektromagnetischen Strahlungsimpuls  $B_1$  an, idealerweise einen  $90^\circ$ -Puls, so klappt die Magnetisierung  $M$  der Probe in die  $xy$ -Ebene (Abbildung 2-11a).<sup>[63]</sup> Es kommt, wie in Abbildung 2-11b) gezeigt, zu einer Rotation des Magnetisierungsvektors mit der Larmor-Frequenz der Probe in der  $xy$ -Ebene.<sup>[63]</sup> Hierbei wird bei der Empfängerspule eine Spannung erzeugt, die mit der Zeit exponentiell abnimmt,<sup>[63]</sup> verursacht durch das Zurückkehren der Magnetisierung zu ihrem Gleichgewichtswert.<sup>[58]</sup> Das gemessene Signal wird als FID (engl. *free induction decay*, frei abklingende Induktion) bezeichnet.<sup>[63]</sup> Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern können beliebig viele FID-Daten aufgenommen und anschließend aufaddiert werden.<sup>[58]</sup>



**Abbildung 2-11:** a) Schematische Darstellung der Anlegung des elektromagnetischen Strahlungsimpulses  $B_1$ ,<sup>[63]</sup> b) Wirkung eines  $90^\circ$ -Pulses auf  $z$ -Magnetisierung.<sup>[63]</sup>

### 2.3.2 Zweidimensionale Kernresonanzspektroskopie

Die Auswertung von eindimensionalen NMR-Spektren wird mit zunehmender Molekülgröße immer schwerer, da es aufgrund der hohen Anzahl gleicher Kernsorten zu Signalüberlagerungen kommt.<sup>[58]</sup> Daher ist es notwendig, eine weitere spektrale Dimension einzuführen.<sup>[58]</sup> Während die eindimensionalen NMR-Experimente lediglich aus zwei Phasen, nämlich der Präparation und Detektion bestehen, kommen bei den zweidimensionalen NMR-Experimenten noch die Evolutionszeit  $t_1$  und die Mischsequenz hinzu (Abbildung 2-12).<sup>[58]</sup>



**Abbildung 2-12:** Pulssequenz von zweidimensionalen NMR-Experimenten.<sup>[58]</sup>

Nach der Präparationsphase kommt es in der Zeit  $t_1$  zur freien Präzession der Spins.<sup>[58]</sup> In dieser Evolutionszeit wird für den ersten Kern, abhängig von der Magnetisierung, die chemische Verschiebung bestimmt.<sup>[58]</sup> In der Mischsequenz wird hier nach der Magnetisierungszustand am Ende der Evolutionszeit  $t_1$  abgefragt und vom ersten Kern Magnetisierung auf einen anderen Kern transferiert.<sup>[58]</sup> Der Magnetisierungstransfer läuft über zwei verschiedene Mechanismen ab, der skalaren Kopplung und der dipolaren Wechselwirkung.<sup>[58]</sup> In der abschließenden Detektionsphase werden die Daten akquiriert.<sup>[58]</sup> Hierbei wird die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns markiert.<sup>[58]</sup> Nach der Fourier-Transformation in der  $t_2$ -Richtung erhält man die Momentaufnahme bei einer bestimmten Zeit  $t_1$  in Form eines eindimensionalen Spektrums.<sup>[58]</sup> Führt man nun weitere Einzelexperimente durch, bei denen die Evolutionszeit  $t_1$  variiert wird, kann eine Aneinanderreihung der eindimensionalen Experimente durchgeführt werden.<sup>[58]</sup> Eine Fourier-Transformation entlang der  $t_1$ -Richtung führt dann zum gewünschten zweidimensionalen NMR-Spektrum.<sup>[58]</sup>

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten zweidimensionalen NMR-Experimente ausführlicher besprochen.

### 2.3.2.1 Das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment

Das  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment (*correlated spectroscopy*) wird verwendet, um die Kopplungen von Protonen, die über zwei bzw. drei Bindungen miteinander verbunden sind, zu identifizieren.<sup>[58]</sup> Es handelt sich also um ein homonuklear (H,H)-korreliertes NMR-Experiment, bei dem auf beiden Achsen die  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen aufgetragen sind.<sup>[65]</sup> Somit erhält man ein zur Diagonalen symmetrisches Spektrum, bei dem die Diagonalpeaks die Signale des eindimensionalen  $^1\text{H}$ -Spektrums wiedergeben.<sup>[58]</sup> Bezeichnet man die beiden miteinander koppelnden Protonen mit A und X, so erscheinen die Signale der Diagonalen bei den Koordinaten  $\delta_A, \delta_A$  und  $\delta_X, \delta_X$  und die symmetrisch zur Diagonalen liegenden Korrelationssignale, auch Kreuzsignale genannt, bei den Koordinaten  $\delta_A, \delta_X$  und  $\delta_X, \delta_A$ .<sup>[65]</sup> Da anhand der Kreuzsignale die Nachbarschaftsbeziehungen aller koppelnden Protonen ermittelt werden können,<sup>[65]</sup> stellt das  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment eine der wichtigsten Messtechniken in der NMR-Spektroskopie dar.

### 2.3.2.2 Das HMQC- und das HSQC-Experiment

Das HMQC-Experiment (*heteronuclear multiple quantum coherence*) gehört zur inversen, zweidimensionalen, heteronuklearen H,X-korrelierten NMR-Spektroskopie (mit  $X = ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$  u.a.).<sup>[65]</sup> Bei inversen Aufnahmetechniken werden im Kanal der unempfindlichen Kerne X Kohärenzen erzeugt, die auf die empfindlichen  $^1\text{H}$ -Kerne übertragen werden, deren Resonanzen dann auch gemessen werden.<sup>[65]</sup> Dieses Experiment liefert die Signale der  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - bzw.  $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ -Kopplungen.<sup>[59]</sup> Man erhält somit die Information, welches Proton mit welchem Kohlenstoff- bzw. Stickstoffatom direkt verbunden ist.<sup>[59]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass während der Zeiten  $t_1$  und  $t_2$  zwei unterschiedliche Kerne gemessen werden, besitzen die Spektren von heteronuklearen NMR-Experimenten, im Vergleich zu homonuklearen NMR-Experimenten, keine Diagonale.<sup>[58]</sup> Ähnliche Eigenschaften besitzt auch das HSQC-Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*). Der wesentliche Unterschied zum HMQC-Experiment besteht darin, dass sich während der Evolutionszeit nur die

Magnetisierung des Heterokerns ändert. Bei dem HMQC-Experiment hingegen ändert sich die Magnetisierung von beiden betrachteten Kernen.<sup>[65]</sup>

### 2.3.2.3 Das HMBC-Experiment

Das HMBC-Experiment (*heteronuclear multiple bond correlation*) wird eingesetzt, um Kopplungen von Protonen mit den Kernen X ( $X = {}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{15}\text{N}$  u.a.) über mehrere Bindungen hinweg zu erfassen.<sup>[65]</sup> Es stellt eines der empfindlichsten Verfahren für Weitbereichskorrelationen dar. Im Gegensatz zum HSQC-Experiment, das lediglich auf große X,H-Kopplungskonstanten abgestimmt ist und somit nur die Detektion von  ${}^1J(X,H)$ -Kopplungen ermöglicht, können anhand von HMBC-Experimenten auch die Kopplungen von Protonen zu quartären Kohlenstoffatomen detektiert werden.<sup>[65]</sup> Daher ist es möglich, einzelne, bereits über das COSY-Experiment aufgeklärte, Strukturfragmente miteinander zu verknüpfen. Der Unterschied zwischen dem HSQC- und HMBC-Experiment besteht darin, dass Letzteres eine größere Wartezeit zwischen dem ersten Protonenpuls und dem ersten X-Kern-Puls für die Entwicklung der heteronuklearen Kopplung besitzt. Durch die verlängerte Wartezeit können sich somit Fernkopplungen über zwei bzw. drei Bindungen entwickeln.<sup>[65]</sup>

### 2.3.2.4 Das NOESY-Experiment

Bei den bisher vorgestellten Methoden fand der Magnetisierungstransfer zwischen den Kernen über skalare Kopplungen statt.<sup>[65]</sup> Beim NOESY-Experiment (*nuclear overhauser enhancement (effect) spectroscopy*) hingegen, erfolgt die Übertragung der Magnetisierung über dipolare Wechselwirkungen der Kernspins durch den Raum.<sup>[58]</sup> Die Stärke der Wechselwirkung ist dabei proportional zu  $1/r^6$ , wobei  $r$  den Abstand zwischen den beiden beteiligten Kernen darstellt.<sup>[58]</sup> Daher ist es in der Regel bei Kernabständen größer als 5 Å nicht möglich Kopplungen zu beobachten.<sup>[58]</sup> Wenn Protonen in der Primärstruktur eines Peptids weit voneinander entfernt sind, aber trotzdem eine Korrelation im NOESY-Spektrum zeigen, so kann man davon ausgehen, dass sie in der Tertiärstruktur einen Abstand kleiner als 5 Å besitzen.<sup>[58]</sup> Das NOESY-Experiment ist somit eine wichtige Methode um Informationen über die räumliche Struktur von Molekülen zu erhalten.

### 3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit richtet sich im Wesentlichen auf zwei Zielsetzungen aus.

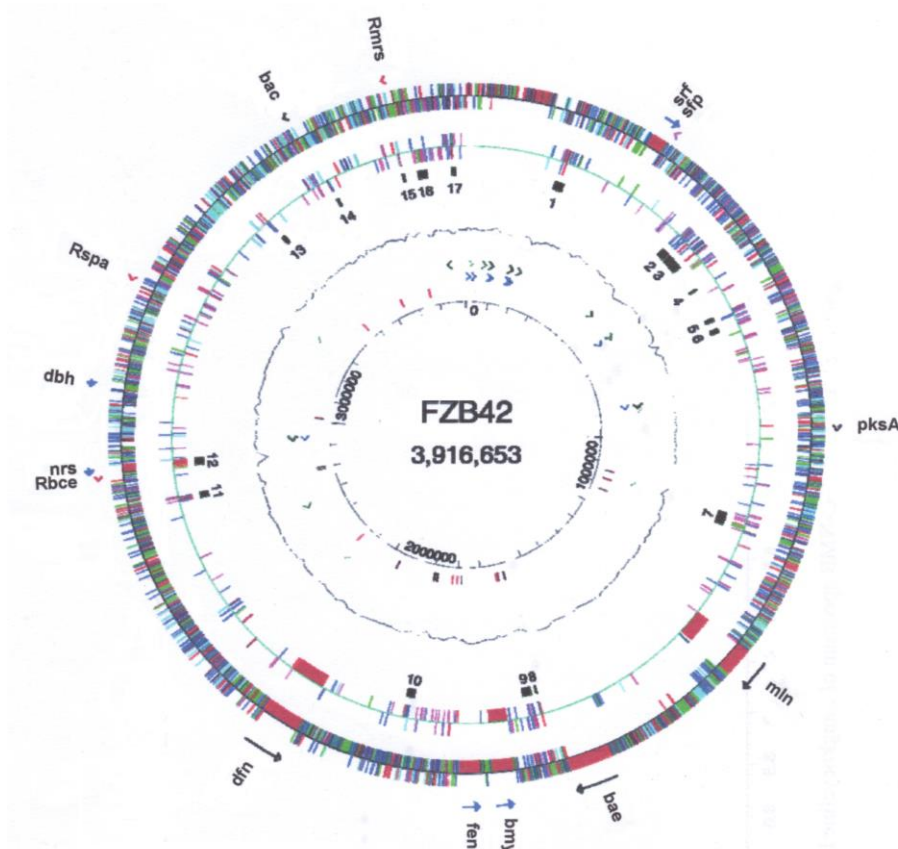
Das erste Ziel war die Strukturaufklärung des ribosomal synthetisierten Peptids Plantazolicin aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Das Plantazolicin besitzt ein Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin (TOMM)-Biosynthesecluster. Anhand der Informationen aus dem TOMM-Cluster, konnte davon ausgegangen werden, dass das Plantazolicin als Präkursor synthetisiert und dann, wie alle anderen Microcine, modifiziert wird. Das Cluster beinhaltet eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase PznL, die, wie anhand von Knockout-Experimenten herausgefunden wurde, für die Einführung von zwei Methylgruppen verantwortlich ist.<sup>[24]</sup> Mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Experimenten und Tandem-Massenspektrometrie sollte die Struktur des Moleküls und die Position der beiden Methylgruppen ermittelt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an Protonen im Plantazolicin sollte zusätzlich eine <sup>15</sup>N-Fütterung durchgeführt werden, um dann mit Hilfe von 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-NMR-Experimenten die komplette Struktur aufklären zu können.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, die Strukturen einer neuen Naturstofffamilie, den Langkocyclinen, aufzuklären. Die Langkocycline wurden im Zuge eines chemischen Screening-Programms von Actinomyceten-Stämmen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen entdeckt. Die Sekundärmetabolitenproduktion dieser Stämme wurde mit Hilfe eines HPLC-Diodenarray-Detektors analysiert und die Ergebnisse mit den Daten aus der UV/Vis-Stoffdatenbank verglichen. Drei Substanzen aus dem *Streptomyces*-Stamm Acta 3034 konnten aufgrund der nahezu übereinstimmenden UV/Vis-Spektren den Urdamycin A-Typ Antibiotika zugeordnet werden und zwei dem Urdamycin D-Typ. Die Tatsache, dass alle Substanzen eine abweichende Retentionszeit besaßen, ließ vermuten, dass es sich um bisher unbekannte Verbindungen handelt. Das Ziel war somit die Strukturaufklärung und die anschließende Untersuchung auf biologische Aktivität dieser neuen Naturstoffe.

## 4 Plantazolicin

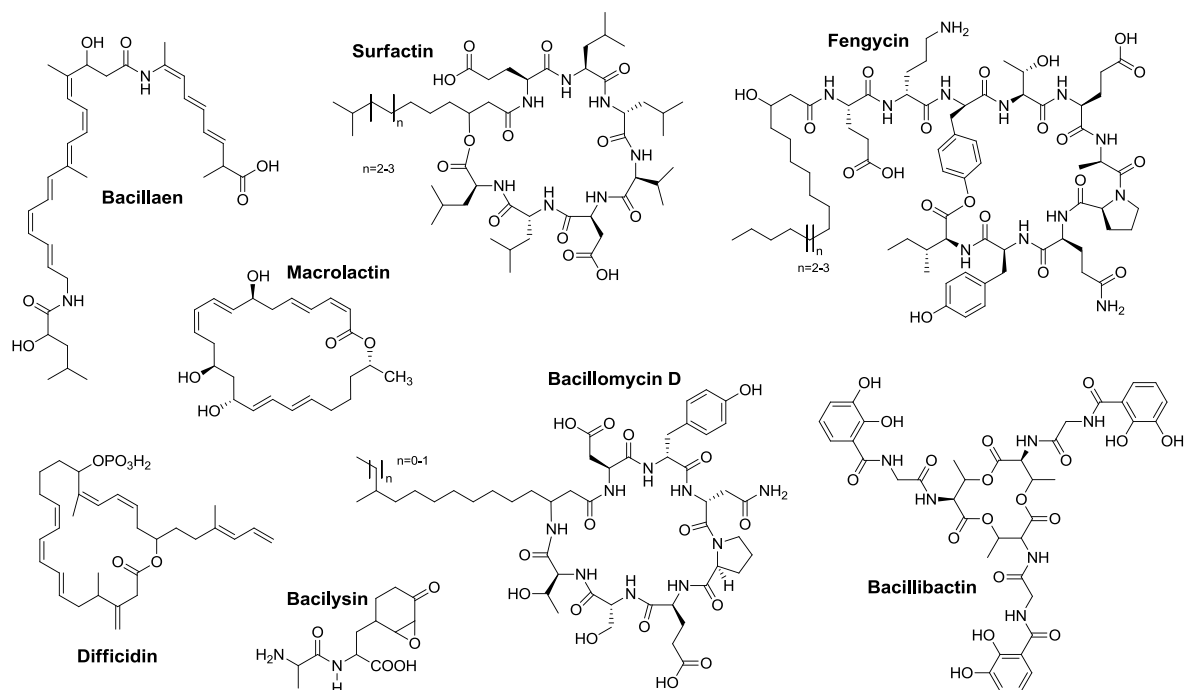
### 4.1 Sekundärmetabolit-Produktion in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ist ein grampositives, pflanzenwachstumsförderndes Rhizobakterium (PGPR, engl. *plant growth-promoting rhizobacteria*)<sup>[66]</sup>, das aus Böden mit phytopathogener Belastung isoliert wurde.<sup>[67],[68]</sup>



**Abbildung 4-1:** Das Genom von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. 1. äußerer Kreis: beinhaltet alle Gene und Gencluster, die für die Synthese und den Export von Sekundärmetaboliten zuständig sind. Alle Gene sind entsprechend ihrer Funktion farbig dargestellt: Zellhülle und molekulare Prozesse (grün), Informationsprozesse (rot), Intermediärstoffwechsel (lila), unbekannt (schwarz); 2. Kreis: Gene, die nicht in *B. subtilis* vorkommen. Darunter vier riesige Gencluster, die in der Synthese von Sekundärmetaboliten involviert sind (rot); 3. Kreis: DNA-Inseln 1-17 (schwarz); 4. Kreis: GC-Gehalt-Profil; 5. Kreis: rRNAs (grün); 6. Kreis: tRNAs (blau); 7. Kreis: Prophagen (schwarz), Transposons und IS-Elemente (rot); 8. Kreis: Maßstab (bp).<sup>[69]</sup>

Zusätzlich zur Fähigkeit das Pflanzenwachstum durch die Produktion von pflanzenhormonähnlichen Substanzen zu fördern,<sup>[70]</sup> ist das Bakterium in der Lage die Vermehrung von pflanzenpathogenen Organismen zu unterdrücken.<sup>[71]</sup> Da der verwandte Modellorganismus *Bacillus subtilis* 168 nicht diese beiden wichtigen Eigenschaften besitzt, wurde das komplette Genom von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 sequenziert und mit dem bereits bekannten Genom von *Bacillus subtilis* 168 verglichen.<sup>[72]</sup> Das in Abbildung 4-1 dargestellte Genom ist mit einer Größe von ca. 3920 kb kleiner als das Genom von *Bacillus subtilis* 168 (ca. 4220 kb), jedoch ist der Anteil für die nichtribosomale Sekundärmetabolitproduktion mit 8,5 % doppelt so hoch.<sup>[71]</sup> Das Genom besitzt drei PKS-Biosyntheseengcluster, die den Biosyntheseprodukten Bacillaen,<sup>[73],[74]</sup> Difficidin<sup>[75],[76]</sup> und Macrolactin<sup>[77],[78]</sup> zugeordnet werden konnten.<sup>[79]-[81]</sup> Des Weiteren sind sechs NRPS-Biosyntheseengcluster enthalten, von denen drei für die Produktion der Lipocyclodepsipeptide Fengycin,<sup>[82]</sup> Surfactin,<sup>[83],[84]</sup> und Bacillomycin D<sup>[85]</sup> zuständig sind, eines für die Produktion des Siderophors Bacillibactin<sup>[86]</sup> und eines für die Herstellung des Dipeptids Bacilysin.<sup>[71]</sup> Das Produkt des sechsten NRPS-Biosyntheseengclusters *nrs* ist noch unbekannt. Es wird allerdings vermutet, dass es sich dabei wie beim Bacillibactin um ein Siderophor handelt.<sup>[71]</sup>



**Abbildung 4-2:** Strukturen der PKS- und NRPS-Produkte von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.

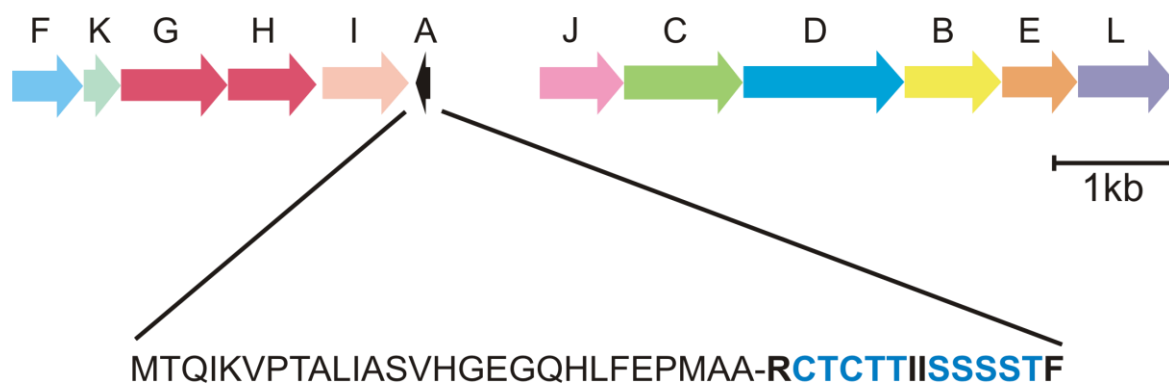
Die Biosynthese all dieser nichtribosomalen Sekundärmetabolite, deren Strukturen in Abbildung 4-2 dargestellt sind, hängt von der Expression der 4'-Phosphopantetheinyltransferase (Sfp) ab,<sup>[72]</sup> da Letztere die PKS- und NRPS-Enzyme aktiviert. Anhand der Untersuchungen von Butcher *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine *sfp*-Mutante, bei der das *sfp*-Gen inaktiviert war und diese somit nicht mehr zur nichtribosomalen Sekundärmetabolitproduktion fähig war, trotzdem antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis* 168 aufwies.<sup>[87]</sup> Es konnte also davon ausgegangen werden, dass mindestens eine ribosomal hergestellte antibakterielle Substanz in *B. amyloliquefaciens* FZB42 existiert.

Auf der Suche nach kleinen Sekundärmetaboliten mit Hilfe eines ESI- und eines MALDI-TOF-MS-Screenings, gelang es Scholz *et al.* eine Substanz mit der Masse  $[M+H]^+=1336$  Da zu entdecken.<sup>[24]</sup> Außerdem wurde eine gegen grampositive *Bacillus*-Stämme aktive Substanz zwischen 1 und 3 kb mit Hilfe von SDS-Page identifiziert. Nach Ausschneiden der Gelbande und anschließender MALDI-TOF-Analysen, wurde die Substanz mit einer Molekülmasse von  $[M+H]^+=1354$  Da als die hydratisierte Form der bereits mit Hilfe des ESI- und MALDI-TOF-MS-Screenings gefundenen Masse identifiziert.<sup>[24]</sup> Anschließend wurden die physikochemischen Eigenschaften der Substanz zusammengefasst und anhand von Literaturrecherchen mit bereits bekannten Verbindungen verglichen. Es wurde nach kleinen, stark modifizierten, antibakteriellen Peptiden aus grampositiven Bakterien gesucht, die in Chloroform löslich sind.<sup>[24]</sup> Hierbei wurde herausgefunden, dass zwischen Thiopeptiden und der Substanz mit der Masse  $[M+H]^+=1336$  Da eine starke Ähnlichkeit besteht. Zusätzlich wurde zwischen einigen Thiopeptidbiosynthesegenen und Genen im *B. amyloliquefaciens*-Genom eine Orthologie festgestellt. Durch das Einfügen einer Spectinomycin-Resistenzkassette in eines dieser orthologen Gene blieb die Produktion der Substanz mit der Masse  $[M+H]^+=1336$  Da aus.<sup>[24]</sup> Durch Proteinsequenzvergleiche mittels Protein-Blast<sup>[88]</sup> und ClustalW<sup>[89]</sup> konnte eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den Biosyntheseproteinen der Substanz mit der Masse  $[M+H]^+=1336$  Da und den Streptolysin S-Biosyntheseproteinen aus *Streptococcus pyogenes* festgestellt werden.<sup>[24]</sup> Bei dem Streptolysin S handelt es sich um ein Zytolysin,<sup>[90]</sup> einem zellschädigenden Toxin, das ein Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin (TOMM)-Biosynthesecluster besitzt.<sup>[24]</sup> Wie bereits in Kapitel 1.3.1.1 näher erklärt wurde, bestehen TOMM-Biosynthesecluster aus einem trimeren „BCD“-Synthetase-Komplex, zusammengesetzt aus einer Dehydrogenase (B), einer Cyclodehydratase



(C) und einem „docking“-Protein (D).<sup>[24]</sup> Weitere TOMM-Cluster sind beispielsweise bei der Biosynthese von Microcin B17,<sup>[91]</sup> den Patellamiden<sup>[92]</sup> und den Thiopeptiden<sup>[93],[94]</sup> zu finden. Da das Biosynthesecluster der Substanz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1336$  Da aus den pflanzenassoziierten *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämmen stammt, das Produkt von Cystein, Serin und Threonin ausgehende „Azo“-Ringe enthält und es sich um ein Bacteriocin handelt, wurde der Substanz der Name Plantazolicin (Pzn) gegeben.<sup>[95]</sup>

Das in Abbildung 4-3 gezeigte PZN-Gencluster setzt sich aus zwölf Genen zusammen. *PznA* kodiert für das Vorläuferpeptid, das insgesamt aus 41 Aminosäuren besteht. Die drei Gene *pznB*, *pznC* und *pznD* kodieren für den trimeren „BCD“-Synthetase-Komplex. Die Protease, die das Leaderpeptid abspaltet, vermutlich eine Zinkprotease, wird von *pznE* kodiert. PznL stellt die S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase dar, die zur Einführung von zwei Methylgruppen verantwortlich ist. PznG und PznH sind ABC-Transporter und somit dafür zuständig, das Produkt aus der Zelle heraus in das umgebende Medium zu exportieren. Es wird vermutet, dass PznK die Expression der anderen *pzn*-Gene reguliert und es sich bei PznF um ein putatives Membranprotein handelt. Die Funktionen von PznI und PznJ sind noch unbekannt.<sup>[24]</sup>



**Abbildung 4-3:** Das *pzn*-Gencluster mit einer Größe von 9862 bp setzt sich aus zwölf Genen zusammen. Das Vorläuferpeptid, welches von *pznA* kodiert wird, besteht aus 41 Aminosäuren, wobei die Serine, Threonine und Cysteine, aus denen die (Methyl-) Oxazole und Thiazole entstehen können, blau gekennzeichnet sind. Angegeben ist die Längeneinheit für 1 kb = 1 Kilobase.

Um die Struktur des Plantazolicins identifizieren zu können, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Borriss (Humboldt Universität Berlin) die beiden Mutan-

ten RSpMarA2 und RS33 hergestellt. Bei RSpMarA2 handelt es sich um einen Plantazolicin-Hochproduzenten und bei RS33 um eine Methyltransferase-Geninaktivierungsmutante, bei der das Gen, welches die Methyltransferase kodiert, inaktiviert ist. Beide Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit fermentiert, deren Produkte isoliert und mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Experimenten und Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund der hohen Anzahl an quartären Kohlenstoffatomen, bedingt durch die zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, die Substanzen mit Thiazol/Oxazol-modifizierten Microcin (TOMM)-Biosyntheseclustern durchlaufen, war es für die erfolgreiche Strukturaufklärung des Moleküls zusätzlich notwendig, eine  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung durchzuführen. Mit dem  $^{15}\text{N}$ -markierten Plantazolicin wurden dann  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Experimente durchgeführt.

## 4.2 Fermentation und Isolierung

Die Anzucht der Mutantenstämme erfolgte auf Glucose-Minimal-Agar-Medium (Ammoniumsulfat, 0.2%; Dikaliumphosphat, 1.4%; Monokaliumphosphat, 6%; Natriumcitrat ( $2\text{H}_2\text{O}$ ), 0.1%; Magnesiumsulfat ( $7\text{H}_2\text{O}$ ), 0.02%; Agar und Glucose, 0.5%).<sup>[96]</sup> Anhand von Vergleichsexperimenten konnte herausgefunden werden, dass sich dieses Medium besser für die Produktion von Plantazolicin und Desmethyl-Plantazolicin eignete als das von Scholz *et al.* beschriebene Produktionsmedium.<sup>[24]</sup> Das Glucose-Minimalmedium war, was die  $^{15}\text{N}$ -Fütterungsexperimente betraf, ebenfalls von Vorteil, da das im Medium enthaltene Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle diente und somit  $^{15}\text{N}$ -markiertes Ammoniumsulfat zur Isotopenmarkierung von Plantazolicin eingesetzt werden konnte. Zusätzlich wurde die PZN-Produktion in Glucose-Minimal-Flüssigkultur und auf Glucose-Minimal-Agar-Medium miteinander verglichen. Letzteres führte zu einer höheren Produktion, so dass die Fermentation auf Glucose-Minimal-Agarplatten erfolgte. Hierzu wurden 200 Agarplatten (5 Liter Medium) mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  Vorkultur (TSB-Medium) angeimpft und 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Oberfläche des Agarmediums abgekratzt, über Nacht mit dem Lösungsmittelgemisch Acetonitril / 0,1 %-ige Ameisensäure (70:30) extrahiert und pelletiert (4000 rpm, 15 min). Das Acetonitril wurde durch Destillation im Vakuum und das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Hiernach wurde der Rohextrakt mit MeOH extrahiert und der Extrakt im Vakuum einge-

engt. Reines Plantazolicin wurde abschließend mittels Festphasenextraktion in Acetonitril / Wasser (70:30, v:v; C8-Chromabond-Säule, 10 000 mg, 70 ml) in Form eines weißen, watteartigen Feststoffs mit einer Ausbeute von 2 mg erhalten. Tabelle 4-1 zeigt die physikochemischen Eigenschaften von Plantazolicin A,  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin A und Plantazolicin B, dem Produkt der Methyltransferase-Mutante.

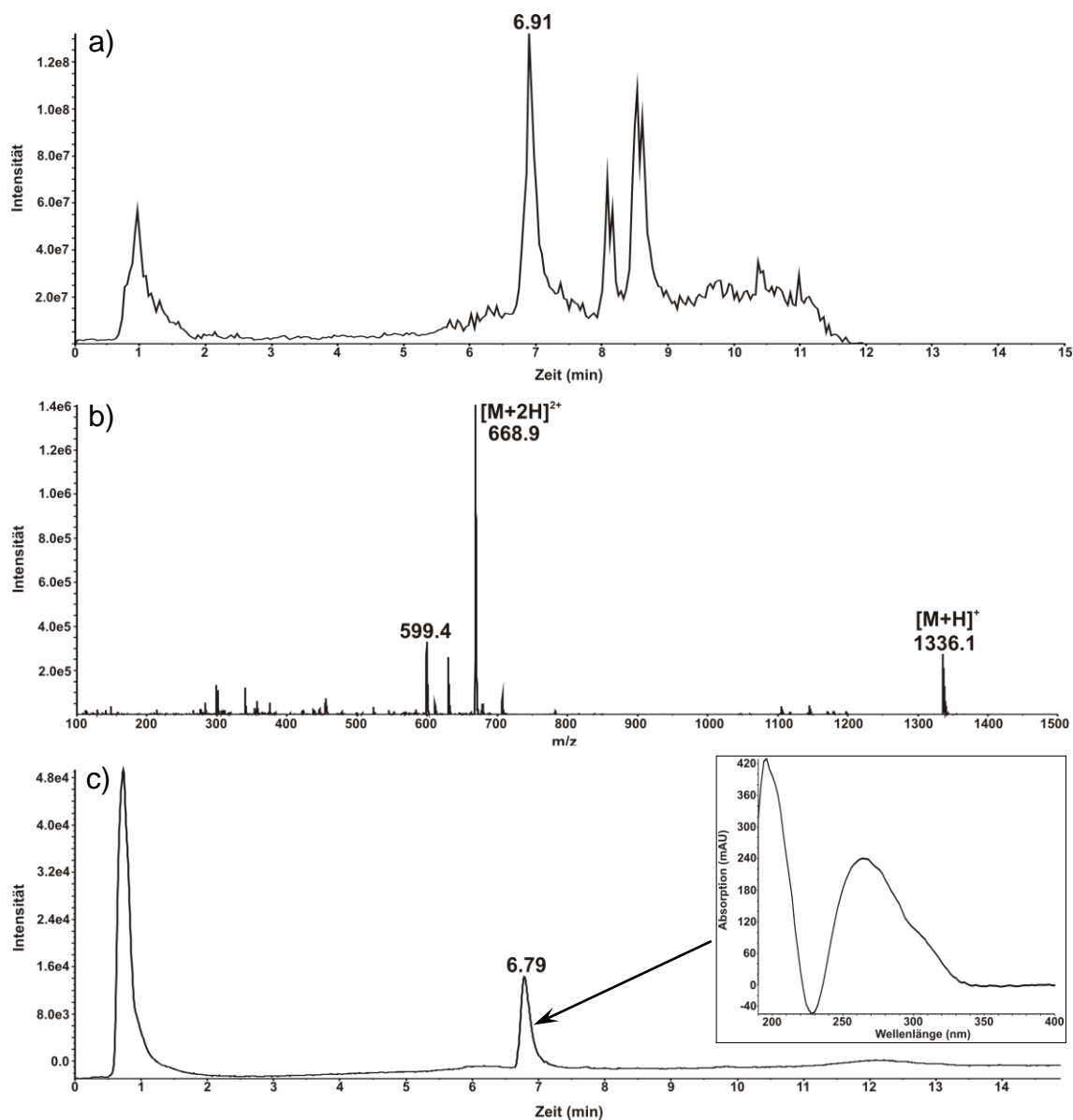
**Tabelle 4-1:** Physikochemische Eigenschaften von Plantazolicin A,  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin und Plantazolicin B; n.b. = nicht bestimmt.

		Plantazolicin A <b>1a</b>	$^{15}\text{N}$ -Plantazolicin A <b>1b</b>	Plantazolicin B <b>2</b>
Aussehen		weißer Feststoff	weißer Feststoff	weißer Feststoff
Molekülmasse (g/mol)		1335.47	1352.42	1307.44
Summenformel		$\text{C}_{63}\text{H}_{69}\text{O}_{13}\text{N}_{17}\text{S}_2$	$\text{C}_{63}\text{H}_{69}\text{O}_{13}^{15}\text{N}_{17}\text{S}_2$	$\text{C}_{61}\text{H}_{65}\text{O}_{13}\text{N}_{17}\text{S}_2$
hochauflösende Orbitrap-ESI- MS [Da]	gemessen	1336.47612 [M+H] <sup>+</sup>	1353.42566 [M+H] <sup>+</sup>	1308.44953 [M+H] <sup>+</sup>
	berechnet	1336.47804, $\Delta m$ -1.027 p.p.m	1353.42709, $\Delta m$ -0.891 p.p.m	1308.44674 $\Delta m$ 2.551 p.p.m
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}}$ [nm]		267	260	n.b.
$[\alpha]_D^{23}$ (c 0.1, ACN/H <sub>2</sub> O)		-1.2	n.b.	n.b.

## 4.3 Strukturaufklärung

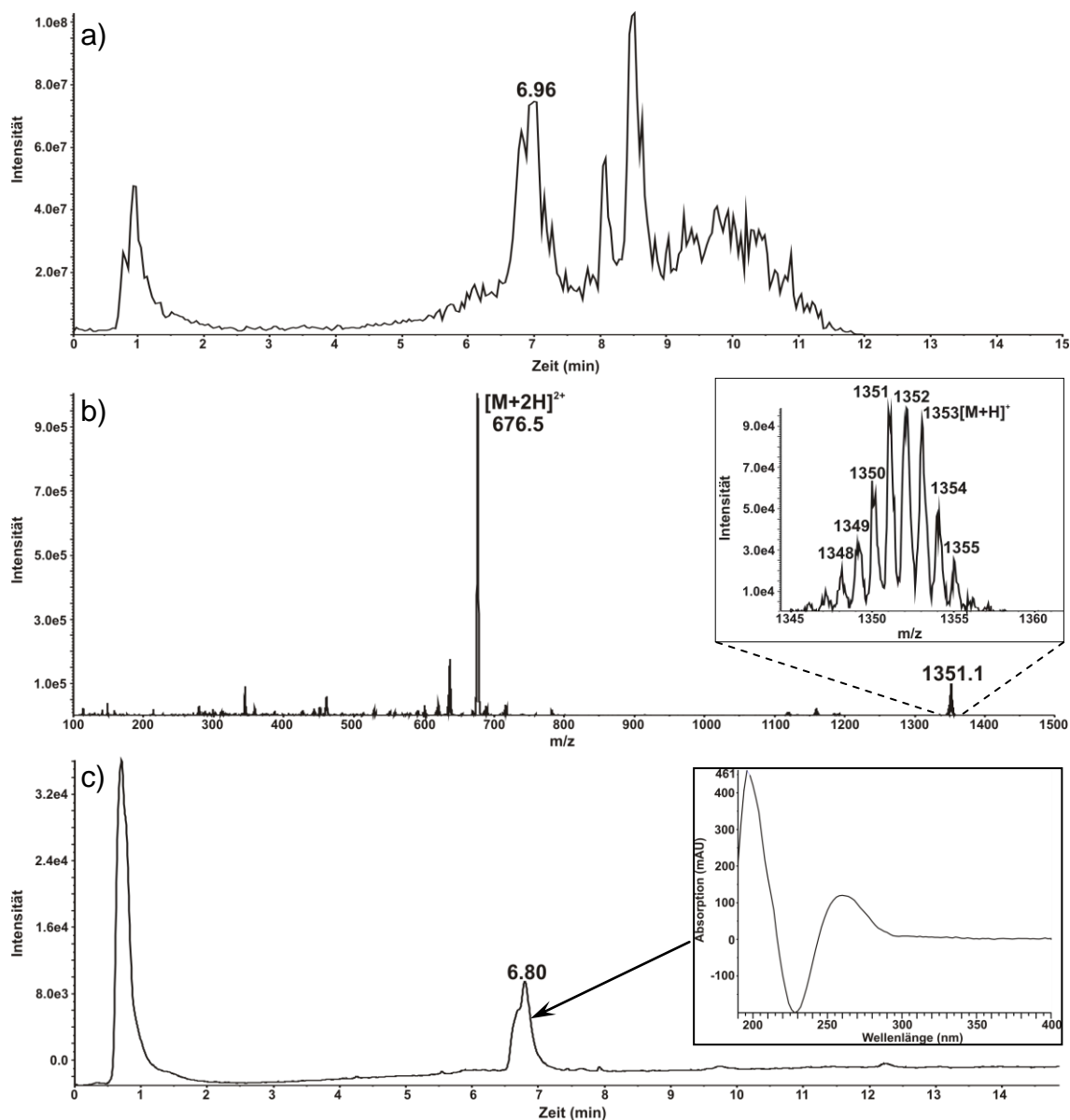
### 4.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Abbildung 4-4a) zeigt das Totalionenchromatogramm (TIC) im Positiv-Ionenmodus von Plantazolicin A gemessen mit einem QTRAP 2000-Massenspektrometer (MDS Sciex/Applied Biosystems, Darmstadt). Plantazolicin A besitzt eine Retentionszeit von  $R_t=6.91$  min. Im entsprechenden Massenspektrum (Abbildung 4-4b)) sind die Molekülionen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bei  $m/z$  1336.1 und  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  bei  $m/z$  668.9 deutlich zu erkennen. In Abbildung 4-4c) ist das DAD-Chromatogramm mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.79$  min dargestellt.



**Abbildung 4-4:** a) Totalionenchromatogramm von Plantazolicin A im Positiv-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.91$  min; c) DAD-Chromatogramm von Plantazolicin A mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.79$  min.

In Abbildung 4-5 sind die massenspektrometrischen Analysen des  $^{15}\text{N}$ -markierten Plantazolicins abgebildet. In Abbildung 4-5a) ist das Totalionenchromatogramm (TIC) im Positiv-Ionenmodus von  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin gezeigt, gemessen mit einem QTRAP 2000-Massenspektrometer (MDS ciex/Applied Biosystems, Darmstadt). Die Retentionszeit von  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin beträgt 6.96 min. Die Molekülionen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bei  $m/z$  1351.1 und  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  bei  $m/z$  676.5 sind im entsprechenden Massenspektrum (Abbildung 4-5b)) deutlich zu erkennen. In Abbildung 4-5c) ist das DAD-Chromatogramm mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.80$  min dargestellt.



**Abbildung 4-5:** a) Totalionenchromatogramm von  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin im Positiv-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.96$  min; c) DAD-Chromatogramm von  $^{15}\text{N}$ -Plantazolicin mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.80$  min.

Die exakte Molekülmasse von Plantazolicin A ( $[\text{M}+\text{H}]^+=1336.47612$  Da) wurde mittels hochauflösender ESI-FT-Orbitrap-Massenspektrometrie ermittelt (berechnet  $1336.47804$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\Delta m$   $-1.027$  ppm) (Tabelle 4-1). Die Berechnung der Summenformel unter Berücksichtigung der Elemente C, H, N, O und S lieferte die Summenformel  $\text{C}_{63}\text{H}_{69}\text{O}_{13}\text{N}_{17}\text{S}_2$ . Mit Hilfe der Information aus der Aminosäuresequenz des Vorläuferpeptids PznA ( $\text{H}_2\text{N-RCTCTTISSSTF-OH}$ ) konnte von folgenden post-translationalen Modifikationen ausgegangen werden: zehn Dehydratisierungen

(-180 Da = 10 x H<sub>2</sub>O), neun Dehydrierungen (-18 Da = 9 x H<sub>2</sub>) und zwei Methylierungen (+28 Da = 2 x CH<sub>2</sub>).

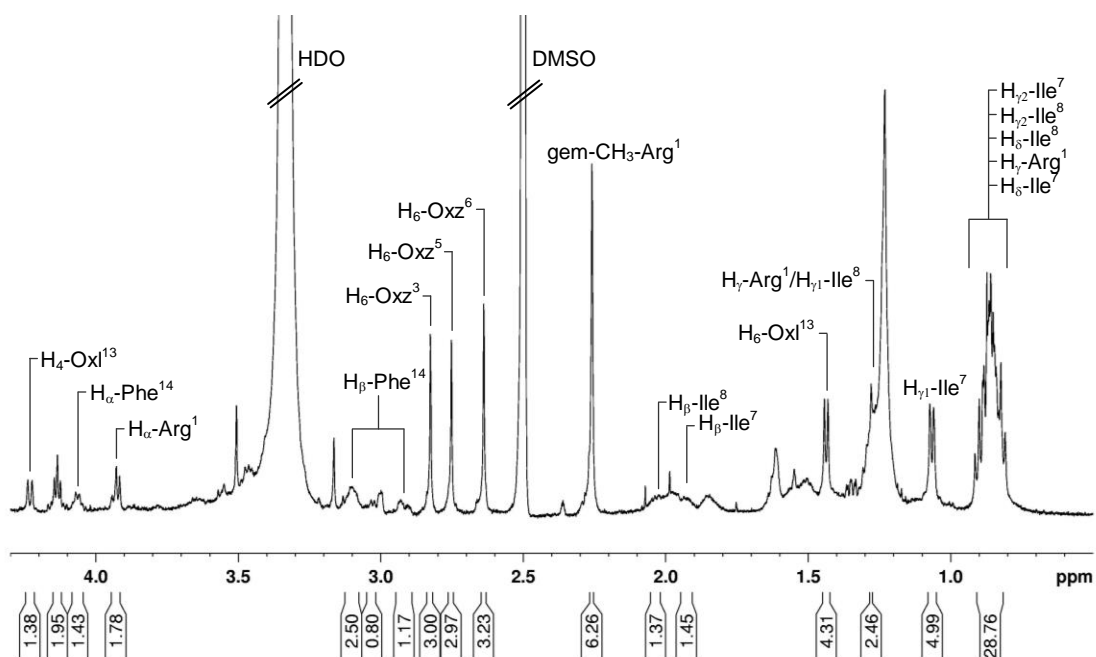
### 4.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die Strukturaufklärung von Plantazolicin mit Hilfe von NMR-Spektroskopie wird in den folgenden Abschnitten am Beispiel von Plantazolicin A detailliert beschrieben. Für alle Messungen wurde DMSO-*d*<sub>6</sub> als Lösungsmittel eingesetzt und die chemischen Verschiebungen der Signale auf die Lösungsmittelpeaks ( $\delta$ H 2.50 ppm,  $\delta$ C 39.51 ppm) referenziert.

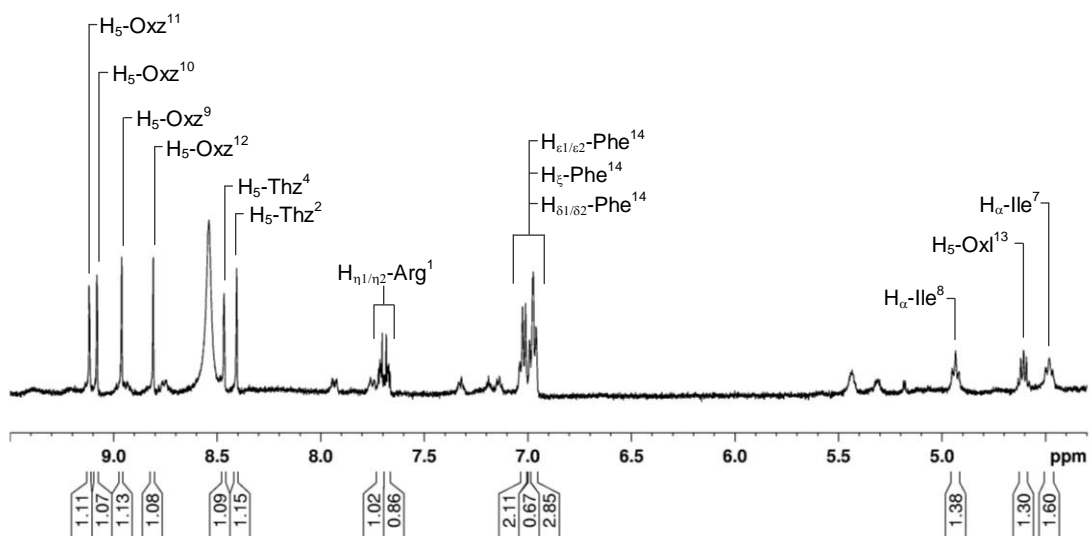
#### 4.3.2.1 Das eindimensionale <sup>1</sup>H-Spektrum von Plantazolicin

In den Abbildungen 4-6 und 4-7 sind die vergrößerten Ausschnitte aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Plantazolicin A (Menge 2 mg) dargestellt. Im aliphatischen Bereich des Spektrums (0.8-2.1 ppm) sind die Signale nicht eindeutig aufgespalten. Auch die Integration der Signale führte zu keiner eindeutigen Aussage. Gut erkennbar sind die zwei Methylgruppen bei 2.26 ppm und die drei unmittelbar nebeneinander auftretenden drei Methylgruppen bei 2.64 ppm, 2.75 ppm und 2.83 ppm. Alle vier Signale sind als Singulets detektierbar. Ebenfalls zu sehen sind ein Pseudoquartett bei 4.06 ppm (dt,  $J = 5.3, 6.9$  Hz) und drei Triplets bei 3.93 ppm ( $J = 7.1$  Hz), 4.48 ppm (pt,  $J = 8.4, 8.7$  Hz) und 4.93 ppm ( $J = 7.8$  Hz). Obwohl die Integration dieser Signale weitaus höher liegt als ein Proton, konnte anhand von 2D-NMR-Experimenten herausgefunden werden, dass es sich bei diesen Signalen um die  $\alpha$ -Protonen der unmodifizierten Aminosäuren Arg<sup>1</sup>, Ile<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup> und Phe<sup>14</sup> handelt. Zusätzlich wurden zwei aliphatische Methingruppen in Form eines Dubletts bei 4.23 ppm ( $J = 7.6$  Hz) und als Multiplett bei 4.61 ppm detektiert. Des Weiteren sind fünf aromatische Protonen auffindbar, von denen zwei als Dublett bei 6.96 ppm ( $J = \text{n.d.}$ ) auftreten, eins als Triplett bei 6.99 ppm ( $J = \text{n.d.}$ ) und zwei weitere als Dublett bei 7.02 ppm ( $J = 7.1$  Hz). Diese fünf Protonen sind auf den Phenylrest des Phenylalanins Phe<sup>14</sup> zurückzuführen. Bei 7.67 ppm und 7.72 ppm sind zwei Multipletts zu beobachten, die von den Protonen H <sub>$\eta$ 1/ $\eta$ 2</sub> des Arginins stammen. Bei den restlichen Signalen handelt

es sich um aromatische Protonen bei 8.41 ppm, 8.46 ppm, 8.81 ppm, 8.96 ppm, 9.08 ppm und 9.11 ppm, die alle ein Singulett aufweisen.



**Abbildung 4-6:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (0.5 – 4.3 ppm) von Plantazolicin A mit Oxz = Oxazol und Oxl = Oxazolin.

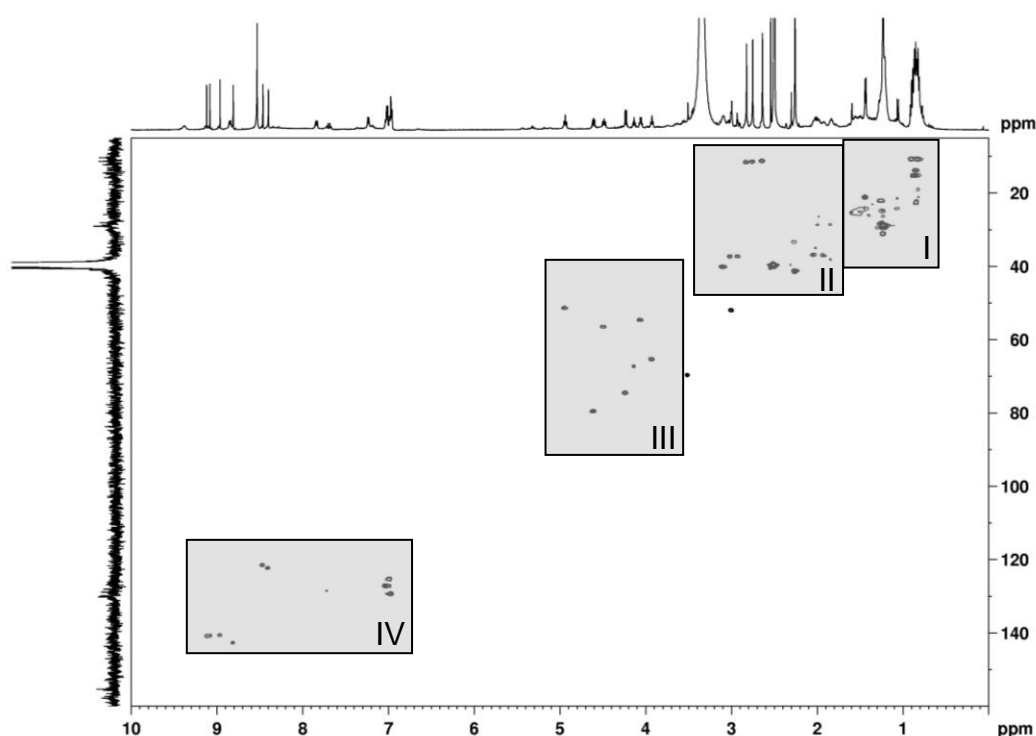


**Abbildung 4-7:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (4.3 – 9.5 ppm) von Plantazolicin A mit Thz = Thiazol.

Die Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von Plantazolicin A war aufgrund der geringen Probenmenge (2 mg) nicht möglich.

#### 4.3.2.2 Das HSQC-Spektrum von Plantazolicin

Die  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Konnektivitäten wurden mit Hilfe des zweidimensionalen heteronuklearen HSQC-NMR-Experiments ermittelt. Das HSQC-Spektrum wurde in vier Bereiche eingeteilt, die im Folgenden vergrößert dargestellt sind und ausführlich diskutiert werden. In Abbildung 4-8 sind die HSQC-Übersichtsspektren gezeigt.

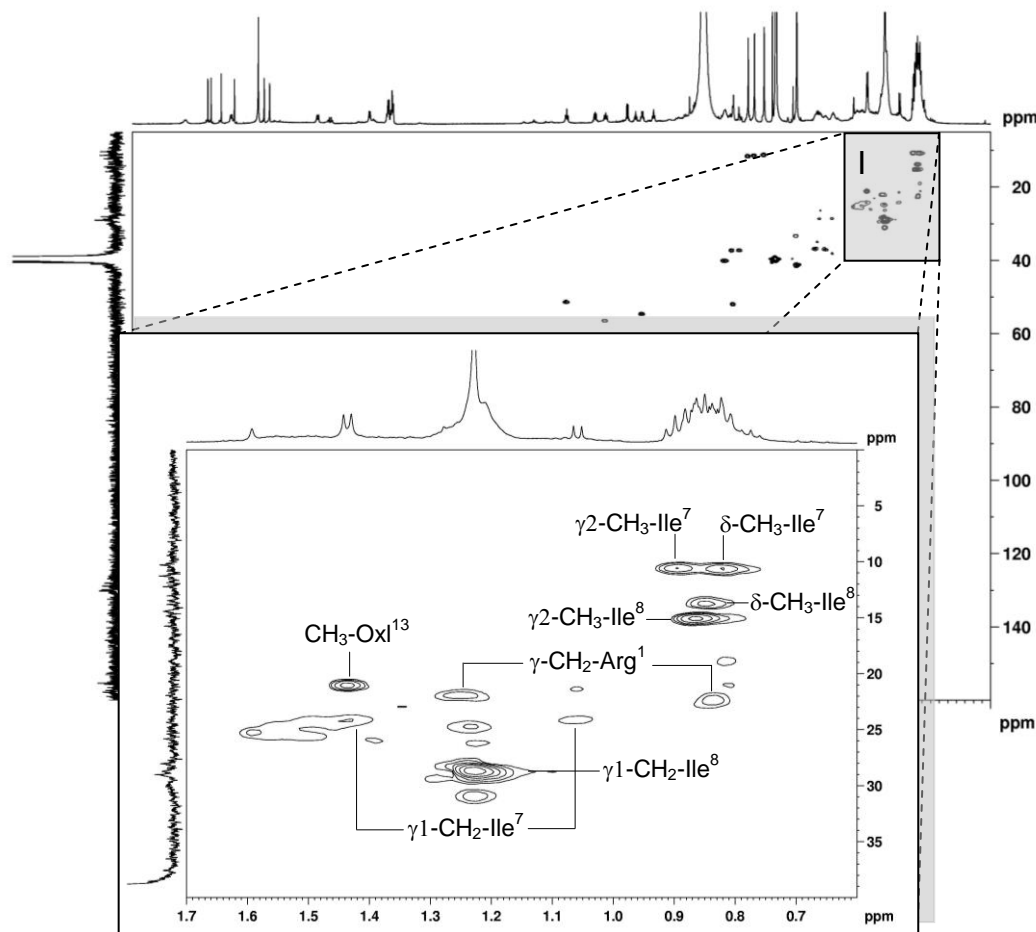


**Abbildung 4-8:** HSQC-Spektrum von Plantazolicin.

In Abbildung 4-9 ist der Bereich I (F1: 0.6 – 1.7 ppm; F2: 0 – 40 ppm) dargestellt, der zehn für das Plantazolicin relevante Kopplungssignale enthält. Die hochfeldverschobenen Kopplungssignale (im Folgenden als  $^1\text{H}$  [ppm] /  $^{13}\text{C}$  [ppm] dargestellt) bei 0.83 ppm / 10.6 ppm, 0.85 ppm / 13.7 ppm, 0.86 ppm / 15.1 ppm und 0.88 ppm / 10.5 ppm konnten den vier Methylgruppen der beiden Isoleucine Ile<sup>7</sup> und Ile<sup>8</sup> zugeordnet werden. Die Signale bei 0.84 & 1.24 ppm / 22.2 ppm, 1.06 & 1.42 ppm / 24.1 ppm und 1.23 ppm / 28.5 ppm beschreiben die Methylengruppen  $\gamma\text{-CH}_2\text{-Arg}^1$ ,



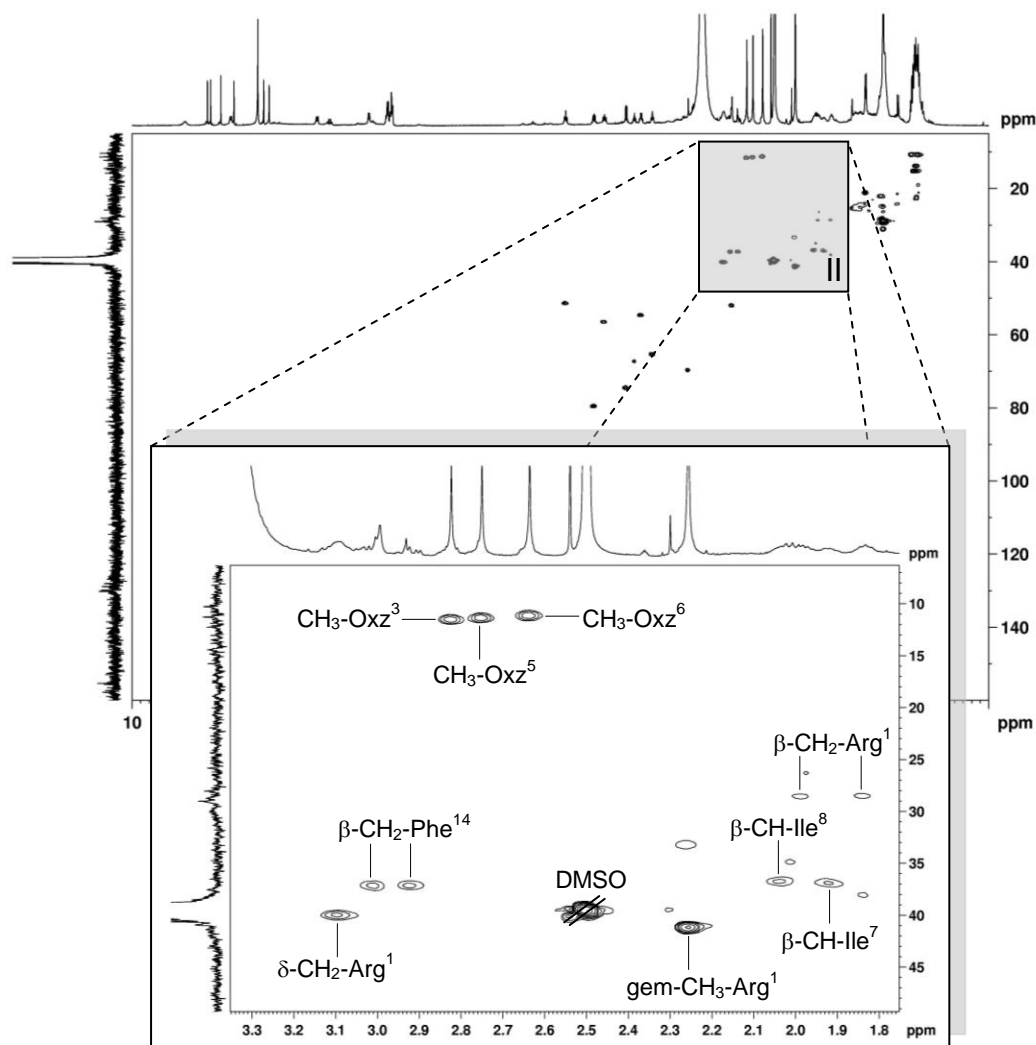
$\gamma$ 1-CH<sub>2</sub>-Ile<sup>7</sup> und  $\gamma$ 1-CH<sub>2</sub>-Ile<sup>8</sup>. Bei 1.44 ppm / 20.9 ppm ist das Kopplungssignal der Methylgruppe des Oxazolins Oxl<sup>13</sup> vorzufinden.



**Abbildung 4-9:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.6 – 1.7 ppm; F2: 0 – 40 ppm).

Der Bereich II (F1: 1.75 – 3.35 ppm; F2: 6 – 49 ppm) wurde in Abbildung 4-10 vergrößert abgebildet. In diesem Bereich sind die  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Konnektivitäten der beiden Methylengruppen an  $\beta$ -Position der beiden Aminosäuren Arginin (Arg<sup>1</sup>) und Phenylalanin (Phe<sup>14</sup>) bei 1.84 & 1.99 ppm / 28.5 ppm und 2.92 & 3.03 ppm / 37.1 ppm zu beobachten. Ebenfalls zu erkennen sind die Kopplungssignale der  $\beta$ -Methingruppen der beiden Aminosäuren Ile<sup>7</sup> und Ile<sup>8</sup> bei 1.93 ppm / 36.7 ppm und 2.04 ppm / 36.6 ppm. Das Kopplungssignal bei 2.26 ppm / 41.1 ppm konnte den beiden geminalen Methylgruppen der Aminosäure *N,N*-diMeArg<sup>1</sup> und das Signal bei 3.09 ppm / 40.0 ppm der Methylengruppe an  $\delta$ -Position der gleichen Aminosäure zugeordnet

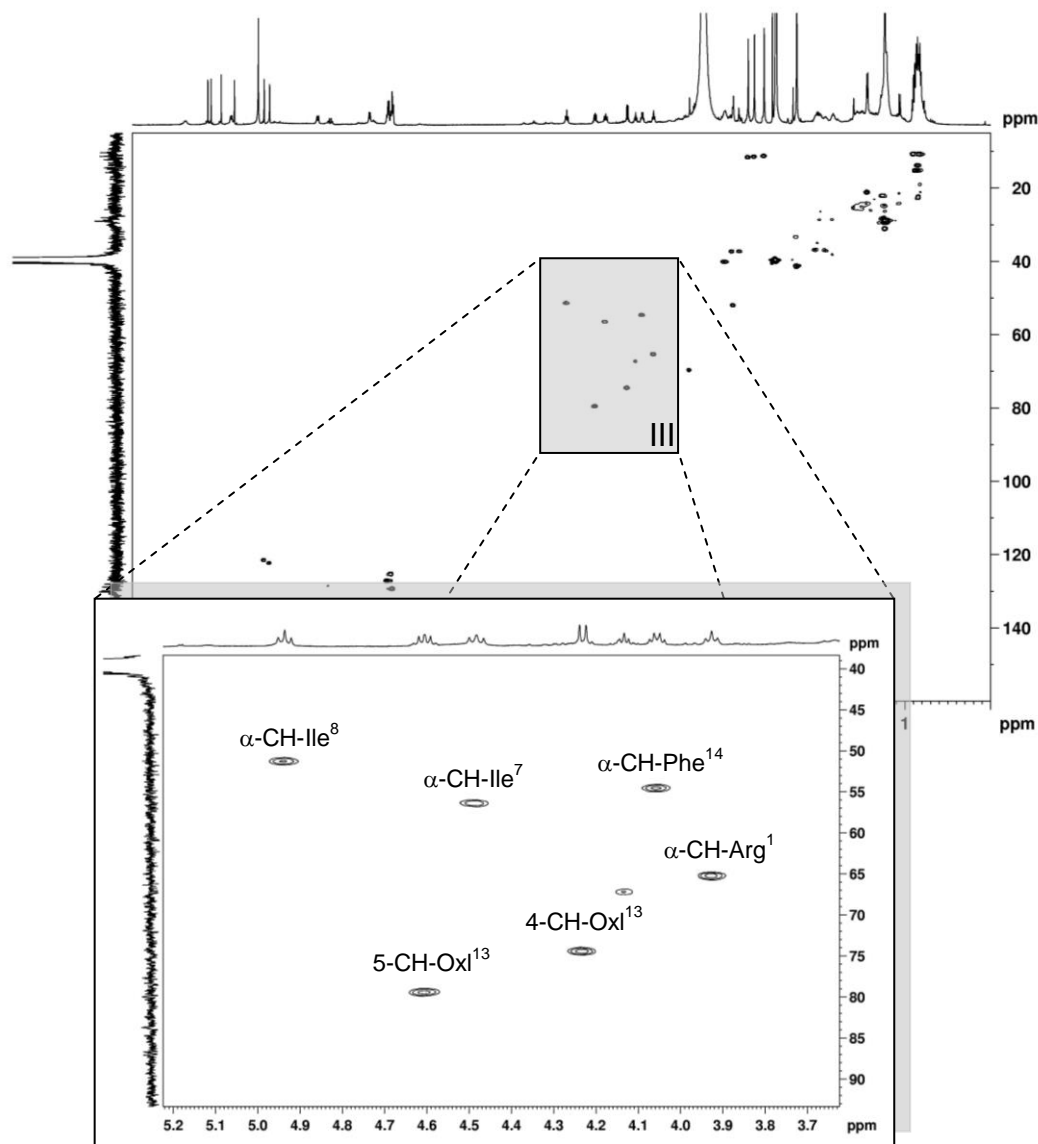
werden. Die dicht nebeneinander auftretenden  $^1J$ -Kopplungen bei 2.83 ppm / 11.4 ppm, 2.75 ppm / 11.3 ppm und 2.64 ppm / 11.0 ppm sind den Methylgruppen  $\text{CH}_3\text{-Oxz}^3$ ,  $\text{CH}_3\text{-Oxz}^5$  und  $\text{CH}_3\text{-Oxz}^6$  zuzuschreiben.



**Abbildung 4-10:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1: 1.75 – 3.35 ppm; F2: 6 – 49 ppm).

Abbildung 4-11 zeigt den vergrößerten Bereich III (F1: 3.6 – 5.2 ppm; F2: 39 – 93 ppm). Hier sind die  $\alpha$ -Protonen der vier unmodifizierten Aminosäuren Arg<sup>1</sup>, Ile<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup> und Phe<sup>14</sup> wiederzufinden. Die Kopplungssignale liegen bei 3.93 ppm / 65.2 ppm für  $\alpha\text{-CH-Arg}^1$ , bei 4.06 ppm / 54.4 ppm für  $\alpha\text{-CH-Phe}^{14}$ , bei 4.48 ppm / 56.4 ppm für  $\alpha\text{-CH-Ile}^7$  und bei 4.93 ppm / 51.2 ppm für  $\alpha\text{-CH-Ile}^8$ . Genauso sind in

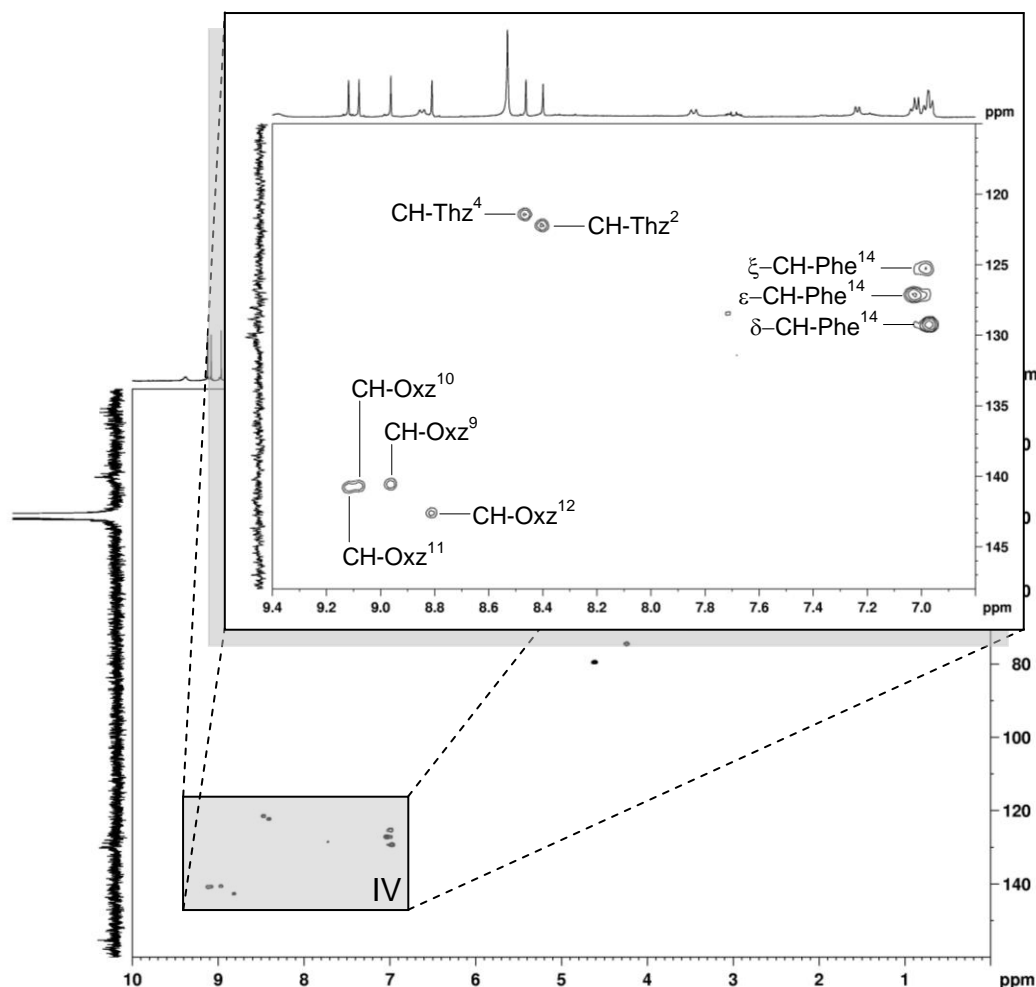
diesem Bereich die  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Konnektivitäten der beiden Methingruppen 4-CH-Oxl<sup>13</sup> und 5-CH-Oxl<sup>13</sup> bei 4.23 ppm / 74.3 ppm und 4.61 ppm / 79.4 ppm zu beobachten.



**Abbildung 4-11:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 3.6 – 5.2 ppm; F2: 39 – 93 ppm).

In Abbildung 4-12 ist der Bereich IV (F1: 6.8 – 9.4 ppm; F2: 115 – 148 ppm) zu sehen. Die Signalgruppe mit den Signalen bei 6.96 ppm / 129.2 ppm, 6.99 ppm / 125.3 ppm und 7.02 ppm / 127.1 ppm gehört zu den aromatischen Methingruppen  $\delta$ -CH-Phe<sup>14</sup>,  $\xi$ -CH-Phe<sup>14</sup> und  $\epsilon$ -CH-Phe<sup>14</sup> des Phenylalanins. Abschließend sind die sechs Kopplungssignale der aromatischen Methingruppen CH-Thz<sup>2</sup>, CH-Thz<sup>4</sup>, CH-Oxz<sup>12</sup>, CH-Oxz<sup>9</sup>, CH-Oxz<sup>10</sup> und CH-Oxz<sup>11</sup> vorzufinden. Die Signale liegen bei

8.41 ppm / 122.2 ppm, 8.47 ppm / 121.5 ppm, 8.81 ppm / 142.5 ppm, 8.96 ppm / 140.6 ppm, 9.08 ppm / 140.6 ppm und 9.11 ppm / 140.8 ppm.



**Abbildung 4-12:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IV (F1: 6.8 – 9.4 ppm; F2: 115 – 148 ppm).

Wenn man die bisher gewonnenen Informationen aus den  $^1\text{H}$ - und HSQC-Spektren zusammenfasst, weist das Plantazolicin zehn Methylgruppen, sechs Methylengruppen und 19 Methingruppen auf. Bildet man die Differenz zu der mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie ermittelten Summenformel ( $\text{C}_{63}\text{H}_{69}\text{O}_{13}\text{N}_{17}\text{S}_2$ ), kann man auf 28 quartäre Kohlenstoffatome schließen.

### 4.3.2.3 Das COSY-Spektrum von Plantazolicin

Die Zuordnung der  $^3J(^1\text{H},^1\text{H})$ -Konnektivitäten geschah mit Hilfe des  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Experiments. In Abbildung 4-13 ist das COSY-Spektrum von Plantazolicin A dargestellt. Das Spektrum wurde in drei Bereiche unterteilt, die in den Abbildungen 4-14 bis 4-16 vergrößert abgebildet sind. Das in Abbildung 4-13 lila gekennzeichnete Kreuzsignal außerhalb der drei Bereiche bei 3.09 ppm / 9.23 ppm beschreibt die Kopplung des Protons der  $\delta$ -ständigen Methylengruppe  $\text{H}_\delta\text{-Arg}^1$  mit dem benachbarten NH-Proton  $\text{H}_\epsilon\text{-Arg}^1$  der Guanidinogruppe.

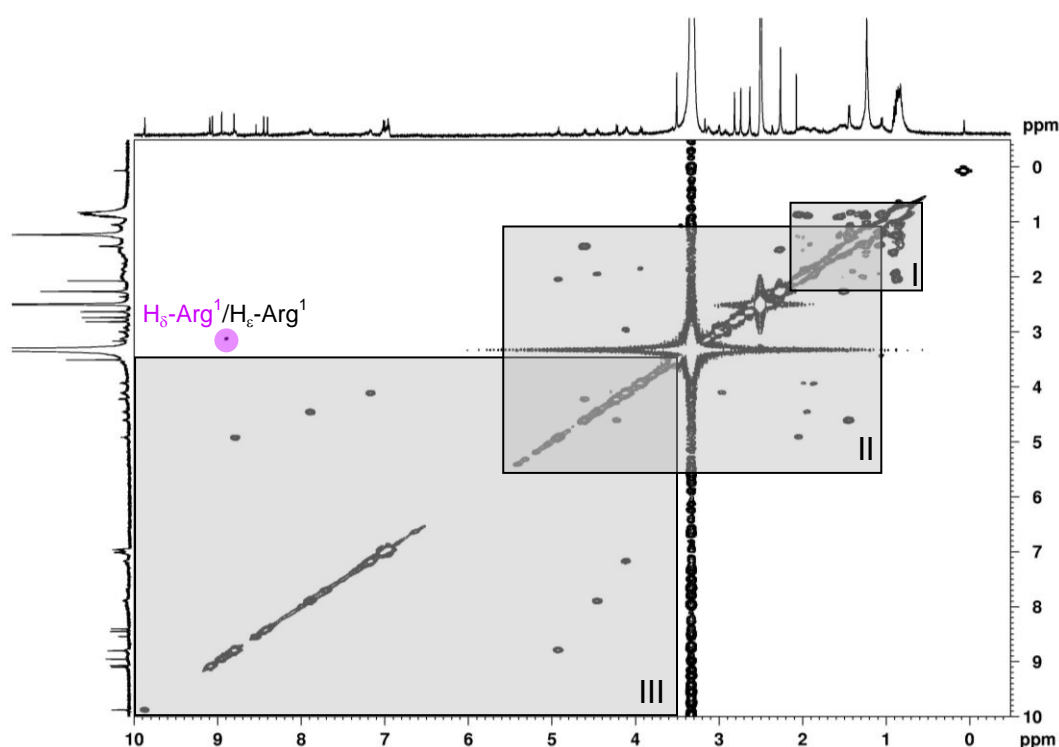
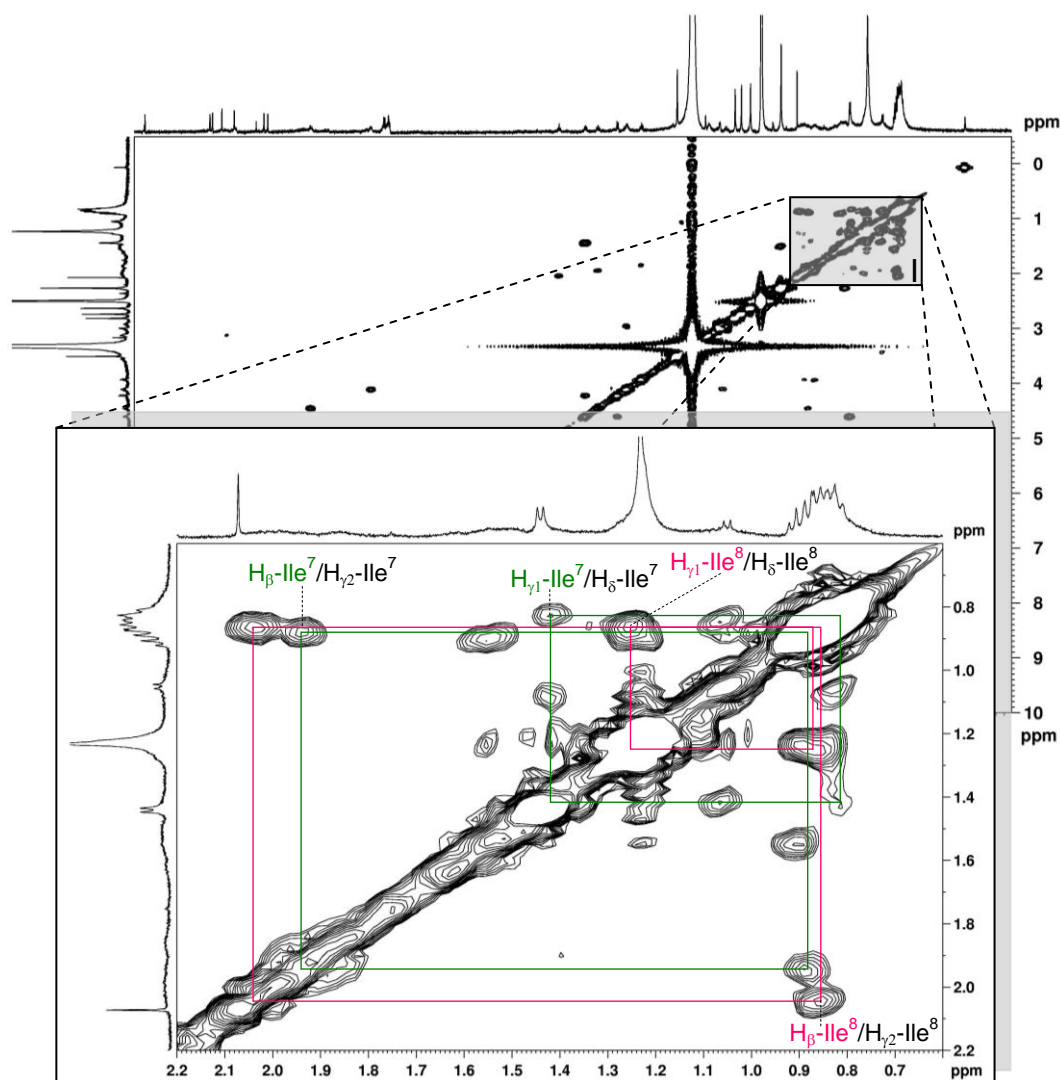


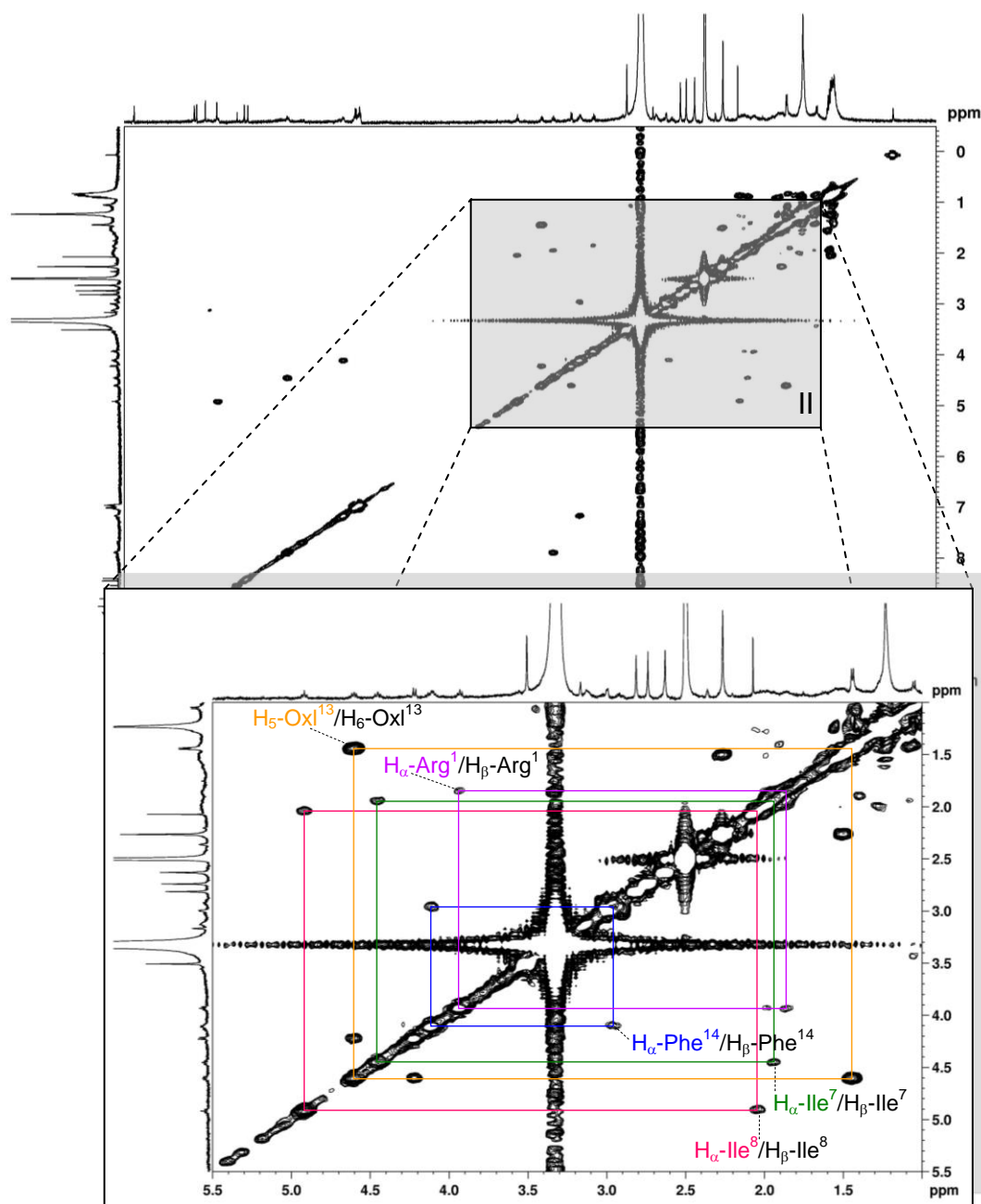
Abbildung 4-13: COSY-Spektrum von Plantazolicin.

Abbildung 4-14 zeigt den vergrößerten Bereich I (F1, F2: 0.6 – 2.2 ppm). Zu sehen ist das Kreuzsignal des Protons der  $\beta$ -Methingruppe  $\text{H}_\beta\text{-Ile}^7$  mit den Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_{\gamma 2}\text{-Ile}^7$  bei 1.93 ppm / 0.88 ppm und das Kreuzsignal der  $\beta$ -Methingruppe  $\text{H}_\beta\text{-Ile}^8$  mit den Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_{\gamma 2}\text{-Ile}^8$  bei 2.04 ppm / 0.86 ppm. Außerdem zeigen die Protonen der Methylengruppe  $\text{H}_{\gamma 1}\text{-Ile}^7$  eine Kopplung mit den Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_\delta\text{-Ile}^7$  bei 1.42 ppm / 0.83 ppm und die Protonen der Methylengruppe  $\text{H}_{\gamma 1}\text{-Ile}^8$  eine Kopplung mit den Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_\delta\text{-Ile}^8$  bei 1.23 ppm / 0.85 ppm.



**Abbildung 4-14:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1, F2: 0.6 – 2.2 ppm). Aus Übersichtsgründen wurde der Zoomfaktor des Ausschnittes bei der Darstellung halbiert.

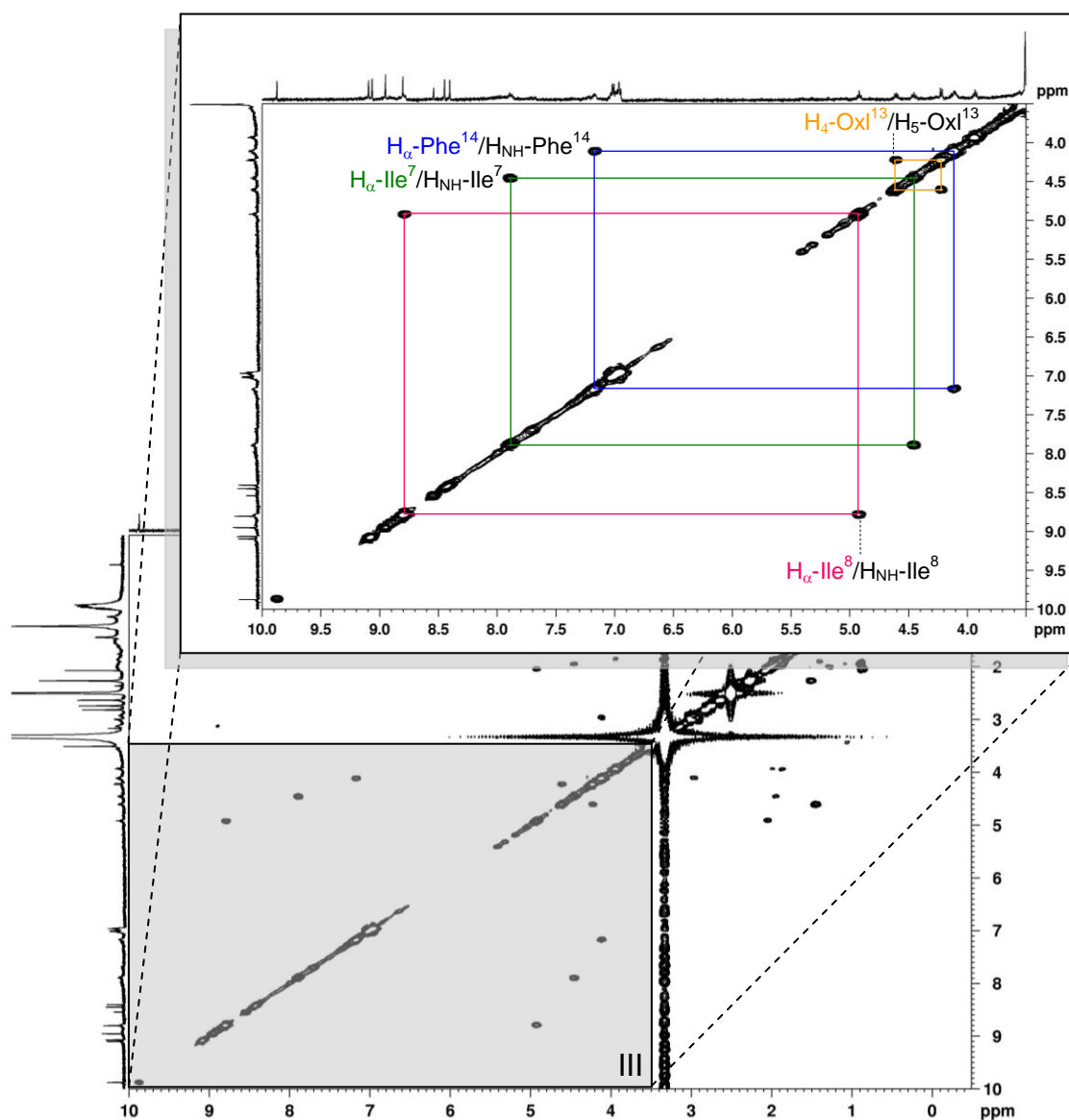
In Abbildung 4-15 ist der Bereich II (F1, F2: 1.0 – 5.5 ppm) abgebildet. Dieser Bereich beinhaltet die  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ -Kopplungen der  $\alpha$ -Protonen  $\text{H}_\alpha\text{-Arg}^1$ ,  $\text{H}_\alpha\text{-Ile}^7$ ,  $\text{H}_\alpha\text{-Ile}^8$  und  $\text{H}_\alpha\text{-Phe}^{14}$  mit den benachbarten  $\beta$ -Protonen bei 4.94 ppm / 2.04 ppm, 4.49 ppm / 1.92 ppm, 4.06 ppm / 2.92 & 3.01 ppm und 3.93 ppm / 1.84 ppm. Bei den beiden Kopplungspartnern  $\text{H}_\beta\text{-Arg}^1$  und  $\text{H}_\beta\text{-Phe}^{14}$  handelt es sich um Methylengruppen und bei  $\text{H}_\beta\text{-Ile}^7$  und  $\text{H}_\beta\text{-Ile}^8$  um Methingruppen. Des Weiteren ist das Kreuzsignal für die Kopplung der Methingruppe  $\text{H}_5\text{-Oxl}^{13}$  mit der direkt benachbarten Methylgruppe  $\text{H}_6\text{-Oxl}^{13}$  aufzufinden. Das Signal liegt bei 4.61 ppm / 1.44 ppm.



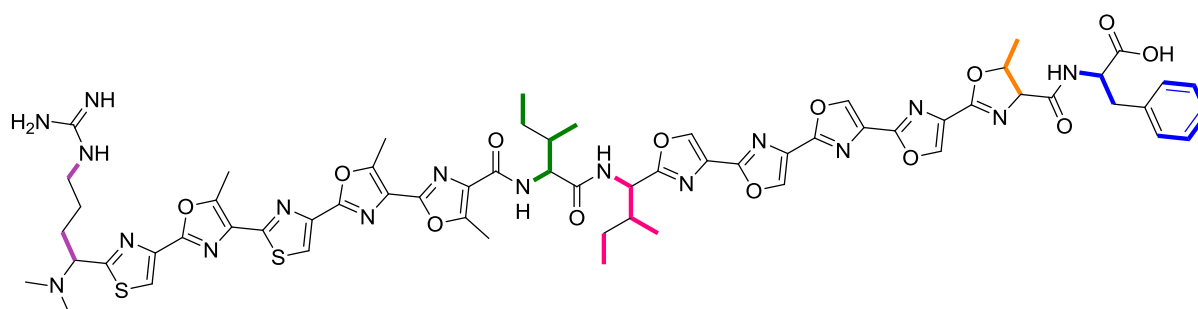
**Abbildung 4-15:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1, F2: 1.0 – 5.5 ppm).

In dem Bereich III (F1, F2: 3.5 – 10.0 ppm) wurden die Kreuzsignale der  $\alpha$ -Protonen  $H_\alpha\text{-Ile}^7$ ,  $H_\alpha\text{-Ile}^8$  und  $H_\alpha\text{-Phe}^{14}$  mit den benachbarten NH-Protonen bei 4.93 ppm / 8.78 ppm, 4.48 ppm / 7.89 ppm und 4.06 ppm / 7.23 ppm detektiert (Abbildung 4-16). Als Letztes ist das Kreuzsignal bei 4.23 ppm / 4.61 ppm, hervorgerufen durch die Protonen der beiden Methingruppen  $H_4\text{-OxI}^{13}$  und  $H_5\text{-OxI}^{13}$ , zu beobachten. In Abbil-

Abbildung 4-17 sind die beobachteten COSY-Kopplungen, entsprechend der in den Abbildungen 4-13 bis 4-16 gekennzeichneten Farben, in der Strukturformel eingezeichnet.



**Abbildung 4-16:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1, F2: 3.5 – 10.0 ppm).

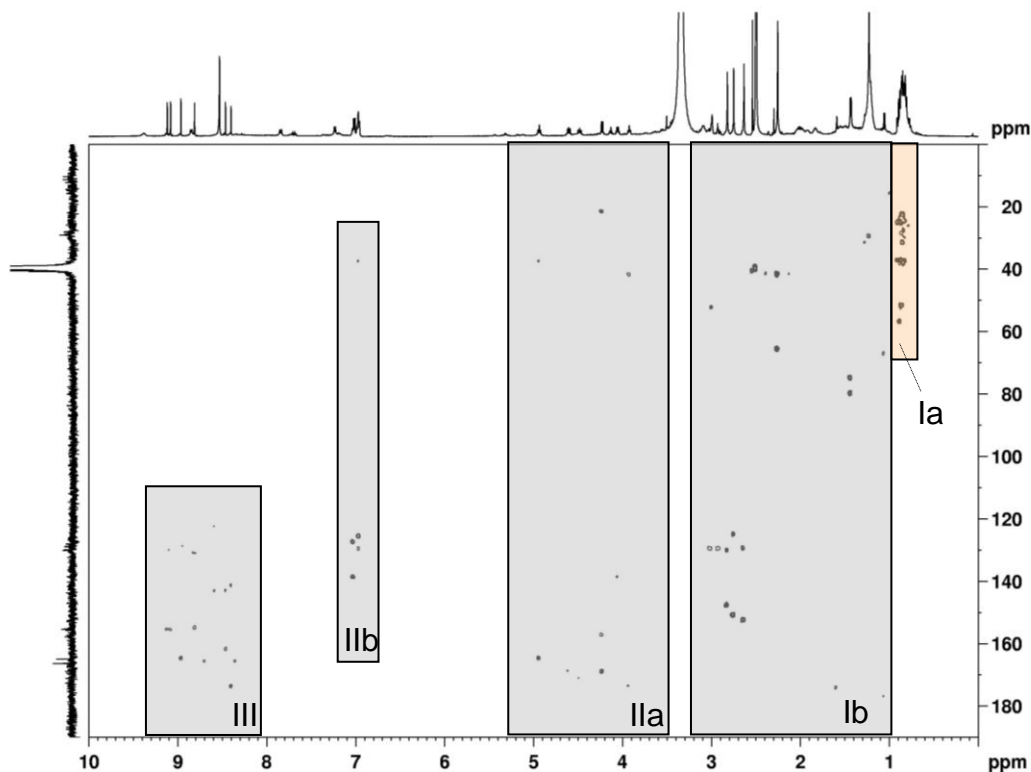


**Abbildung 4-17:** Farblich eingezeichnete  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ -COSY-Kopplungen von Plantazolicin A.



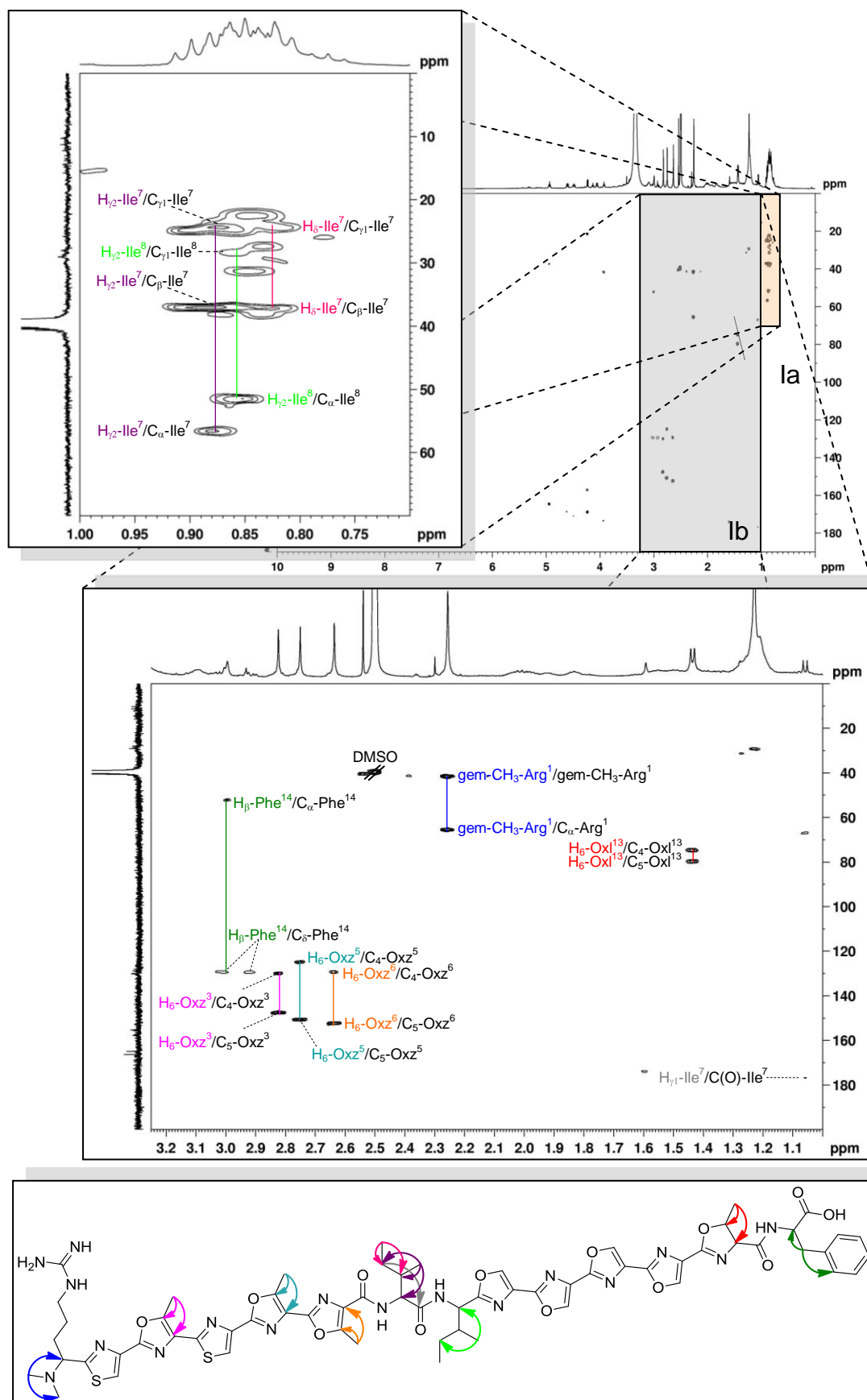
#### 4.3.2.4 Das HMBC-Spektrum von Plantazolicin

In diesem Abschnitt werden die *long range*- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen aus dem HMBC-Experiment besprochen. Das HMBC-Spektrum wurde in fünf Bereiche eingeteilt (Abbildung 4-18), die im Weiteren näher betrachtet werden.



**Abbildung 4-18:** Das HMBC-Spektrum von Plantazolicin.

In Abbildung 4-19 sind die Bereiche Ia (F1: 0.7 – 1.0 ppm; F2: 0 – 70 ppm) und Ib (F1: 1.0 – 3.3 ppm; F2: 0 – 200 ppm) dargestellt. Im Bereich Ia befinden sich die  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen der Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_{\gamma 2}\text{-Ile}^7$  zu den Kohlenstoffatomen  $\text{C}_{\alpha}\text{-Ile}^7$  und  $\text{C}_{\gamma 1}\text{-Ile}^7$  und der Protonen der Methylgruppe  $\text{H}_{\gamma 2}\text{-Ile}^8$  zu  $\text{C}_{\alpha}\text{-Ile}^8$  und  $\text{C}_{\gamma 1}\text{-Ile}^8$ . Auch ist die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung von  $\text{H}_{\gamma 2}\text{-Ile}^7$  zu dem Kohlenstoffatom der Methingruppe  $\text{C}_{\beta}\text{-Ile}^7$  vorzufinden.

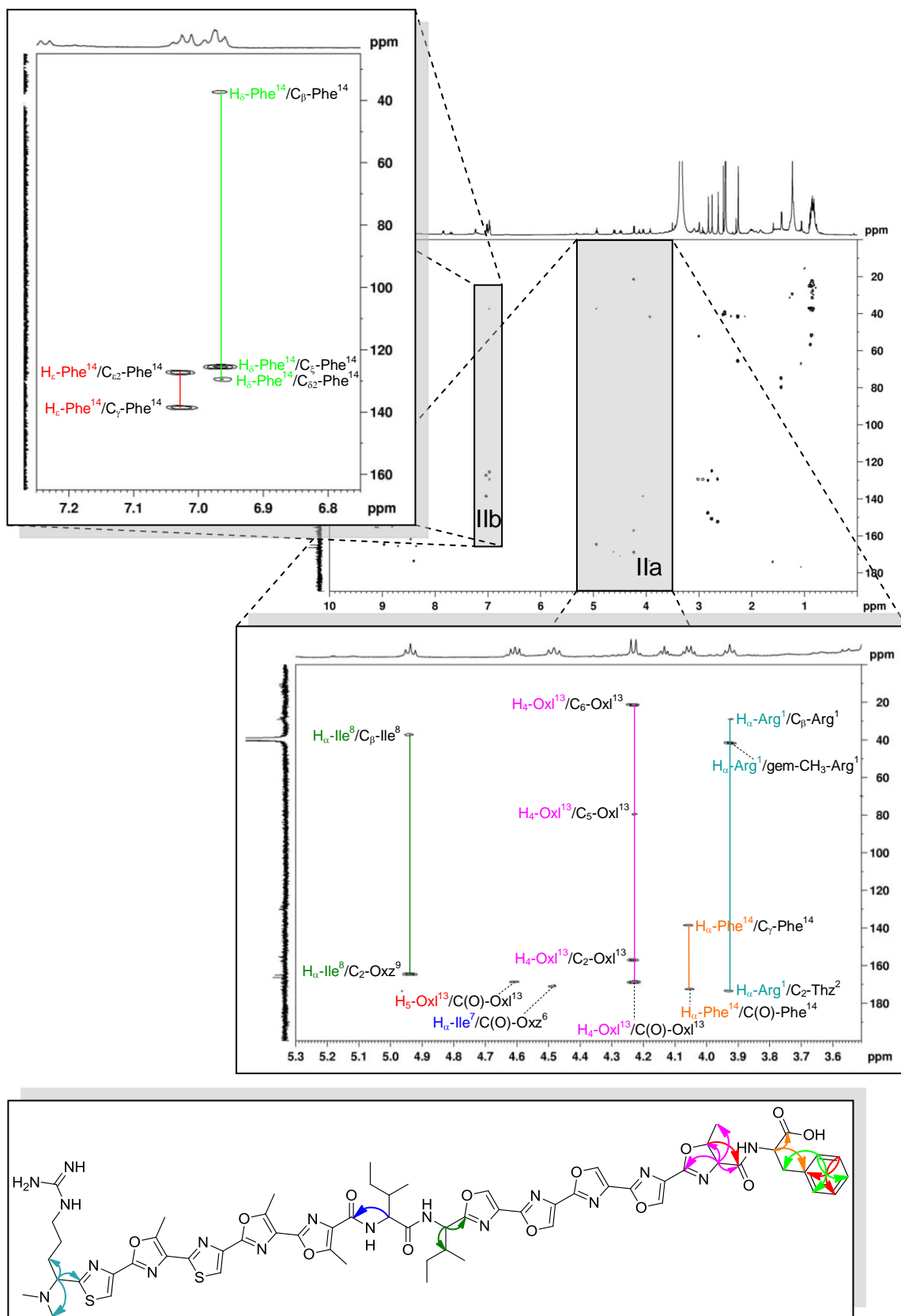


**Abbildung 4-19:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich la (F1: 0.7 – 1.0 ppm; F2: 0 – 70 ppm), Bereich lb (F1: 1.0 – 3.3 ppm; F2: 0 – 200 ppm).

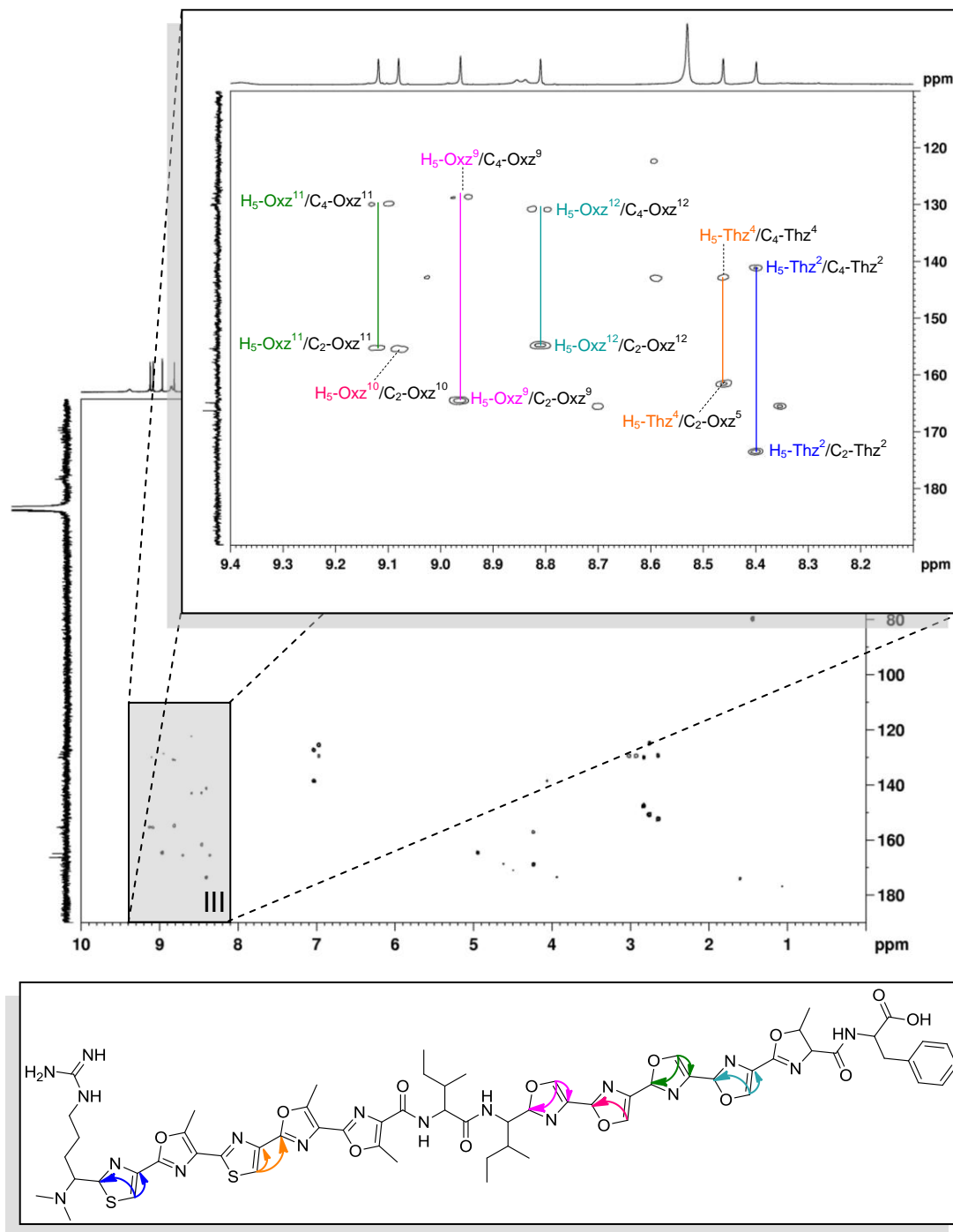
Die Protonen der Methylgruppe  $H_{\delta}$ -Ile<sup>7</sup> koppeln zu  $C_{\beta}$ -Ile<sup>7</sup> und  $C_{\gamma_1}$ -Ile<sup>7</sup>. Die chemische Verschiebung des quartären Kohlenstoffatoms der Carbonylgruppe  $C(O)$ -Ile<sup>7</sup> (176.9 ppm) konnte, wie im Bereich Ib gezeigt wird, anhand der  $^4J(^1H, ^{13}C)$ -Kopplung der Methylenprotonen  $H_{\gamma_1}$ -Ile<sup>7</sup> bei 1.06 ppm zu 176.9 ppm ermittelt werden. Darüber hinaus sind die  $^2J(^1H, ^{13}C)$ -Kopplungen und  $^3J(^1H, ^{13}C)$ -Kopplungen der Methylgruppen der 5-Methyloxazole Oxz<sup>3</sup>, Oxz<sup>5</sup>, Oxz<sup>6</sup> und des 5-Methyloxazolins Oxl<sup>13</sup> zu beobachten. Demnach zeigen die Protonen der Methylgruppe  $H_6$ -Oxz<sup>3</sup> Kopplungen zu  $C_4$ -Oxz<sup>3</sup> und  $C_5$ -Oxz<sup>3</sup>,  $H_6$ -Oxz<sup>5</sup> zu  $C_4$ -Oxz<sup>5</sup> und  $C_5$ -Oxz<sup>5</sup>,  $H_6$ -Oxz<sup>6</sup> zu  $C_4$ -Oxz<sup>6</sup> und  $C_5$ -Oxz<sup>6</sup> bzw.  $H_6$ -Oxl<sup>13</sup> zu  $C_4$ -Oxl<sup>13</sup> und  $C_5$ -Oxz<sup>13</sup>. Die Protonen der  $\beta$ -Methylengruppe  $H_{\beta}$ -Phe<sup>14</sup> koppeln mit den tertiären Kohlenstoffatomen  $C_{\alpha}$ -Phe<sup>14</sup> und  $C_{\delta}$ -Phe<sup>14</sup>. Abschließend wurden die  $^3J(^1H, ^{13}C)$ -Kopplungen der geminalen Methylgruppe untereinander und zum tertiären  $C_{\alpha}$ -Arg<sup>1</sup> detektiert.

In Abbildung 4-20 sind die Ausschnitte IIa (F1: 3.5 – 5.3 ppm; F2: 10 – 190 ppm) und IIb (F1: 6.75 – 7.25 ppm; F2: 25 – 165 ppm) des HMBC-Spektrums von Plantazolicin A gezeigt. In Bereich IIa sind die Kopplungen der  $\alpha$ -Protonen der Aminosäuren Arg<sup>1</sup>, Ile<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup> und Phe<sup>14</sup> vorzufinden.  $H_{\alpha}$ -Arg<sup>1</sup> weist Kopplungen zu  $C_{\beta}$ -Arg<sup>1</sup>, gem-CH<sub>3</sub>-Arg<sup>1</sup> und  $C_2$ -Thz<sup>2</sup> auf,  $H_{\alpha}$ -Ile<sup>7</sup> zu  $C(O)$ -Oxz<sup>6</sup>,  $H_{\alpha}$ -Ile<sup>8</sup> zu  $C_{\beta}$ -Ile<sup>8</sup> und  $C_2$ -Oxz<sup>9</sup> und  $H_{\alpha}$ -Phe<sup>14</sup> zu  $C_{\gamma}$ -Phe<sup>14</sup> und  $C(O)$ -Phe<sup>14</sup>. Auch wurden die Kopplungen von dem Proton der Methingruppe  $H_4$ -Oxl<sup>13</sup> zu  $C_2$ -Oxl<sup>13</sup>,  $C_5$ -Oxl<sup>13</sup>,  $C_6$ -Oxl<sup>13</sup> und  $C(O)$ -Oxl<sup>13</sup> und von  $H_5$ -Oxl<sup>13</sup> zu  $C(O)$ -Oxl<sup>13</sup> beobachtet. In Bereich IIb sind die Kopplungen der aromatischen Protonen innerhalb des Phenylrests des Phenylalanins zu sehen. Die beiden chemisch äquivalenten Protonen an den ortho-Positionen des Aromaten  $H_{\delta_1/\delta_2}$ -Phe<sup>14</sup> zeigen  $^3J(^1H, ^{13}C)$ -Kopplungen untereinander und zu den Kohlenstoffatomen  $C_{\beta}$ -Phe<sup>14</sup> und  $C_{\xi}$ -Phe<sup>14</sup> und die beiden chemisch äquivalenten Protonen an den meta-Positionen  $H_{\epsilon_1/\epsilon_2}$ -Phe<sup>14</sup> ebenfalls untereinander und zu dem Kohlenstoffatom  $C_{\gamma}$ -Phe<sup>14</sup> in ipso-Stellung des Aromaten.

Der Bereich III (F1: 8.1 – 9.4 ppm; F2: 110 – 190 ppm) ist in Abbildung 4-21 vergrößert dargestellt. Hier sind die Kopplungen der Protonen der Thiazole Thz<sup>2</sup> und Thz<sup>4</sup> und der Oxazole Oxz<sup>9</sup>, Oxz<sup>10</sup>, Oxz<sup>11</sup> und Oxz<sup>12</sup> zu den quartären Kohlenstoffatomen der Heterozyklen wiederzufinden. Das Proton  $H_5$ -Thz<sup>2</sup> koppelt zu  $C_2$ -Thz<sup>2</sup> und  $C_4$ -Thz<sup>2</sup>, Proton  $H_5$ -Thz<sup>4</sup> zu  $C_2$ -Oxz<sup>5</sup> und  $C_4$ -Thz<sup>4</sup>, Proton  $H_5$ -Oxz<sup>9</sup> zu  $C_2$ -Oxz<sup>9</sup> und  $C_4$ -Oxz<sup>9</sup>, Proton  $H_5$ -Oxz<sup>10</sup> zu  $C_2$ -Oxz<sup>10</sup>, Proton  $H_5$ -Oxz<sup>11</sup> zu  $C_2$ -Oxz<sup>11</sup> und  $C_4$ -Oxz<sup>11</sup> bzw. Proton  $H_5$ -Oxz<sup>12</sup> zu  $C_2$ -Oxz<sup>12</sup> und  $C_4$ -Oxz<sup>12</sup>.



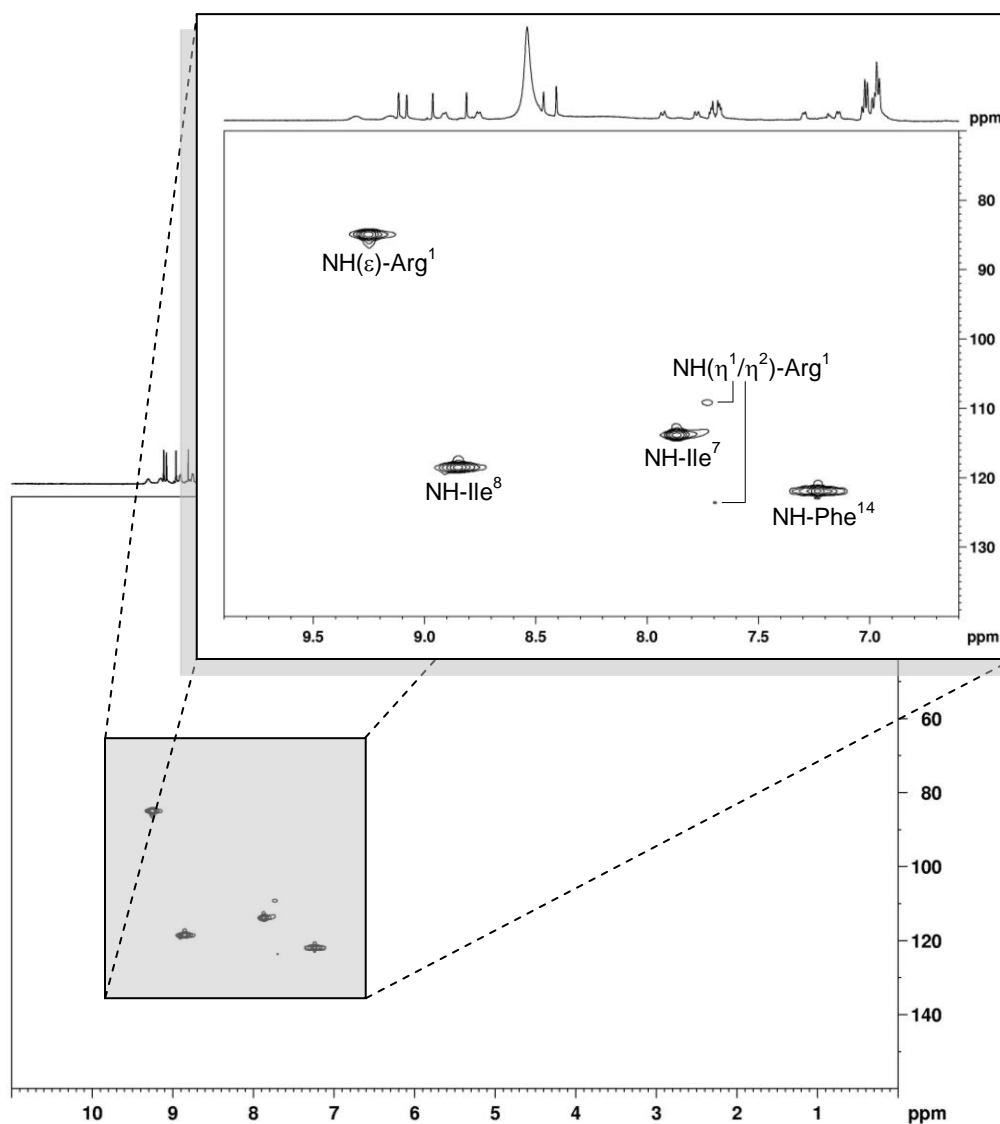
**Abbildung 4-20:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IIa (F1: 3.5 – 5.3 ppm; F2: 10 – 190 ppm), Bereich IIb (F1: 6.75 – 7.25 ppm; F2: 25 – 165 ppm).



**Abbildung 4-21:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 8.1 – 9.4 ppm; F2: 110 – 190 ppm).

#### 4.3.2.5 Das $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-NMR-Spektrum von Plantazolicin

Aufgrund der geringen Anzahl an Protonen im Plantazolicin war es nicht möglich, die bereits anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagte Struktur allein mit Hilfe der  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Experimente zu bestätigen. Für die vollständige Strukturaufklärung des Moleküls war es erforderlich,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Experimente durchzuführen. Abbildung 4-22 zeigt das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-Spektrum von Plantazolicin A, in dem sechs Signale detektiert wurden.

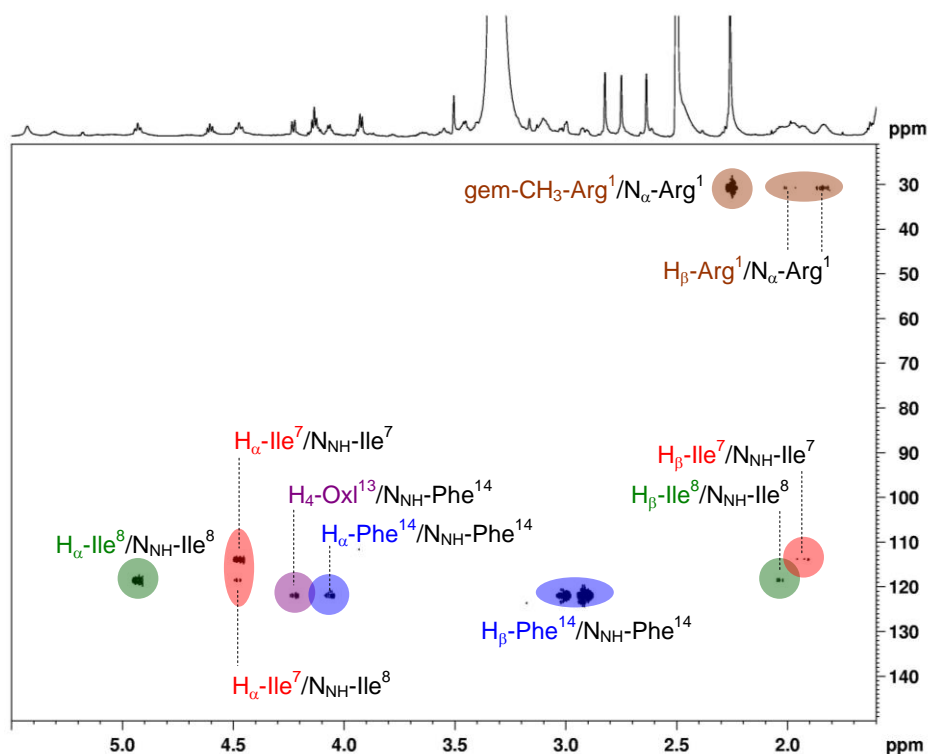


**Abbildung 4-22:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A und Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 6.6 – 9.9 ppm; F2: 70 – 140 ppm).

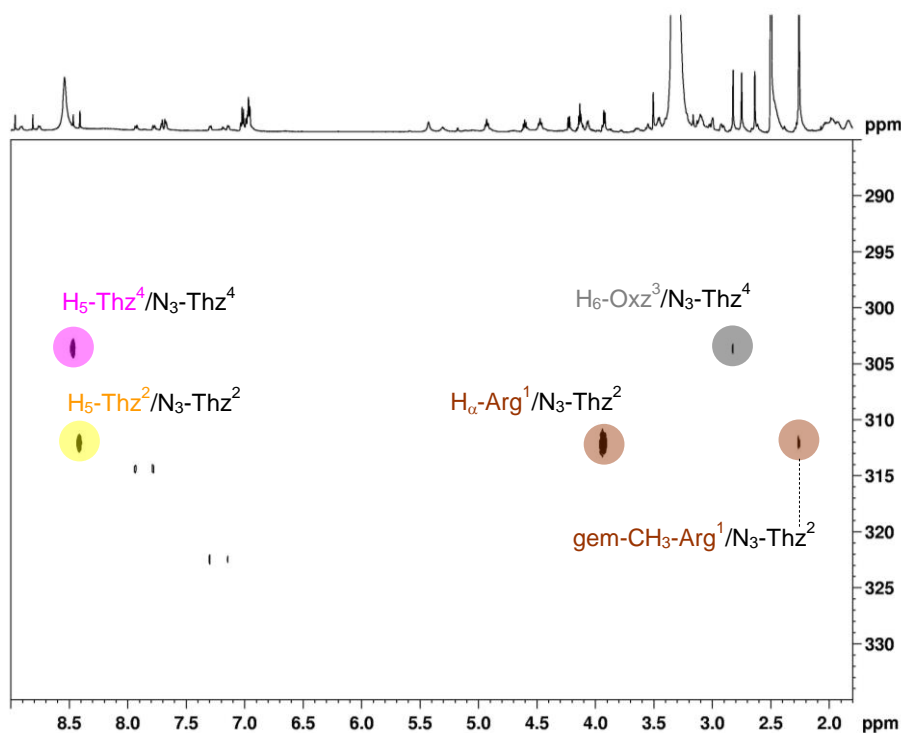
Deutlich erkennbar sind die Signale der NH-Gruppen NH-Phe<sup>14</sup> bei 7.23 ppm / 122.0 ppm, NH-Ile<sup>7</sup> bei 7.89 ppm / 113.9 ppm, NH-Ile<sup>8</sup> bei 8.78 ppm / 118.6 ppm und NH( $\epsilon$ )-Arg<sup>1</sup> bei 9.23 ppm / 84.9 ppm. Die schwachen Signale bei 7.68 ppm / 123.6 ppm und 7.71 ppm / 109.2 ppm sind auf die NH- bzw. NH<sub>2</sub>-Gruppe der Guanidinogruppe NH( $\eta^1/\eta^2$ )-Arg<sup>1</sup> zurückzuführen.

#### 4.3.2.6 Das <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin

Das <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Experiment lieferte die entscheidenden Informationen für die vollständige Strukturaufklärung des Plantazolicins. Ausschließlich dieses Experiment trug dazu bei, die Verknüpfung der Heterozyklen in dem Peptid bestimmen zu können. In Abbildung 4-23 und 4-24 sind die am 600-MHz-NMR-Spektrometer aufgenommenen <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektren und in Abbildung 4-25 das am 900-MHz-NMR-Spektrometer aufgenommene <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektrum dargestellt.



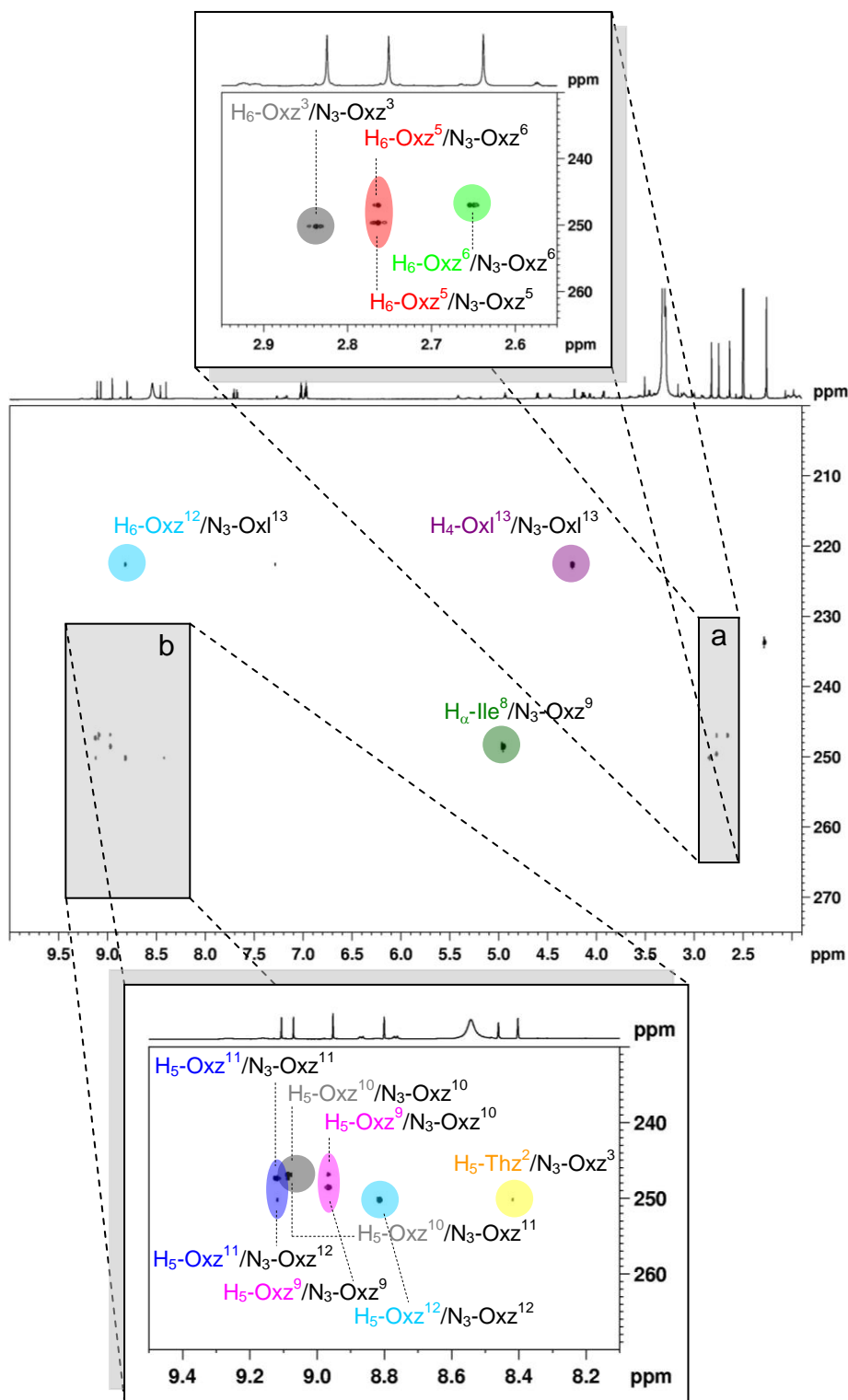
**Abbildung 4-23:** <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für <sup>15</sup>N liegt bei 100 ppm).



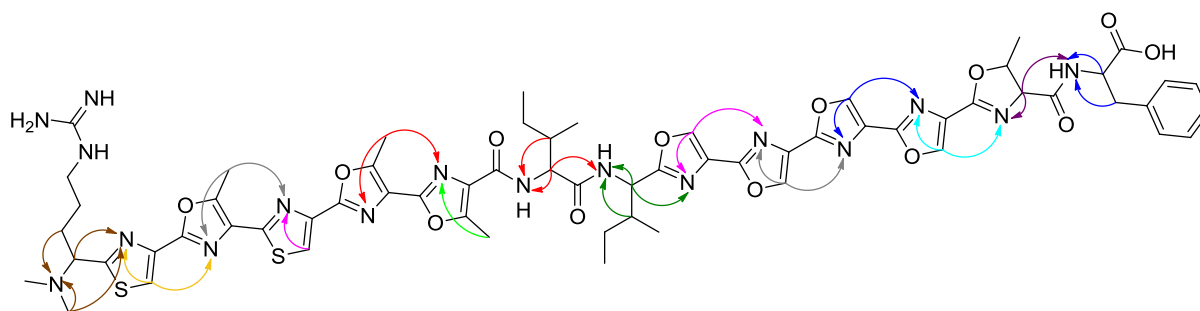
**Abbildung 4-24:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 300 ppm).

Die geminalen Methylgruppen von  $N,N$ -diMeArg<sup>1</sup> zeigen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Kopplungen zu  $\text{N}-\alpha$  ( $\delta\text{N}$  84.9 ppm) von Arg<sup>1</sup> und zu  $\text{N}-3$  ( $\delta\text{N}$  312.1 ppm) von Thz<sup>2</sup> (Abbildung 4-26). Auch zeigen die Protonen der  $\beta$ -Methylengruppe des Arginins eine Kopplung zu  $\text{N}_\alpha$ -Arg<sup>1</sup> und die  $\alpha$ -Methingruppe eine Kopplung zu  $\text{N}_3$ -Thz<sup>2</sup>. Die Kopplung von  $\text{H}_5$ -Thz<sup>2</sup> zu  $\text{N}-3$  des Methyloxazols MeOxz<sup>3</sup> bei 8.41 ppm / 250.0 ppm bestätigte die Verknüpfung von Thz<sup>2</sup> mit MeOxz<sup>3</sup>. Dass die Heteroaromaten MeOxz<sup>3</sup> und Thz<sup>4</sup> miteinander verknüpft sind, konnte anhand der Kopplung der Methylgruppe an Position 6 von MeOxz<sup>3</sup> mit  $\text{N}-3$  von Thz<sup>4</sup> bei 2.83 ppm / 303.7 ppm belegt werden. Die Methylgruppe von MeOxz<sup>5</sup> ( $\delta\text{H}$  2.75 ppm) zeigt eine HMBC-Korrelation mit  $\text{N}-3$  von MeOxz<sup>5</sup> ( $\delta\text{N}$  249.5 ppm) und  $\text{N}-3$  von MeOxz<sup>6</sup> ( $\delta\text{N}$  246.9 ppm). Die Methylgruppe an Position 6 von MeOxz<sup>6</sup> ( $\delta\text{H}$  2.64 ppm) koppelt mit dem Stickstoffatom  $\text{N}-3$  ( $\delta\text{N}$  246.9 ppm) in demselben Ring. Die Aminosäuresequenz des Vorläuferpeptids von Plantazolicin ( $\text{H}_2\text{N-RCTCTTISSSTF-OH}$ ) sagt zwei Isoleucine C-terminal von MeOxz<sup>6</sup> aus gesehen und  $\text{N}$ -terminal von Oxz<sup>9</sup> aus gesehen vorher. Zusätzlich konnten HMBC-Korrelationen von  $\text{H}_\alpha$ -Ile<sup>7</sup> ( $\delta\text{H}$  4.48 ppm) zum Amidstickstoff von Ile<sup>7</sup> bei  $\delta\text{N}$  113.9 ppm und zum Amidstickstoff von Ile<sup>8</sup> bei  $\delta\text{N}$  118.6 ppm beobachtet werden.





**Abbildung 4-25:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (900-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 200 ppm).



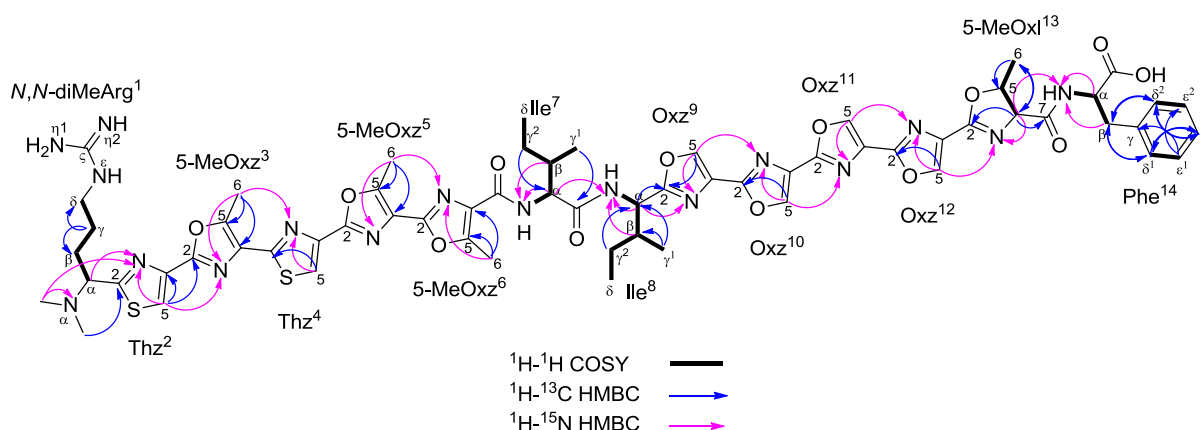
**Abbildung 4-26:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Kopplungen von Plantazolicin A. Die Farben der Pfeile entsprechen den Farben der in den Abbildungen 4-23 bis 4-25 gekennzeichneten Signale.

Es sind zwar keine Kopplungen zwischen Thz<sup>4</sup> und MeOxz<sup>5</sup> bzw. zwischen MeOxz<sup>6</sup> und Ile<sup>7</sup> zu beobachten, allerdings wurde anhand von MSMS-Experimenten, die in Kapitel 4.3.3 näher beschrieben werden, die Reihenfolge der Aminosäuren für die erste Hälfte des Moleküls bestätigt. Diese setzt sich, wie bereits aus dem *pzn*-Gencluster hervorgeht, aus den Bausteinen *N,N*-diMeArg<sup>1</sup>-Thz<sup>2</sup>-MeOxz<sup>3</sup>-Thz<sup>4</sup>-MeOxz<sup>5</sup>-MeOxz<sup>6</sup>-Ile<sup>7</sup> zusammen.

Die Kopplungen von  $\text{H}_\alpha$ -Ile<sup>8</sup> ( $\delta\text{H}$  4.93 ppm) zu den beiden Stickstoffatomen  $\text{N}_{\text{NH}}$ -Ile<sup>8</sup> bei 118.6 ppm und  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>9</sup> bei 248.5 ppm erbrachten den Beweis für die Verknüpfung von Ile<sup>8</sup> mit Oxz<sup>9</sup>. Ebenfalls detektiert wurden die Kopplungen des Protons H-5 von Oxz<sup>9</sup> ( $\delta\text{H}$  8.96 ppm) zum tertiären Stickstoff N-3 von Oxz<sup>10</sup> ( $\delta\text{N}$  246.8 ppm), so wie die Kopplungen von  $\text{H}_5$ -Oxz<sup>10</sup> ( $\delta\text{H}$  9.08 ppm) zu den tertiären Stickstoffatomen  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>10</sup> und  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>11</sup> ( $\delta\text{N}$  247.2 ppm). Ferner konnte mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Kopplungen von  $\text{H}_5$ -Oxz<sup>11</sup> zu  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>11</sup> bei 9.11 ppm / 247.2 ppm und zu  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>12</sup> bei 9.11 ppm / 250.1 ppm die Existenz von vier aufeinander folgenden Oxazolen Oxz<sup>9</sup>-Oxz<sup>10</sup>-Oxz<sup>11</sup>-Oxz<sup>12</sup> gezeigt werden. Für das Proton H-5 von Oxazol Oxz<sup>12</sup> ( $\delta\text{H}$  8.81) konnten die HMBC-Korrelationen zu den tertiären Stickstoffatomen  $\text{N}_3$ -Oxz<sup>12</sup> und  $\text{N}_3$ -MeOxl<sup>13</sup> ( $\delta\text{N}$  222.1 ppm) gefunden werden. Abschließend wurde die Anordnung der restlichen Plantazolicin-Bausteine anhand der Kopplungen von dem Methinproton H-4 ( $\delta\text{H}$  4.23 ppm) von MeOxl<sup>13</sup> zu dem Amidstickstoff von Phe<sup>14</sup> ( $\delta\text{N}$  122.0 ppm) und von dem Methinproton an  $\alpha$ -Position des Phe<sup>14</sup> zu dem tertiären Stickstoffatom N-3 ( $\delta\text{N}$  222.1 ppm) von MeOxl<sup>13</sup> bestätigt. Somit besteht die zweite Hälfte des Plantazolicin-Moleküls aus den Bausteinen Ile<sup>8</sup>-Oxz<sup>9</sup>-Oxz<sup>10</sup>-Oxz<sup>11</sup>-Oxz<sup>12</sup>-MeOxl<sup>13</sup>-Phe<sup>14</sup>.

### 4.3.2.7 Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse

Abbildung 4-27 zeigt eine Zusammenfassung der  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC Korrelationen.

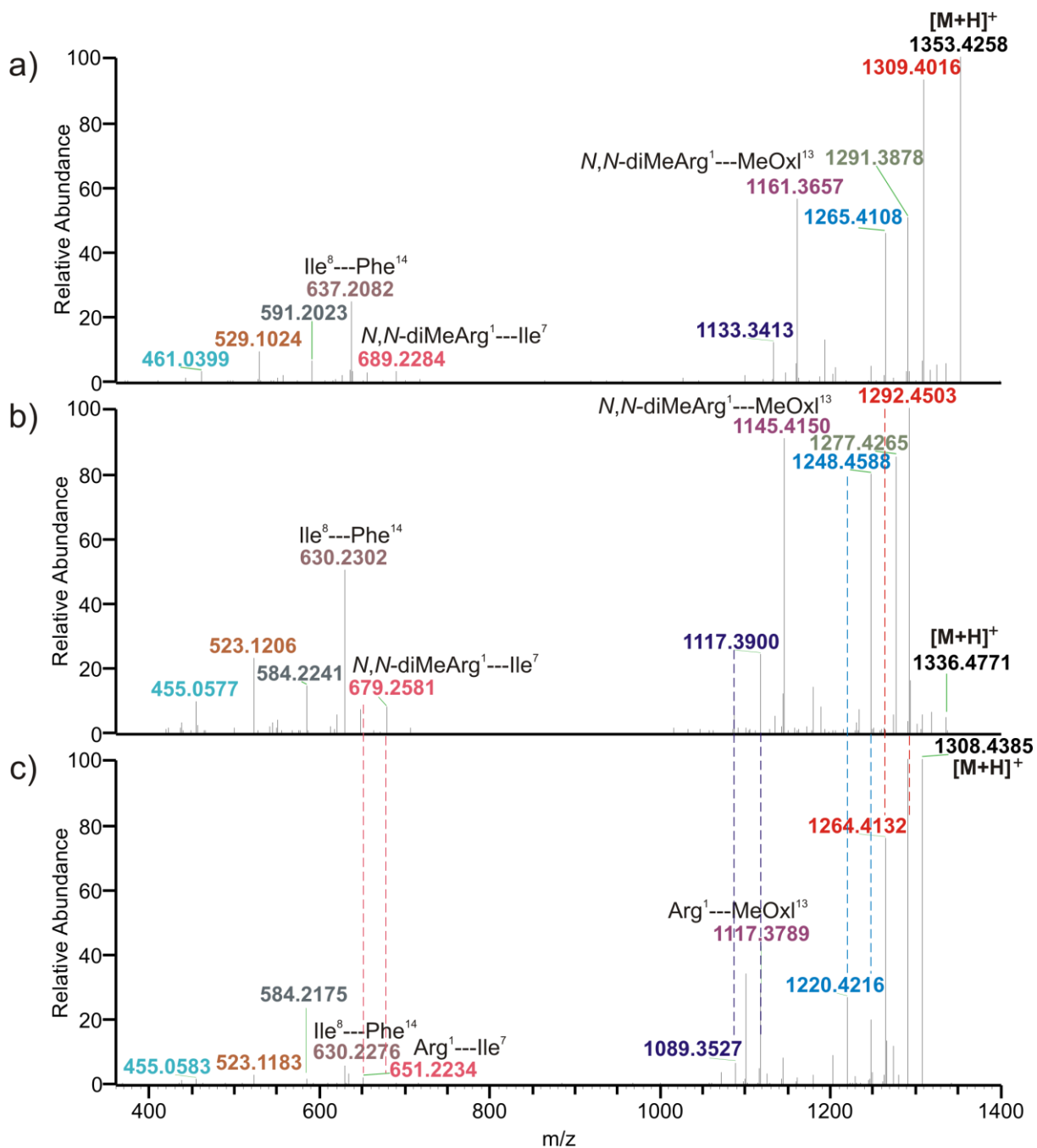


**Abbildung 4-27:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC Korrelationen von Plantazolicin A.

### 4.3.3 Tandem-Massenspektrometrie

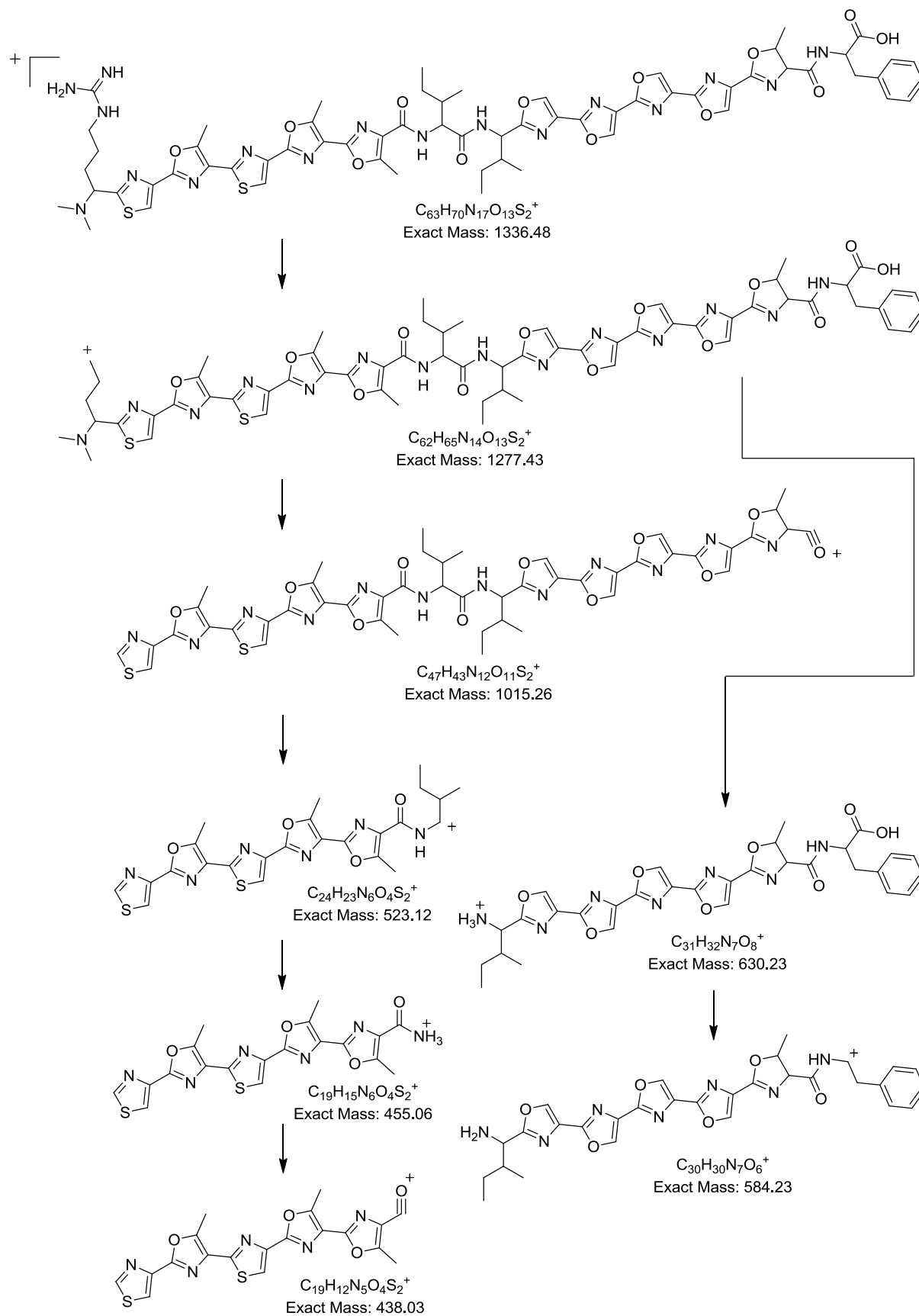
Die MS/MS-Experimente bestätigten die Richtigkeit der mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärten Struktur von Plantazolicin A. Abbildung 4-28 zeigt den Vergleich der MS/MS-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Plantazolicin A (a), Plantazolicin A (b) und Desmethyl-Plantazolicin (Plantazolicin B (c)). Der Massenunterschied zwischen den beiden Molekülen von markiertem und unmarkiertem Plantazolicin A beträgt 17 Da, was auf den Einbau von 17  $^{15}\text{N}$ -Atomen zurückzuführen ist. Um herauszufinden wie viele Stickstoffatome die mittels Tandem-Massenspektrometrie erzeugten Fragmentationen besaßen, wurde die Massendifferenz der markierten und unmarkierten Fragmentationen gebildet. Die Summenformelbestimmung der Tochterionen ließ Rückschlüsse auf die Struktur der Fragmente schließen.

Die Molekülen von Plantazolicin A und Plantazolicin B weisen einen Unterschied von 28 Da auf, bedingt durch das Fehlen der zwei Methylgruppen am *N*-Terminus in Plantazolicin B. Auch alle Fragmentationen, die das Arginin Arg<sup>1</sup> beinhalten, unterscheiden sich um 28 Da von dem analogen Fragmentation des Plantazolicin A. Die Fragmente ohne Arginin hingegen besitzen sowohl bei Plantazolicin A als auch bei Plantazolicin B dieselbe Molekülmasse.



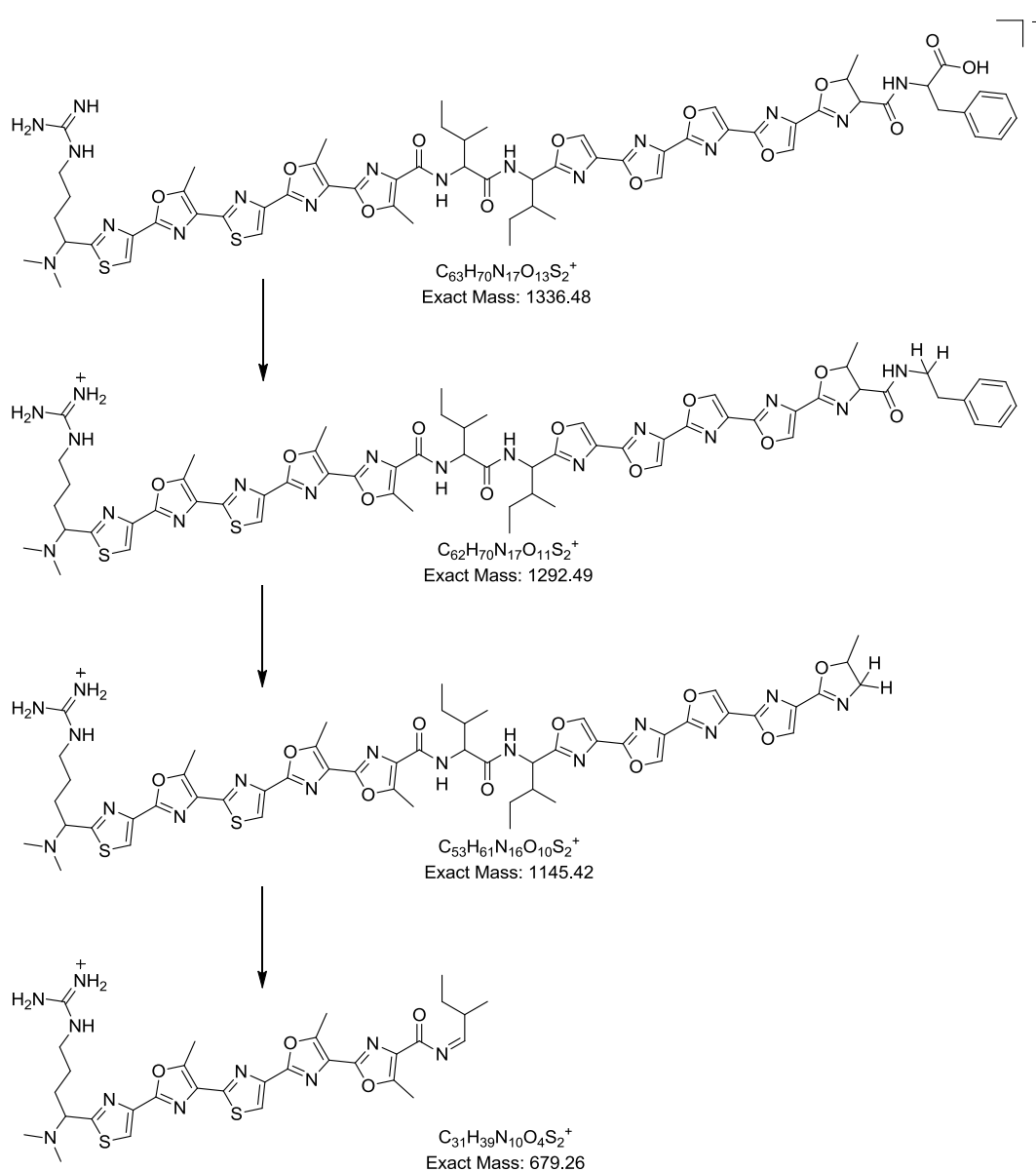
**Abbildung 4-28:** Orbitrap-ESI-MS-MS-Spektren von a)  $^{15}\text{N}$ -markiertem Plantazolicin A (**1b**) mit  $\Delta m = +17$  amu im Vergleich zu b) Plantazolicin A (**1a**) und c) Plantazolicin B (Desmethyl-Plantazolicin, **2**). Die gestrichelten Linien symbolisieren den Unterschied von  $\Delta m = 28$  amu zwischen **1a** und **2** und ist zurückzuführen auf das Fehlen der beiden Methylgruppen am N-Terminus.<sup>[97]</sup>

Die Strukturen der Fragmente sind in den Abbildungen 4-29 und 4-30 dargestellt. Abbildung 4-29 zeigt das Fragmentierungsschema mit den Fragmentierungen am *N*- und gleichzeitig *C*-terminalen Ende von Plantazolicin A. Das Fragmentation bei  $m/z$  1277.43 mit der Summenformel  $C_{62}H_{65}N_{14}O_{13}S_2^+$  ist auf den Verlust der Guanidin-Gruppe des Arginins Arg<sup>1</sup> zurückzuführen. Der C-C-Bindungsbruch zwischen den beiden Kohlenstoffatomen C<sub>α</sub>-Arg<sup>1</sup> und C<sub>2</sub>-Oxz<sup>2</sup> führt zum Fragment  $m/z$  1015.26,  $C_{47}H_{43}N_{12}O_{11}S_2^+$ . Aus diesem Fragment können aufgrund von weiteren Fragmentierungen die Tochterionen  $m/z$  523.12 ( $C_{24}H_{23}N_6O_4S_2^+$ ),  $m/z$  455.06 ( $C_{19}H_{15}N_6O_4S_2^+$ ) und  $m/z$  438.03 ( $C_{19}H_{12}N_5O_4S_2^+$ ) entstehen. Durch die Spaltung der Amidgruppe zwischen den beiden Isoleucinen Ile<sup>7</sup> und Ile<sup>8</sup> entsteht das *C*-terminale Fragmentation  $m/z$  630.23 mit der Summenformel  $C_{31}H_{32}N_7O_8^+$ . Die Decarboxylierung dieses Fragments am *C*-terminalen Ende führt zum Fragment  $m/z$  584.23 ( $C_{30}H_{30}N_7O_6^+$ ).



**Abbildung 4-29:** MS/MS-Fragmentierungsschema und Peak-Zuordnung von Plantazolicin A (1a). Fragmentierungen am N- und gleichzeitig C-terminalen Ende von Plantazolicin A.

Das Fragmentierungsschema mit den Fragmentierungen ausschließlich am C-terminalen Ende von Plantazolicin A ist in Abbildung 4-30 dargestellt. Die Decarboxylierung der Carboxyfunktion liefert das Fragmentation  $m/z$  1292.49 ( $C_{62}H_{70}N_{17}O_{11}S_2^+$ ). Durch den C-C-Bindungsbruch zwischen dem C-Atom  $C_{4-OxI}^{13}$  und dem C-Atom der benachbarten Carbonylgruppe  $C_{CO-OxI}^{13}$  ergibt sich das Fragmentation  $m/z$  1145.42 mit der Summenformel  $C_{53}H_{61}N_{16}O_{10}S_2^+$ . Das Tochterion mit dem *Masse-zu-Ladungsverhältnis*  $m/z$  679.26 ( $C_{31}H_{39}N_{10}O_4S_2^+$ ) ist auf die Spaltung zwischen den beiden Kohlenstoffatomen  $C_{\alpha-Ile}^7$  und  $C_{CO-Ile}^7$  zurückzuführen.



**Abbildung 4-30:** MS/MS-Fragmentierungsschema und Peak-Zuordnung von Plantazolicin A (1a). Fragmentierungen nur am C-terminalen Ende von Plantazolicin A.

## 4.4 Zusammenfassung und Diskussion

*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ist ein aus Böden mit phytopathogener Belastung stammendes grampositives, pflanzenwachstumsförderndes Rhizobakterium, das in der Lage ist, die Vermehrung von pflanzenpathogenen Organismen zu unterdrücken.<sup>[66]-[71]</sup> Das Genom besitzt drei PKS-Biosynthesegencluster, die für die Biosynthese von Bacillaen,<sup>[73],[74]</sup> Difficidin<sup>[75],[76]</sup> und Macrolactin<sup>[77],[78]</sup> verantwortlich sind<sup>[79]-[81]</sup> und sechs NRPS-Biosynthesegencluster, von denen drei die Lipocyclopeptide Fengycin,<sup>[82]</sup> Surfactin,<sup>[83],[84]</sup> und Bacillomycin D,<sup>[85]</sup> eins das Siderophor Bacillibactin<sup>[86]</sup> und eins das Dipeptid Bacilysin kodieren.<sup>[71]</sup> Das Produkt des sechsten NRPS-Biosynthesegenclusters *nrs* ist noch unbekannt, jedoch wird vermutet, dass es sich wie das Bacillibactin um ein Siderophor handelt.<sup>[71]</sup> Bei der Biosynthese der PKS- und NRPS-Produkte spielt die 4'-Phosphopantetheinyltransferase (Sfp) eine große Rolle, da sie die Enzyme, die an der Biosynthese beteiligt sind, aktiviert. Butcher *et al.* konnten mittels einer Geninaktivierungsmutante dieses Enzyms, die nicht mehr zur PKS- und NRPS-Produktion fähig war, zeigen, dass trotzdem antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis* 168 vorhanden war.<sup>[87]</sup> Somit konnte von mindestens einer ribosomal synthetisierten und antibakteriell wirkenden Verbindung in dem Stamm *B. amyloliquefaciens* FZB42 ausgegangen werden. Auf der Suche nach kleinen Sekundärmetaboliten mit Hilfe eines ESI- und eines MALDI-TOF-MS-Screenings, gelang es Scholz *et al.* eine Substanz mit der Molekülmasse  $[M+H]^+=1336$  Da zu identifizieren. Wie anhand von weiteren Experimenten herausgefunden wurde, ähnelten dessen Biosyntheseproteine den Biosyntheseproteinen von Streptolysin S, das ein Thiazol/Oxazol-modifiziertes Microcin (TOMM)-Biosynthesecluster<sup>[24]</sup> besitzt. Da das Biosynthesecluster der Substanz mit der Molekülmasse  $[M+H]^+=1336$  Da aus den pflanzenassoziierten *Bacillus amyloliquefaciens*-Stamm stammte, das Produkt von Cystein, Serin und Threonin ausgehende "Azol"-Ringe enthielt und es sich um ein Bacteriocin handelte, wurde der Substanz der Name Plantazolicin (Pzn) gegeben.<sup>[95]</sup>

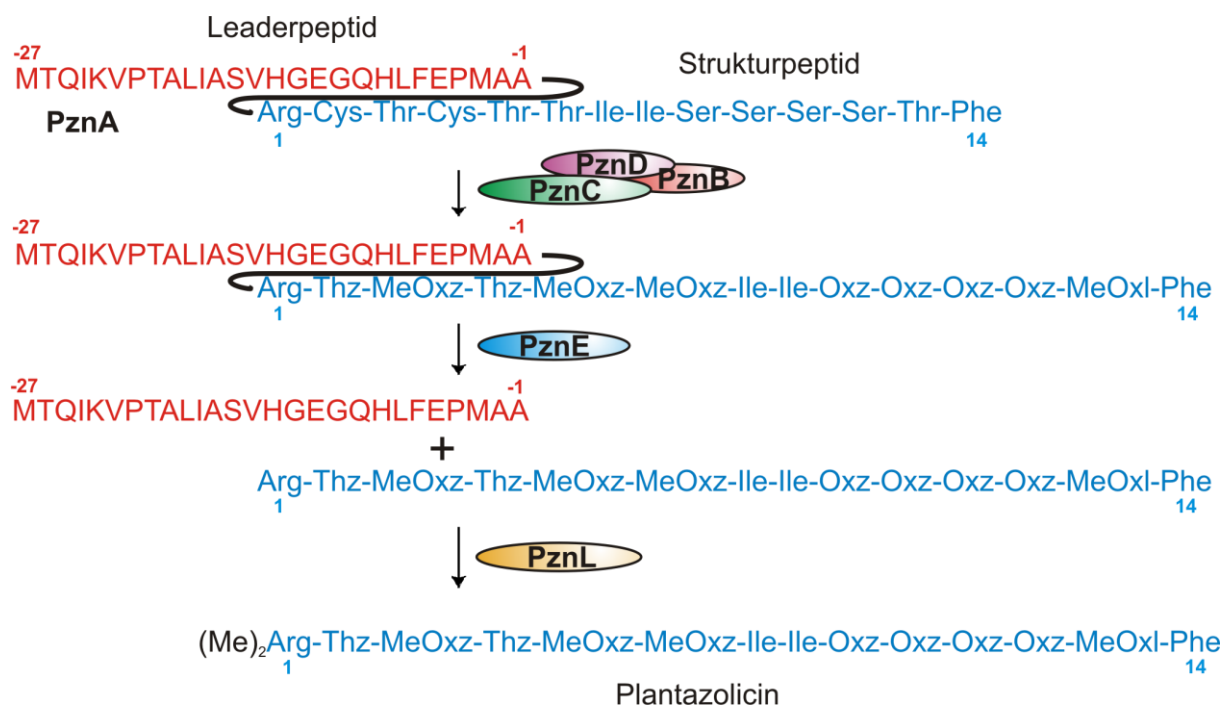
Die Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen, die das Peptid durchläuft und die damit verbundene hohe Anzahl an quartären Kohlenstoffatomen erschwerten die Strukturaufklärung des Moleküls erheblich. Die Tandem-Massenspektrometrie und 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-korrelierte NMR-Spektroskopie allein reichten nicht aus, um die vollständige Struktur von Plantazolicin aufzuklären. Da es sich bei dem Plantazolicin um ein stark modifiziertes Peptid handelt, das über relativ viele Stickstoffatome verfügt,



wurde anhand von Fütterungsexperimenten eine  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung durchgeführt. Hierzu wurde der Produktionsstamm auf einem Glucose-Minimal-Nährboden fermentiert, der mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ammoniumsulfat versetzt worden war. Das Ergebnis war der erfolgreiche Einbau von 17  $^{15}\text{N}$ -Isotopen im Plantazolicin ( $\text{C}_{63}\text{H}_{69}\text{O}_{13}^{15}\text{N}_{17}\text{S}_2$ ).

Anhand der  $^{15}\text{N}$ -Markierung des Moleküls konnten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC NMR-Experimente durchgeführt werden, mit deren Hilfe die zur vollständigen Strukturaufklärung fehlenden NMR-Kopplungen detektiert werden konnten. Das Plantazolicin besitzt einen *N*-terminalen Argininrest, der am *N*-Terminus zweifach methyliert vorliegt. Hiernach kommen abwechselnd zwei Thiazole und Methyloxazole vor, gefolgt von einem weiteren Methyloxazol. Im mittleren Bereich des Moleküls sind zwei unmodifizierte Isoleucinreste vorhanden, an die vier hintereinander liegende Oxazole angeknüpft sind. Hiernach schließt sich ein Methyloxazolin an, gefolgt von einem unmodifizierten Phenylalanin, das den *C*-Terminus des Moleküls darstellt. Die Sequenz des Plantazolicins lautet somit *N,N*-diMeArg<sup>1</sup>-Thz<sup>2</sup>-MeOxz<sup>3</sup>-Thz<sup>4</sup>-MeOxz<sup>5</sup>-MeOxz<sup>6</sup>-Ile<sup>7</sup>-Ile<sup>8</sup>-Oxz<sup>9</sup>-Oxz<sup>10</sup>-Oxz<sup>11</sup>-Oxz<sup>12</sup>-MeOxl<sup>13</sup>-Phe<sup>14</sup>.

Mit Hilfe der aufgeklärten Struktur konnten bereits erste Schlussfolgerungen auf die Zusammenarbeit der für die posttranslationalen Modifikationen zuständigen Enzyme gezogen werden. Abbildung 4-31 zeigt das hypothetische Biosynthesemodell von Plantazolicin. Das Leaderpeptid des Präkursors PznA dient wahrscheinlich als eine Art Erkennungsmotiv für den „BCD“-Synthetase-Komplex, der für die Cyclodehydratisierung und die anschließende Dehydrierung der Threonine und Serine zu (Methyl-) Oxazolen und der Cysteine zu Thiazolen verantwortlich ist.<sup>[25]</sup> Dabei ist bemerkenswert, dass der zum *C*-Terminus am nächsten liegende Heterozyklus Me-Oxl<sup>13</sup> in der Oxazolin-Form bestehen bleibt und nicht weiter zum Oxazol oxidiert wird. Es wird vermutet, dass nach der Heterozyklenbildung zunächst das Leaderpeptid mit Hilfe der Protease PznE abgespalten wird und erst danach die Dimethylierung des *N*-Terminus durch die Methyltransferase PznL stattfindet. Die Funktionen der in der Biosynthese involvierten Enzyme müssen allerdings noch anhand von Experimenten auf genetischer Ebene bestätigt bzw. für die Enzyme mit unbekannter Funktion (PznI und PznJ) noch herausgefunden werden.



**Abbildung 4-31:** Das Biosynthesemodell der Plantazolicin-Biosynthese. Oxz = Oxazol, Thz = Thiazol, MeOxz = 5-Methyloxazol, MeOxl = 5-Methyloxazolin.<sup>[97]</sup>

Das Plantazolicin gehört zu der Gruppe der linearen Thiazol/Oxazol-modifizierten Peptide, auch LAP (*linear azol(in)e-containing peptides*) genannt.<sup>[13]</sup> Beispiele für Peptide dieser Substanzklasse sind das Streptolysin S, das Microcin B17 und das Goadsporin. Streptolysin S ist ein Virulenzfaktor, der von fast allen Stämmen der Typ-Spezies *Streptococcus pyogenes* produziert wird und für die  $\beta$ -Hämolyse, mit anderen Worten für die Erythrozytenzerstörung,<sup>[98]</sup> verantwortlich ist.<sup>[99]</sup> Die zellschädigende Wirkung des 2.7 kDa<sup>[99]</sup> großen Moleküls, dessen Struktur noch nicht aufgeklärt werden konnte,<sup>[13]</sup> ist auch gegenüber Lymphozyten<sup>[100]</sup> und Thrombozyten<sup>[101]</sup> beobachtet worden. Zwar ist der genaue Mechanismus der Hämolyse noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch weiß man, dass das Streptolysin S Ionenkanäle bildet, was mit einer irreversiblen osmotischen Lyse der Zelle verbunden ist.<sup>[99],[102]</sup>

Microcin B17 ist ein Peptidantibiotikum mit einer Molekülmasse von 3093 Da, bestehend aus vier Oxazol- und vier Thiazolringen.<sup>[103],[104]</sup> Der von verschiedenen *E. coli*-Stämmen produzierte,<sup>[104]</sup> erster bekannte DNA-Gyrase-Inhibitor peptidischer Natur<sup>[105]</sup> wirkt, indem es die DNA-Replikation bei verschiedenen gramnegativen Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* und *Pseudomonas* hemmt.<sup>[103],[104]</sup>

Das von *Streptomyces* sp. TP-A0584 produzierte, 1612 Da schwere Goadsporin besitzt zwei Thiazole, vier (Methyl-)Oxazole, zwei Dehydroalanine und einen acetylierten *N*-Terminus.<sup>[13],[106]</sup> Das genaue Target konnte noch nicht identifiziert werden, jedoch ist bekannt dass es im Gegensatz zu Microcin B17 eine antibiotische Wirkung gegen grampositive *Streptomyces*-Spezies besitzt.<sup>[13]</sup>

Auch beim Plantazolicin wurde eine wachstumshemmende Wirkung gegen grampositive, verwandte *Bacillus*-Spezies beobachtet,<sup>[24]</sup> insbesondere gegen *Bacillus anthracis* mit einer minimalen Hemmkonzentration von 2-4 µg/ml.<sup>[107]</sup> Gegen gramnegative Bakterien wie beispielsweise *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli* K-12, *Klebsiella terrigena*, und *Pseudomonas* sp. war keine antibakterielle Wirkung zu detektieren.<sup>[24]</sup>

In Anlehnung an die Ionenkanal-bildende Eigenschaft des Streptolysin S wurden von Dr. Philipp Reiß aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Koert im Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg die Ionenkanaleigenschaften von Plantazolicin gemessen. Es stellte sich heraus, dass das Plantazolicin membranmodifizierende Eigenschaften aufweist und die Ionenleitfähigkeit erhöht, aber keine definierten Ionenkanäle bildet. Um Hinweise auf das mögliche Target des Plantazolicins zu erhalten, ist es von großer Bedeutung zunächst die räumliche Struktur des Moleküls herauszufinden. Es ist zu klären, ob die zwei pentaheterozyklischen Einheiten dem Peptid eine planare Struktur verleihen oder ob das Molekül in einer anderen dreidimensionalen Anordnung vorliegt. Um die räumliche Orientierung der einzelnen Peptidbausteine zu enträtseln werden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern bereits verschiedene Experimente durchgeführt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Plantazolicin einen Meilenstein in der Zuordnung und Strukturaufklärung unbekannter Sekundärmetabolite von *B. amyloliquifaciens* FZB42 darstellt und gleichzeitig die Sammlung von bekannten Sekundärmetaboliten aus Bakterien der Gattung *Bacillus* erweitert.

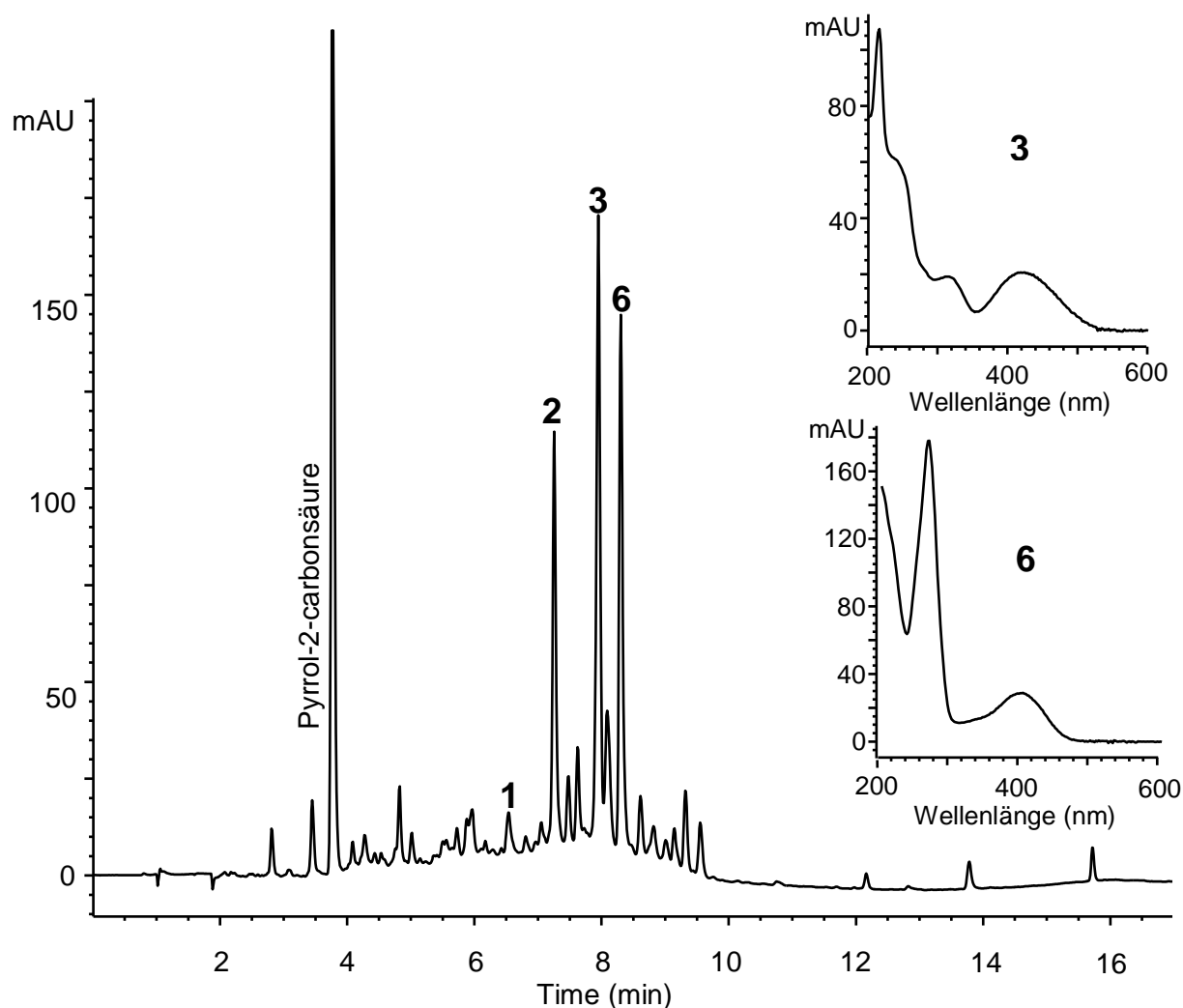
## 5 Langkocycline

### 5.1 Screening

Im Zuge eines chemischen Screening-Programms mit dem Ziel neue, strukturell unbekannte Sekundärmetabolite zu entdecken, wurden auf der Insel Langkawi in Malaysia Actinomyceten-Stämme isoliert. Die frisch isolierten Stämme wurden von Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in verschiedenen Medien angezogen. Zu unterschiedlichen Fermentationszeiten wurden Kulturfiltratextrakte vorbereitet. Diese wurden mit Hilfe eines HPLC-Diodenarray-Detektors analysiert und mit der UV/Vis-Naturstoffdatenbank verglichen.<sup>[108]</sup> Der *Streptomyces*-Stamm Acta 3034 (Abbildung 5-1) weckte aufgrund der Anwesenheit vieler verschiedener bekannter und unbekannter Peaks im Kulturfiltratextrakt (Abbildung 5-2) großes Interesse. Einer dieser Peaks konnte der Pyrrol-2-carbonsäure zugeordnet werden, ein von Streptomyzeten oft produzierter Sekundärmetabolit. Die drei Peaks mit den Retentionszeiten  $R_t = 6.6$  min (1), 7.3 min (2) und 7.9 min (3) konnten aufgrund der nahezu übereinstimmenden UV/Vis-Spektren den Urdamycin A-Typ Antibiotika zugeordnet werden. Der Peak bei der Retentionszeit  $R_t = 8.3$  min (6) konnte nach der Aufreinigung und NMR-spektroskopischen Analyse als das Angucyclinon-Antibiotikum Tetrangomycin mit der Masse 322 Da identifiziert werden. Tetrangomycin wurde als erstes von Dann *et al.* als Sekundärmetabolit eines Mutantenstammes von *Streptomyces rimosus* beschrieben.<sup>[43]</sup>



**Abbildung 5-1:** Lichtmikroskopische Aufnahme von dem Stamm *Streptomyces* sp. Acta 3034 (Kolonie auf der Agarplatte).<sup>[109]</sup>



**Abbildung 5-2:** HPLC-Analyse des Kulturfiltratextraktes von *Streptomyces* sp. Acta 3034 bei einer Fermentationszeit von 70 h, gemessen bei  $\lambda = 230$  nm. Einfügungen: UV/Vis-Spektren der Hauptkomponente Langkocyclin A3 (**3**, **1** und **2** sind fast deckungsgleich) und von Tetrangomycin (**6**).<sup>[110]</sup>

## 5.2 Fermentation und Isolierung

Der Stamm Acta 3034 wurde in einem 10 Liter-Bioreaktor fermentiert. Die maximale Konzentration an Langkocyclin A1-A3 im Kulturfiltrat wurde nach 70 h erreicht (3 mg/l A1 (**1**), 17 mg/l A2 (**2**) und 30 mg/l A3 (**3**); HPLC-Kontrolle). Die Konzentrationen der Nebenkomponten B1 (**4**) und B2 (**5**) konnten aufgrund der geringen Substanzmengen nicht bestimmt werden. Die Isolierung der Substanzen **1-5** erfolgte, wie auch die Fermentation, ebenfalls durch Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Den ersten Reinigungsschritt stellte die Isolierung aus dem Kulturfiltrat mit Hilfe einer Amberlite XAD-16-Säule dar, gefolgt von einer

Kieselgel-60-Säule. Der nächste Isolierungsschritt war die Größenausschlusschromatographie an einer Sephadex LH-20-Säule in Methanol. Anschließend folgte die Aufreinigung an einer Toyopearl HW-40F-Säule. Die Langkocycline A1-A3 (**1-3**) konnten nach der Gefriertrocknung in Form von gelben Feststoffen mit Ausbeuten von 8 mg (**1**), 58 mg (**2**) und 21 mg (**3**) erhalten werden (Tabelle 5-1). Die blau-lila gefärbten Nebenkomponenten B1 (**4**) und B2 (**5**) wurden mit einer Ausbeute von 1.4 mg und 2.1 mg isoliert.

**Tabelle 5-1:** Physikochemische Eigenschaften der Langkocycline A1, A2, A3, B1 und B2.

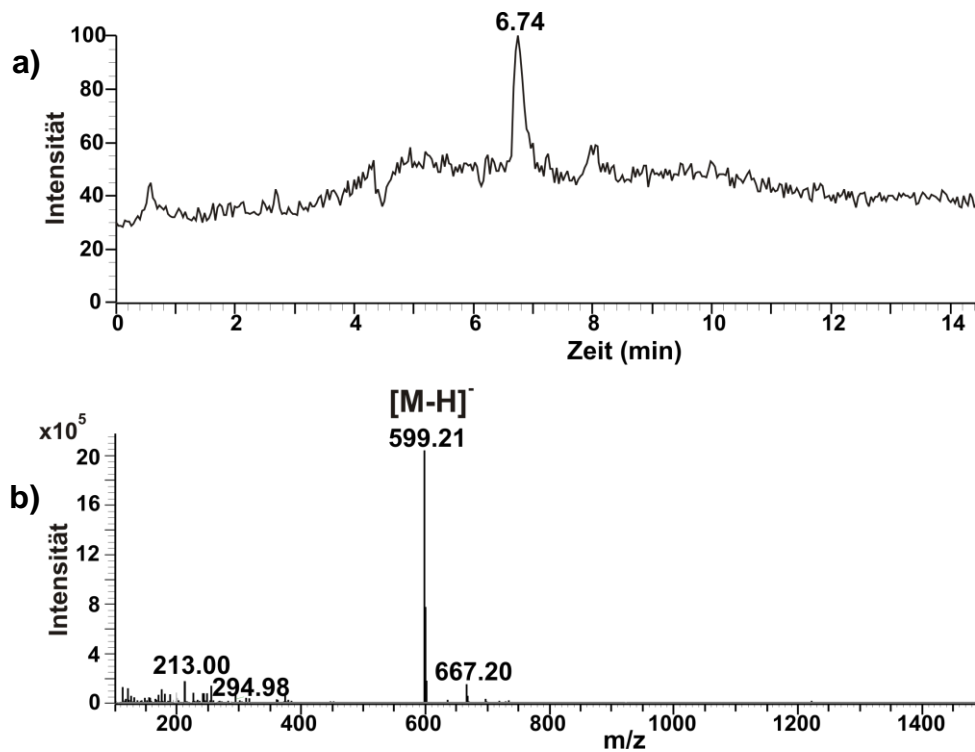
	<b>1 (A1)</b>	<b>2 (A2)</b>	<b>3 (A3)</b>	<b>4 (B1)</b>	<b>5 (B2)</b>
Aussehen	gelber Feststoff	gelber Feststoff	gelber Feststoff	blauer Feststoff	blauer Feststoff
isolierte Menge	8 mg	58 mg	21 mg	1.4 mg	2.1 mg
UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ [nm]	422, 313	422, 313	422, 313	562, 318	562, 318
$[\alpha]_D^{23}$ (MeOH): (c, [mg/ml])	+95.9 (c, 0.8)	+38.0 (c, 1.0)	+1.8 (c, 0.7)	+251.3 (c, 2.5)	+353.5 (c, 2.8)

Nach der Isolierung der Substanzen B1 und B2 wurden auch deren UV/Vis-Spektren mit bereits bekannten Sekundärmetaboliten aus der Datenbank<sup>[108]</sup> verglichen. Die Spektren zeigten große Ähnlichkeit zu dem UV/Vis-Spektrum von Urdamycin D.

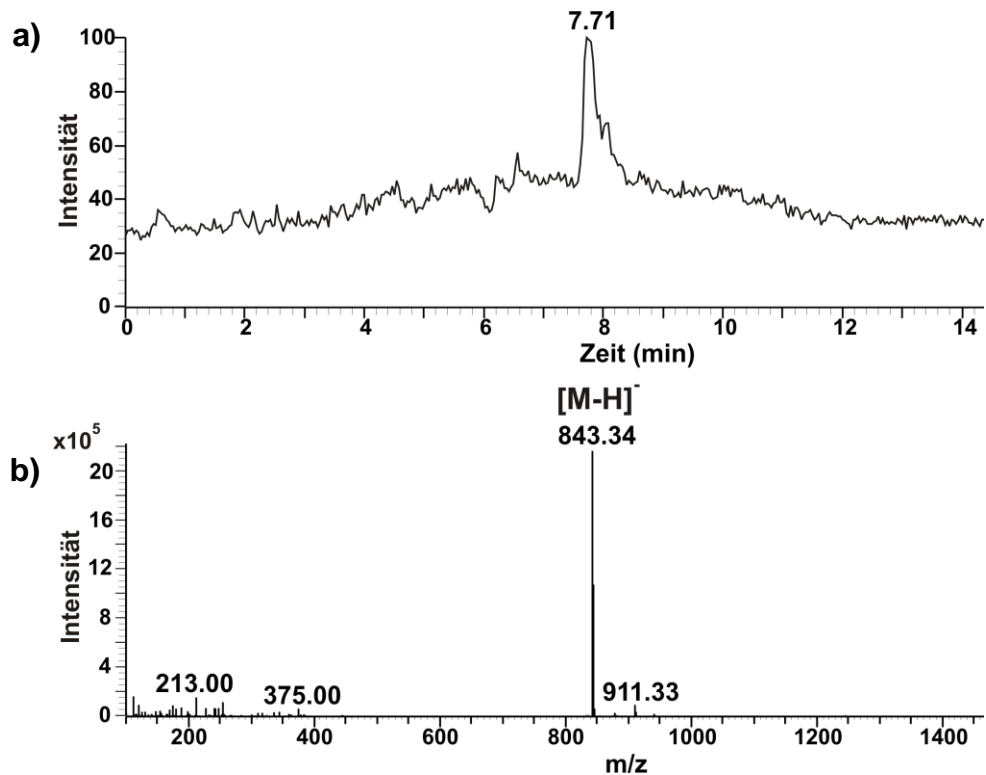
## 5.3 Strukturaufklärung

### 5.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

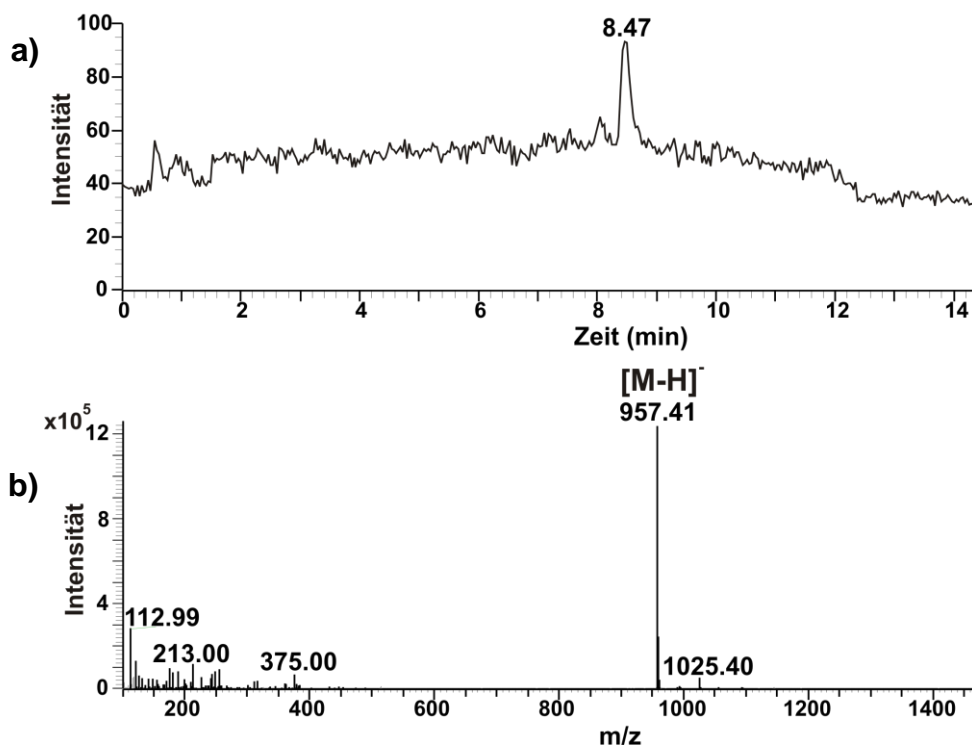
Die nominalen Molekülmassen der Langkocycline A1, A2, A3, B1 und B2 konnten mittels HPLC-ESI-Orbitrap-MS-Messungen im Negativ-Ionenmodus ermittelt werden. Die Abbildungen 5-3 bis 5-7 zeigen die Totalionenchromatogramme der Langkocycline mit den zugehörigen Massenspektren, aus denen folgende Molekülionen bestimmt wurden:  $[M-H]^- = 599.2$  Da (**1**),  $[M-H]^- = 843.3$  Da (**2**),  $[M-H]^- = 957.4$  Da (**3**),  $[M-H]^- = 998.4$  Da (**4**) und  $[M-H]^- = 1112.5$  Da (**5**).



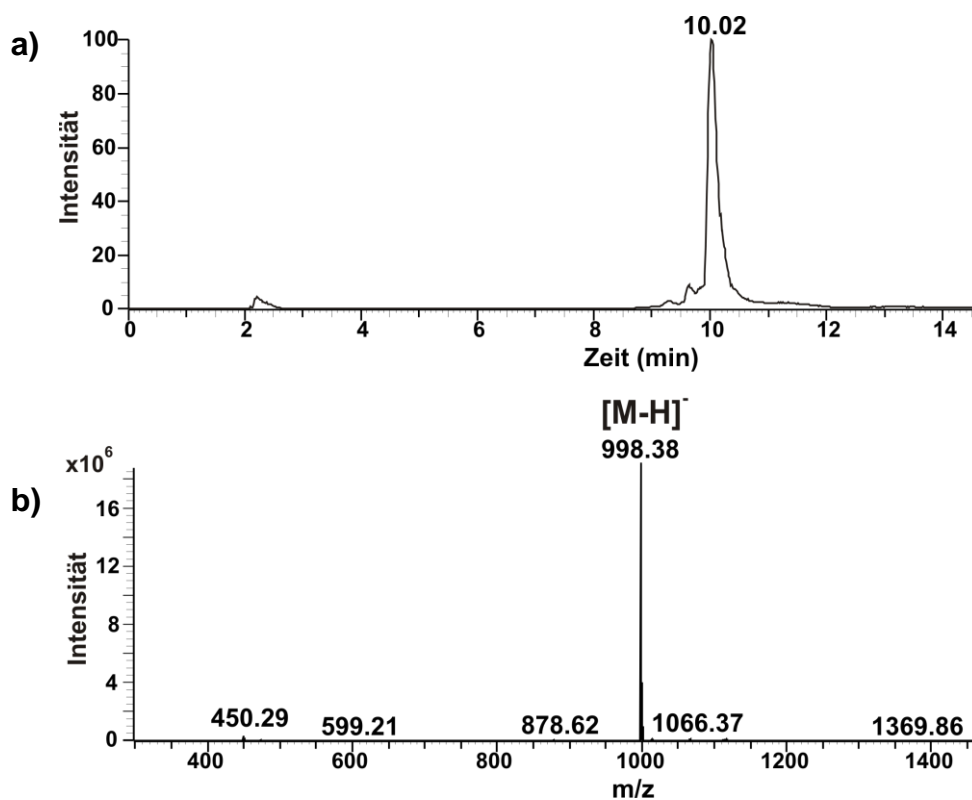
**Abbildung 5-3:** a) Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A1 im Negativ-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=6.74$  min.



**Abbildung 5-4:** a) Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A2 im Negativ-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=7.71$  min.

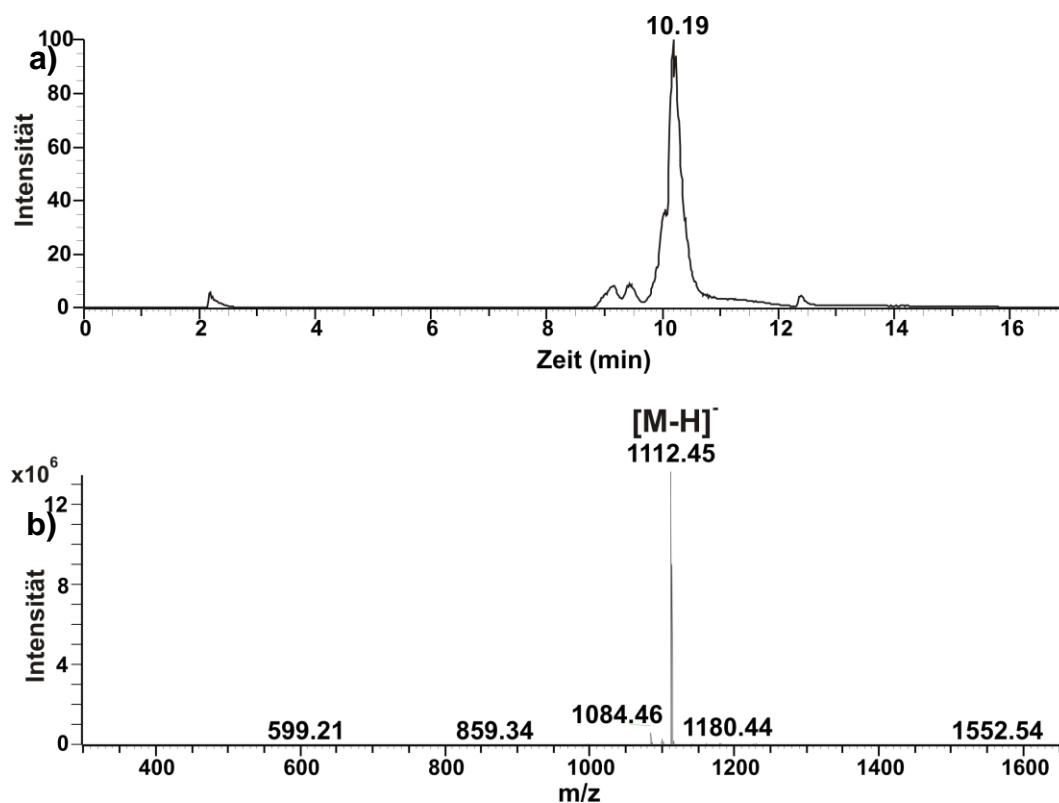


**Abbildung 5-5:** a) Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A3 im Negativ-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=8.47$  min.



**Abbildung 5-6:** a) Totalionenchromatogramm des Langkocyclins B1 im Negativ-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=10.02$  min.





**Abbildung 5-7:** a) Totalionenchromatogramm des Langkocyclins B2 im Negativ-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit  $R_t=10.19$  min.

Die exakten Molekülmassen der Langkocycline, die an der Orbitrap XL (Thermo Scientific, Bremen) ermittelt wurden, betragen  $[M-H]^- = 599.21201$  Da (1),  $[M-H]^- = 843.34222$  Da (2),  $[M-H]^- = 957.41075$  Da (3),  $[M-H]^- = 998.38175$  Da (4) und  $[M-H]^- = 1112.44816$  Da (5). Bei der Summenformelberechnung, dessen Ergebnisse in Tabelle 5-2 zusammengefasst sind, wurden die Elemente C, H, N und O berücksichtigt.

**Tabelle 5-2:** Ergebnisse der hochauflösenden ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie.

	1 (A1)	2 (A2)	3 (A3)	4 (B1)	5 (B2)
Molekülmasse	600.2	844.3	958.4	999.4	1113.5
Summenformel	$C_{31}H_{36}O_{12}$	$C_{43}H_{56}O_{17}$	$C_{49}H_{66}O_{19}$	$C_{53}H_{61}O_{18}N$	$C_{59}H_{71}O_{20}N$
HR-Orbitrap-ESI-MS [ $m/z$ ]:					
gemessen $[M-H]^-$	599.21201	843.34222	957.41075	998.38175	1112.44816
theoretisch $[M-H]^-$	599.21340	843.34447	957.41255	998.38159	1112.44967
$\Delta$ ppm	-0.489	-1.371	-0.737	1.262	-0.368
DBE	14	16	17	24	25

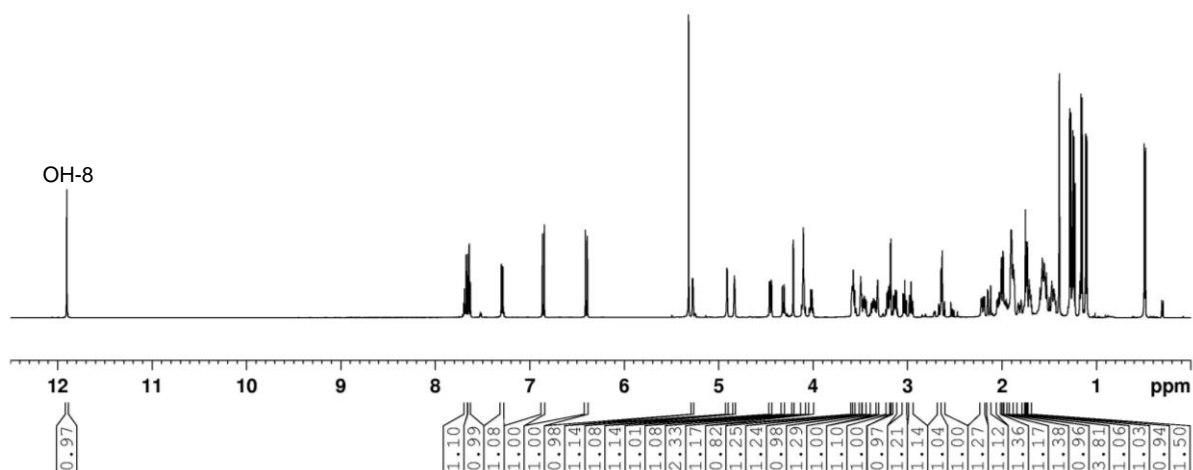
### 5.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die Strukturaufklärung der Langkocycline mit Hilfe von NMR-Spektroskopie wird im folgenden Abschnitt am Beispiel von Langkocyclin A3 (**3**) detailliert beschrieben. Für alle Messungen wurde  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$  als Lösungsmittel eingesetzt und die chemischen Verschiebungen der Signale auf die Lösungsmittelpeaks ( $\delta_{\text{H}}$  5.32 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  54.0 ppm) referenziert.

#### 5.3.2.1 Die eindimensionalen $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -Spektren von Langkocyclin A3

Anhand der Anzahl von Signalen in den eindimensionalen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren von Langkocyclin A3 (**3**) konnte die mittels hochauflösender HPLC-ESI-Massenspektrometrie vorgeschlagene Summenformel bestätigt werden. Abbildung 5-8 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 und die Abbildungen 5-9 und 5-10 die vergrößerten Ausschnitte.

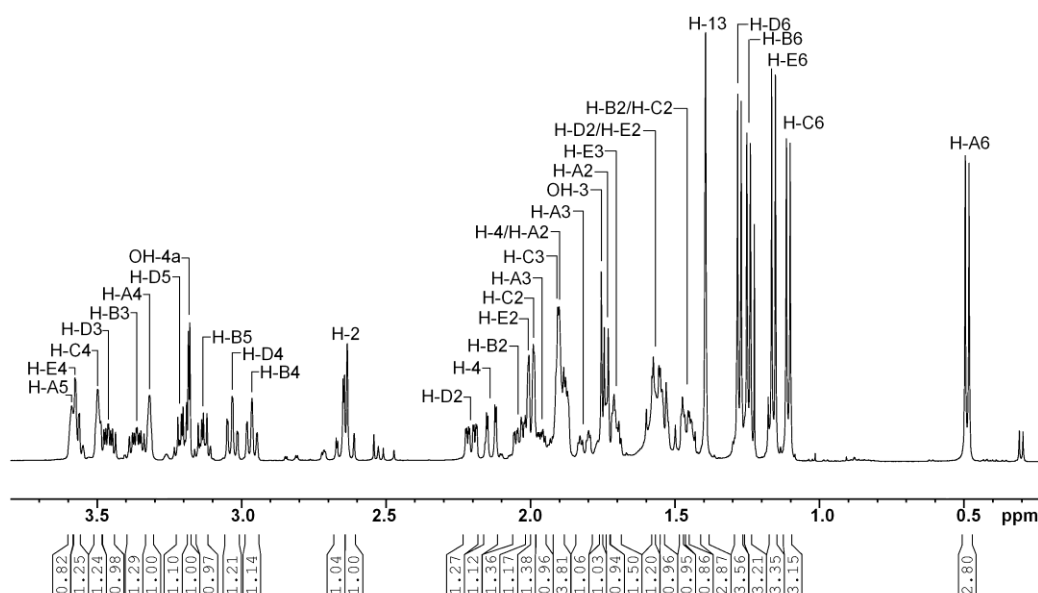
Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von **3** zeigt 16 Signale im aliphatischen Bereich, 17 Signale im oxygenierten aliphatischen Bereich und fünf Signale im olefinischen Bereich. Fünf Signale bei 1.76 ppm, 3.18 ppm, 4.11 ppm, 4.21 ppm und 11.89 ppm sind aufgrund der fehlenden HSQC-Signale (siehe Kapitel 5.3.2.2) charakteristisch für Hydroxygruppen. Die Integration der  $^1\text{H}$ -Signale führte zu einer Anzahl von 65 Protonen, einem Proton weniger als in der Summenformel angegeben. Wie sich später herausstellte, liegt das daran, dass die Hydroxygruppe am endständigen Zucker E (siehe Abbildung 5-27) mittels NMR-Spektroskopie nicht detektierbar ist.



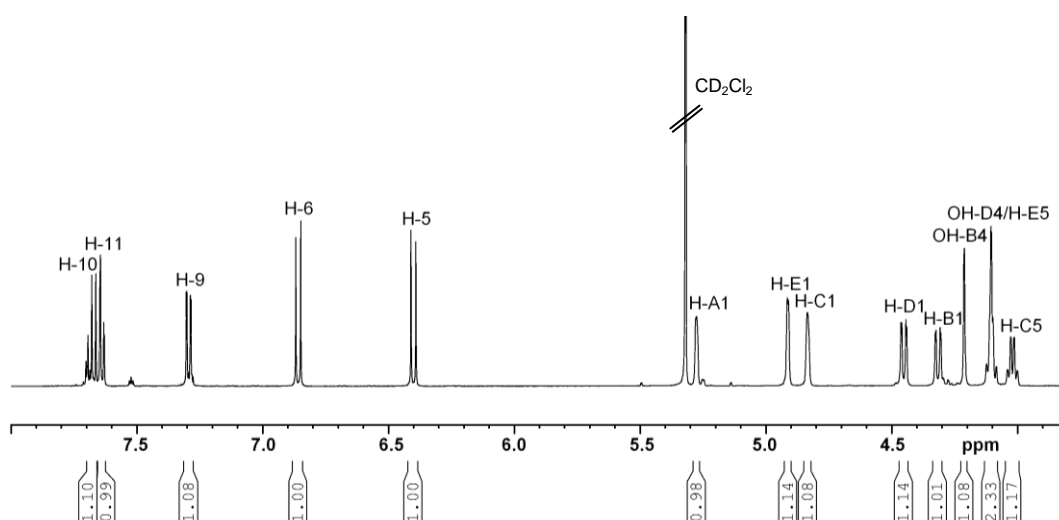
**Abbildung 5-8:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Langkocyclin A3. OH-8 stellt die Hydroxygruppe an Position 8 des Aglycons dar.

Die sechs Signale bei 0.49 ppm, 1.11 ppm, 1.16 ppm, 1.25 ppm, 1.28 ppm und 1.39 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum konnten anhand der charakteristischen Hochfeldverschiebung und anhand der Integrale von drei Protonen pro Signal eindeutig sechs Methylgruppen zugeordnet werden. Bei den ersten fünf Signalen liegen Dubletts mit  $^3J$ -Kopplungskonstanten zwischen 6.1 und 6.6 Hz vor. Es handelt sich hierbei um die Methylgruppen an Position 6 der später genauer bestimmten fünf Desoxyzucker. Letzteres Signal ist ein Singulett und stellt die Methylgruppe an Position 3 des Aglycons dar. Im Bereich von 1.46-2.66 ppm sind die weiteren zehn aliphatischen Signale vorzufinden. Nur bei 5 Signalen ist eine eindeutige Aufspaltung zu erkennen. Die beiden Signale bei 2.04 ppm ( $J = 12.8$  Hz,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 1.8$  Hz) und 2.21 ppm ( $J = 12.6$  Hz,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 1.8$  Hz) zeigen beide Dublett von Dublett von Dubletts (ddd). Die Aufspaltungen und Kopplungskonstanten sind für die an Position 2 äquatorial positionierten Protonen der später charakterisierten Olivosen charakteristisch. Die beiden Signale bei 2.13 ppm ( $J = 14.6$  Hz,  $J = 2.3$  Hz) und 2.66 ppm ( $J = 11.9$  Hz,  $J = 2.3$  Hz) weisen zwei Dublett von Dubletts auf und gehören zu den äquatorial stehenden Protonen an Position 2 und 4 des Aglycons. Das an Position 2 axial stehende Proton zeigt ein Dublett mit der Kopplungskonstante  $J = 11.9$  Hz bei 2.62 ppm. Bei allen anderen Signalen kommt es aufgrund der hohen Anzahl an Protonen in diesem Bereich zu einer Überlagerung, so dass eine Auswertung der Kopplungsmuster mittels 1D-NMR-Spektroskopie nicht mehr möglich ist. Die 17 Signale im oxygenierten aliphatischen Bereich liegen zwischen 2.96 und 5.27 ppm. Bei den beiden Signalen bei 2.96 ppm ( $J = 8.7$  Hz,  $J = 8.7$  Hz) und 3.03 ppm ( $J = 8.6$  Hz,  $J = 8.8$  Hz) handelt es sich um Pseudotriplets, die durch die Protonen an Position 4 der beiden Olivosen zustande kommen. Die vier Multipletts bei 3.14 ppm, 3.21 ppm, 3.36 ppm und 3.46 ppm konnten den Protonen an Position 5 und 3 der beiden Olivosen zugeordnet werden. Die Signale bei 3.32 ppm, 3.49 ppm und 3.58 ppm stellen die für die drei Rhodinosen an Position 4 charakteristischen breiten Singuletts dar. Die drei Quartetts bei 3.56 ppm ( $J = 6.6$  Hz), 4.02 ppm ( $J = 6.6$  Hz) und 4.10 ppm ( $J = 6.6$  Hz) werden durch die Protonen an Position 5 der Rhodinosen hervorgerufen. Bei den beiden Signalen bei 4.32 ppm ( $J = 9.9$  Hz,  $J = 1.8$  Hz) und 4.45 ppm ( $J = 9.8$  Hz,  $J = 1.8$  Hz) handelt es sich um Dublett von Dubletts bedingt durch die anomeren Protonen der beiden Olivosen. Die anomeren Protonen der drei Rhodinosen hingegen zeigen charakteristische breite Singuletts bei 4.84 ppm, 4.91 ppm und 5.27 ppm. Die fünf Signale im olefinischen Bereich sind dem Aglycon zuzuordnen

und setzen sich aus zwei Dubletts bei 6.40 ppm ( $J = 9.8$  Hz) und 6.86 ppm ( $J = 9.8$  Hz), zwei Dublett von Dubletts bei 7.29 ppm ( $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.3$ ) und 7.63 ppm ( $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.3$ ) und einem Pseudotriplett bei 7.68 ppm ( $J = 7.6$  Hz,  $J = 8.2$ ) zusammen. Die beiden Dubletts stammen von den Protonen an Position 5 und 6 des Aglycons. Bei den beiden Dublett von Dubletts und bei dem Pseudotriplett handelt es sich um die Signale, die durch die Protonen an Position 9, 10 und 11 des Chromophors hervorgerufen werden.



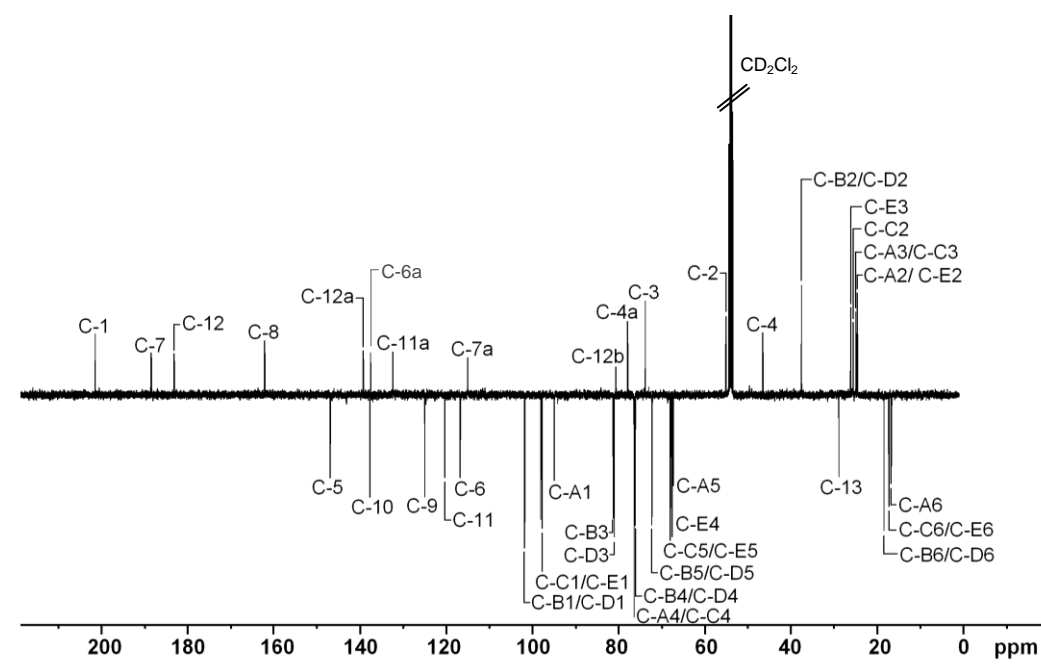
**Abbildung 5-9:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (0.2 – 3.8 ppm) von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben.



**Abbildung 5-10:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (3.8 – 8.0 ppm) von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben.

Abbildung 5-11 zeigt das  $^{13}\text{C}$ -APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3. Auch hier konnte die mit Hilfe der HR-Orbitrap-ESI-MS-Analysen vorhergesagte Anzahl an Kohlenstoffatomen verifiziert werden. Es sind insgesamt 49 Signale vorzufinden, von denen sechs eindeutig den bereits während der Analyse des  $^1\text{H}$ -Spektrums beschriebenen sechs Methylgruppen zugeordnet wurden. Des Weiteren sind zehn Methylengruppen im Bereich von 24.3 ppm bis 54.9 ppm und 22 Methingruppen im Bereich von 67.3 ppm bis 147.0 ppm vorhanden.

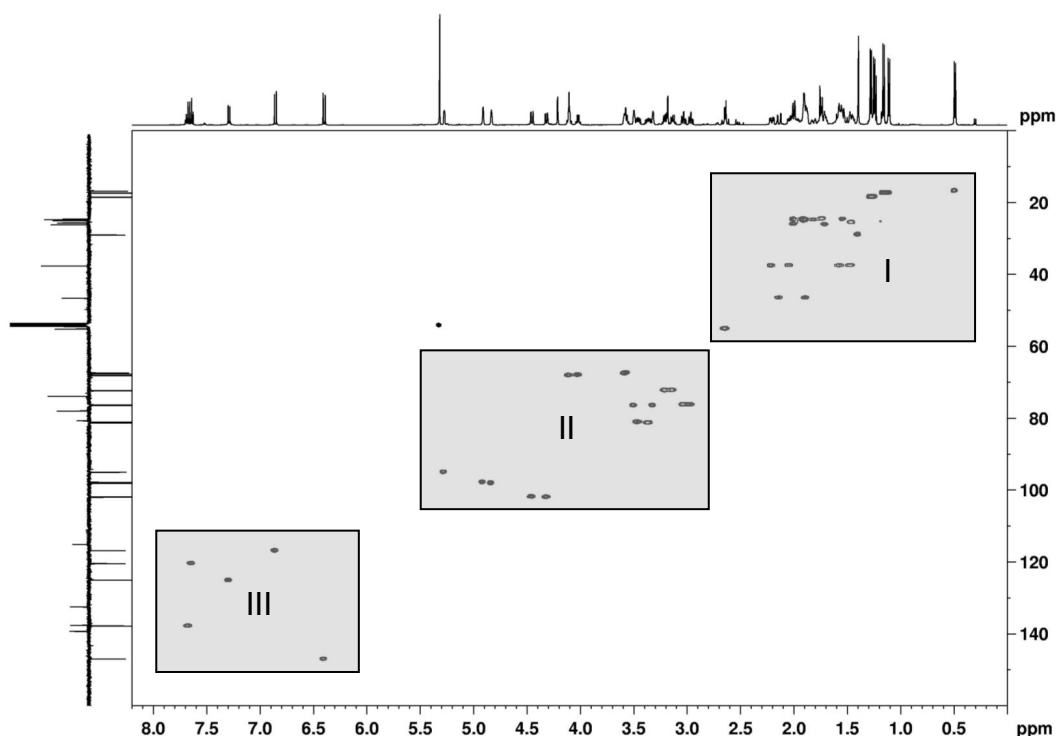
Die chemischen Verschiebungen von fünf dieser 22 Methingruppen bei 94.8 ppm, 97.7 ppm, 98.0 ppm, 101.7 ppm und 101.9 ppm sind charakteristisch für die anomeren Kohlenstoffatome der fünf Desoxyzucker. Weitere fünf Methinsignale konnten aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung den olefinischen bzw. aromatischen Kohlenstoffatomen im Aglycon zugeordnet werden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass elf quartäre Kohlenstoffatome vorhanden sind.



**Abbildung 5-11:**  $^{13}\text{C}$ -APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben.

### 5.3.2.2 Das HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3

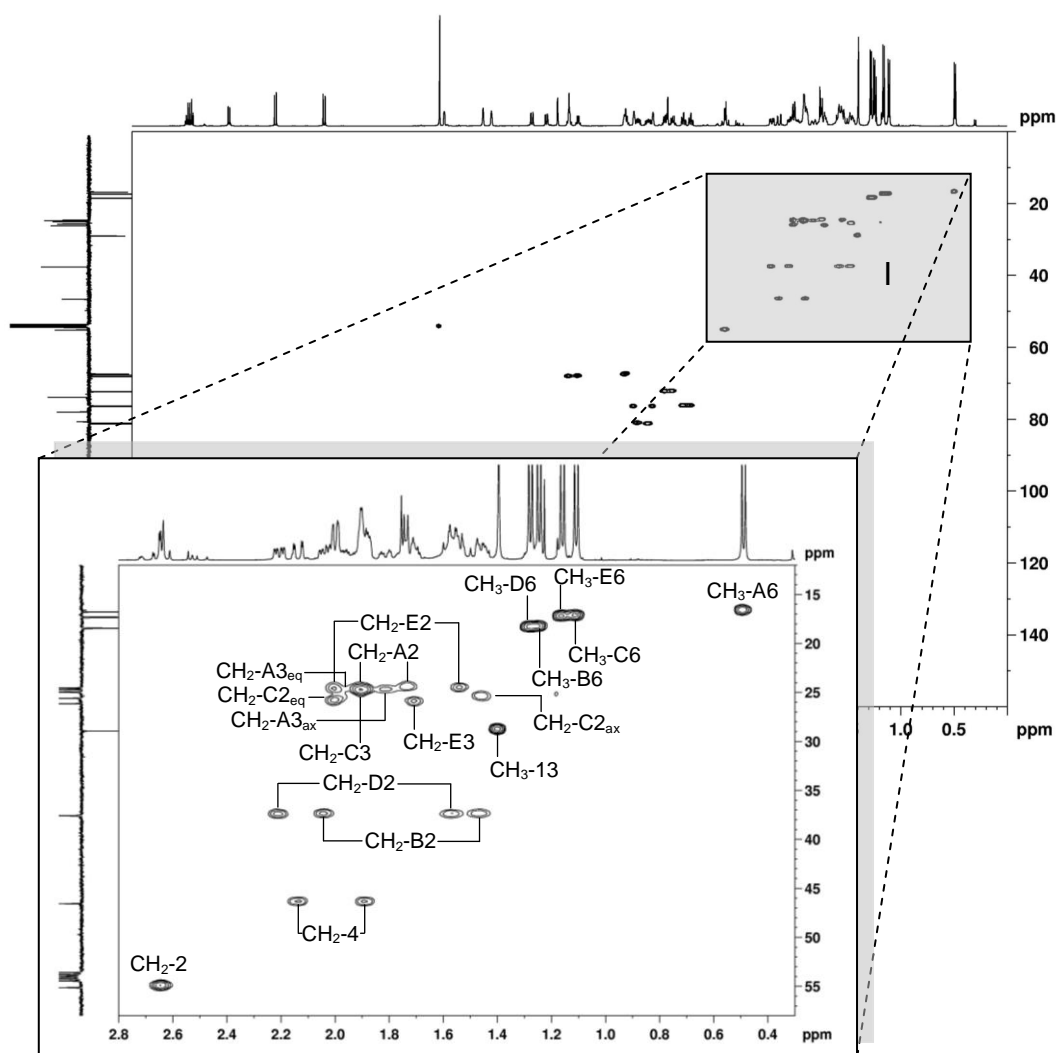
Die  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Konnektivitäten wurden anhand des zweidimensionalen heteronuklearen HSQC-NMR-Experiments aufgeklärt. Das in Abbildung 5-12 dargestellte HSQC-Spektrum zeigt 45 Signale, die der Übersicht halber in drei Bereiche eingeteilt und vergrößert wurden. Diese drei Bereiche sollen im Weiteren ausführlich diskutiert werden.



**Abbildung 5-12:** HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3.

Der Bereich I besitzt 23 Signale und ist in Abbildung 5-13 vergrößert abgebildet. Die Kopplungssignale ( $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ ) bei 0.49 ppm / 16.6 ppm, 1.11 ppm / 17.1 ppm, 1.16 ppm / 17.2 ppm, 1.25 ppm / 18.2 ppm, 1.28 ppm / 18.2 ppm und 1.39 ppm / 28.8 ppm konnten den bereits aus den eindimensionalen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren identifizierten Methylgruppen  $\text{CH}_3\text{-A6}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C6}$ ,  $\text{CH}_3\text{-E6}$ ,  $\text{CH}_3\text{-B6}$ ,  $\text{CH}_3\text{-D6}$  und  $\text{CH}_3\text{-13}$  zugeordnet werden. Bei den Signalen 1.46 & 1.98 ppm / 25.4 ppm, 1.47 & 2.04 ppm / 37.4 ppm, 1.54 & 2.00 ppm / 24.5 ppm, 1.56 & 2.21 ppm / 37.4 ppm und 1.72 & 1.89 ppm / 24.3 ppm handelt es sich um die Methylengruppen  $\text{CH}_2\text{-C2}$ ,  $\text{CH}_2\text{-B2}$ ,  $\text{CH}_2\text{-E2}$ ,  $\text{CH}_2\text{-D2}$  und  $\text{CH}_2\text{-A2}$  jeweils an Position 2 der Desoxyzucker. Die Kopplungssignale bei 1.71 ppm / 26.1 ppm, 1.81 & 1.97 ppm / 24.8 ppm und 1.90 ppm / 24.9 ppm gehören zu den Methylengruppen  $\text{CH}_2\text{-E3}$ ,  $\text{CH}_2\text{-A3}$  und  $\text{CH}_2\text{-C3}$  an Position 3 der

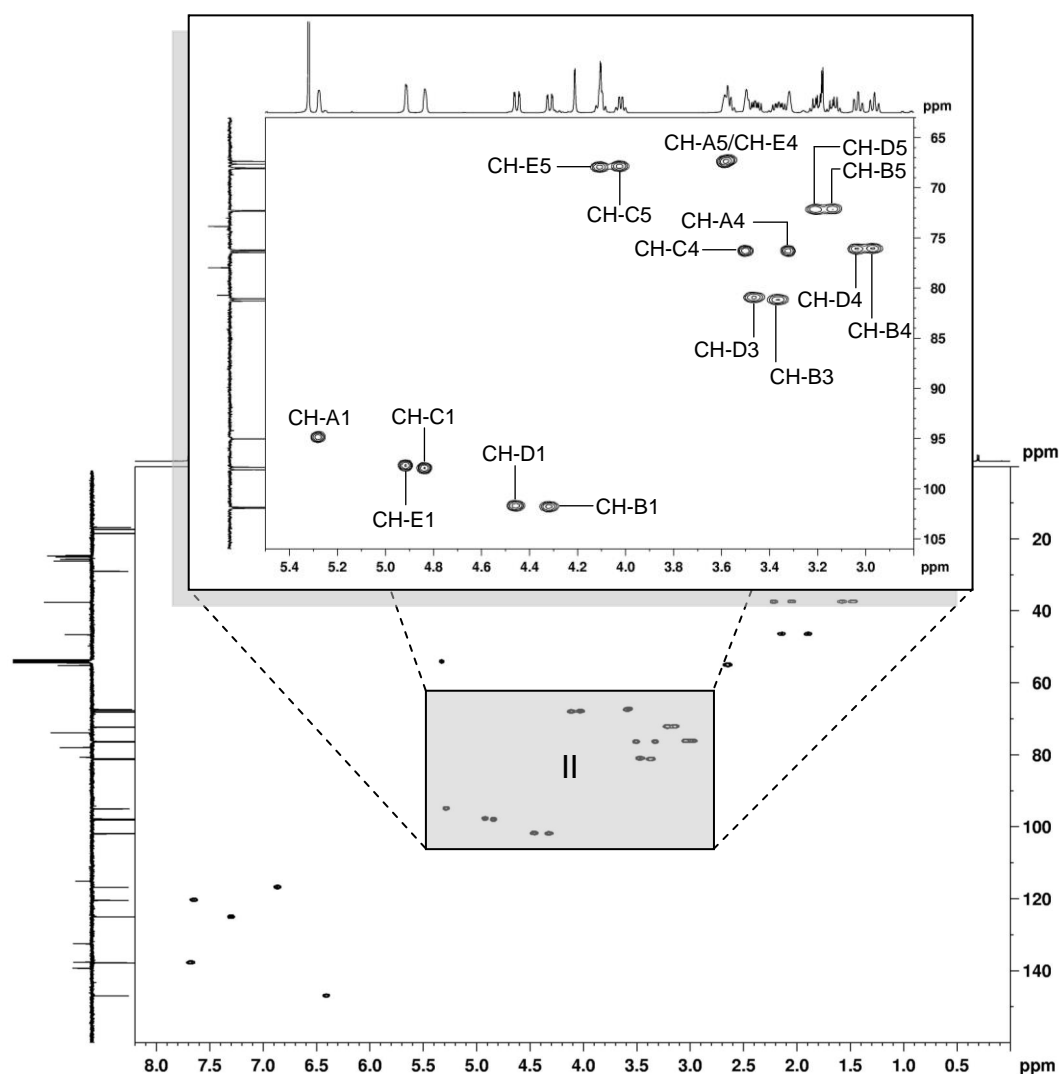
Tridesoxyzucker. Die Signale bei 1.89 & 2.13 ppm / 46.3 ppm und 2.62 & 2.66 ppm / 54.9 ppm stellen die beiden Methylengruppen an Position 4 und 2 des Angucyclin-Grundgerüsts dar. Dass die Protonen innerhalb einer Methylengruppe unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen, hat damit zutun, dass die Methylengruppe in einem fixierten Ringsystem einer Hexose liegt. Die Protonen dieser Methylengruppen besitzen also keine chemische Äquivalenz und sind daher diastereotop.



**Abbildung 5-13:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.3 – 2.8 ppm; F2: 12 – 58 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben.

Im Bereich II, dessen vergrößerte Darstellung in Abbildung 5-14 zu sehen ist, sind 17 Signale vorhanden. Die Kopplungssignale ( $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ ) bei 2.96 ppm / 76.1 ppm,

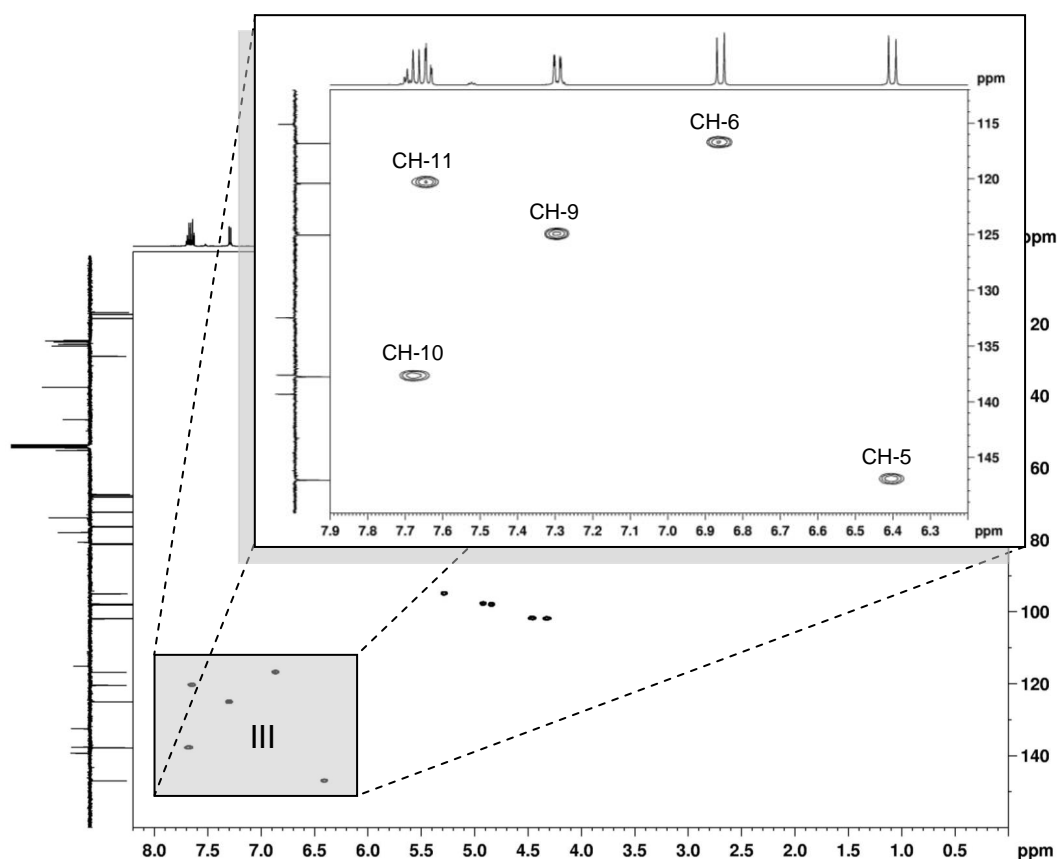
3.03 ppm / 76.1 ppm, 3.32 ppm / 76.4 ppm, 3.49 ppm / 76.4 ppm und 3.58 ppm / 67.7 ppm konnten den oxygenierten Methingruppen CH-B4, CH-D4, CH-A4, CH-C4 und CH-E4 an Position 4 der fünf Desoxyzucker zugeordnet werden. Die Signale bei 3.14 ppm / 72.0 ppm, 3.21 ppm / 71.9 ppm, 3.56 ppm / 67.3 ppm, 4.02 ppm / 67.9 ppm und 4.10 ppm / 68.1 ppm beschreiben die Methingruppen CH-B5, CH-D5, CH-A5, CH-C5 und CH-E5 an Position 5 der fünf Desoxyzucker. Die dicht nebeneinander auftretenden Kopplungssignale bei 3.36 ppm / 81.2 ppm und 3.46 ppm / 81.1 ppm wurden den  $^1J$ -Kopplungen CH-B3 und CH-D3 zugeordnet. Die Signalgruppe mit den Signalen bei 4.32 ppm / 101.9 ppm, 4.45 ppm / 101.7 ppm, 4.84 ppm / 98.0 ppm, 4.91 ppm / 97.7 ppm und 5.27 ppm / 94.8 ppm gehört zu den fünf anomeren Methingruppen CH-B1, CH-D1, CH-C1, CH-E1 und CH-A1.



**Abbildung 5-14:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1: 2.8 – 5.5 ppm; F2: 63 – 106 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker.



Abbildung 5-15 zeigt den vergrößerten Bereich III, in dem die tieffeldverschobenen olefinischen und aromatischen Methingruppen wiederzufinden sind. Die beiden Signale bei 6.40 ppm / 147.0 ppm und 6.86 ppm / 116.8 ppm sind den  $^1J(^1\text{H},^{13}\text{C})$ -Konnektivitäten der olefinischen Methingruppen an Position 5 und 6 zuzuschreiben. Die restlichen Signale befinden sich bei 7.29 ppm / 125.0 ppm, 7.63 ppm / 120.4 ppm und 7.68 ppm / 137.8 ppm und wurden als die aromatischen CH-Gruppen CH-9, CH-11 und CH-10 identifiziert.



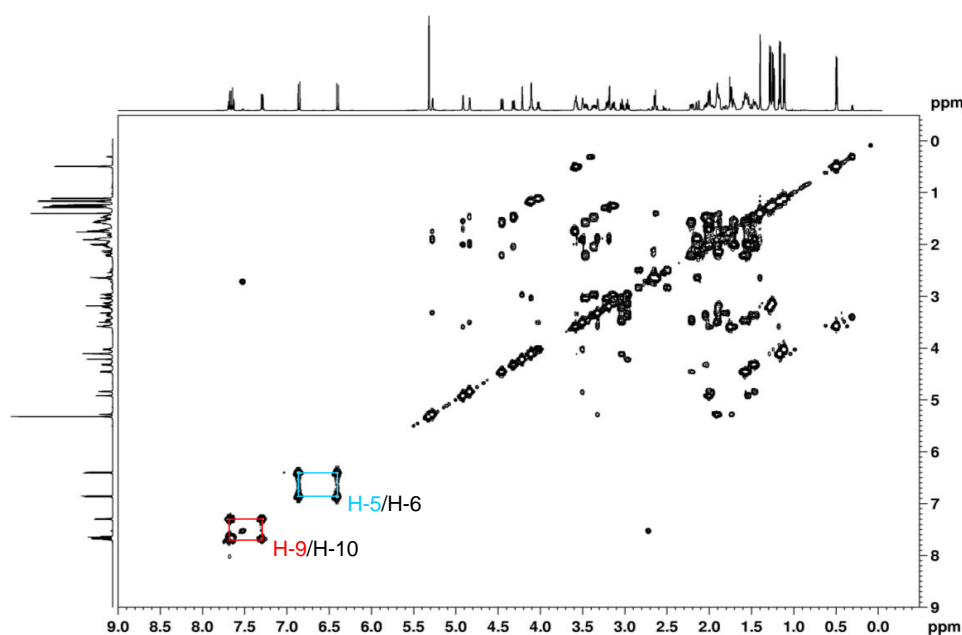
**Abbildung 5-15:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 6.2 – 7.9 ppm; F2: 112 – 150 ppm). Die Zahlenbezeichnung beschreibt die Signale des Aglycons.

Fasst man die bisher gewonnenen Informationen aus den  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR- und HSQC-Spektren zusammen, besitzt das Langkocyclin A3 sechs Methylgruppen, zehn Methylengruppen, 22 Methingruppen und elf quartäre Kohlenstoffatome. Außerdem hat man die Information, dass es sich bei den 22 Methingruppen um 17 oxygenierte und fünf olefinische bzw. aromatische Methingruppen handelt. Des Weiteren kann man bei drei quartären Kohlenstoffatomen ( $\delta_{\text{C-1}}=201.7$  ppm,

$\delta_{C-7}=188.6$  ppm und  $\delta_{C-12}=183.3$  ppm) aufgrund der hohen Tieffeldverschiebung davon ausgehen, dass es sich um Carbonylkohlenstoffe handeln muss. Wie bereits in Kapitel 5.3.2.1. angesprochen wurde, sind fünf Hydroxygruppen in den  $^1\text{H}$ -Spektren vorzufinden. Aus all diesen Ergebnissen kommt man für Langkocyclin A3 auf eine Teilsummenformel von  $\text{C}_{49}\text{H}_{65}\text{O}_x$ .

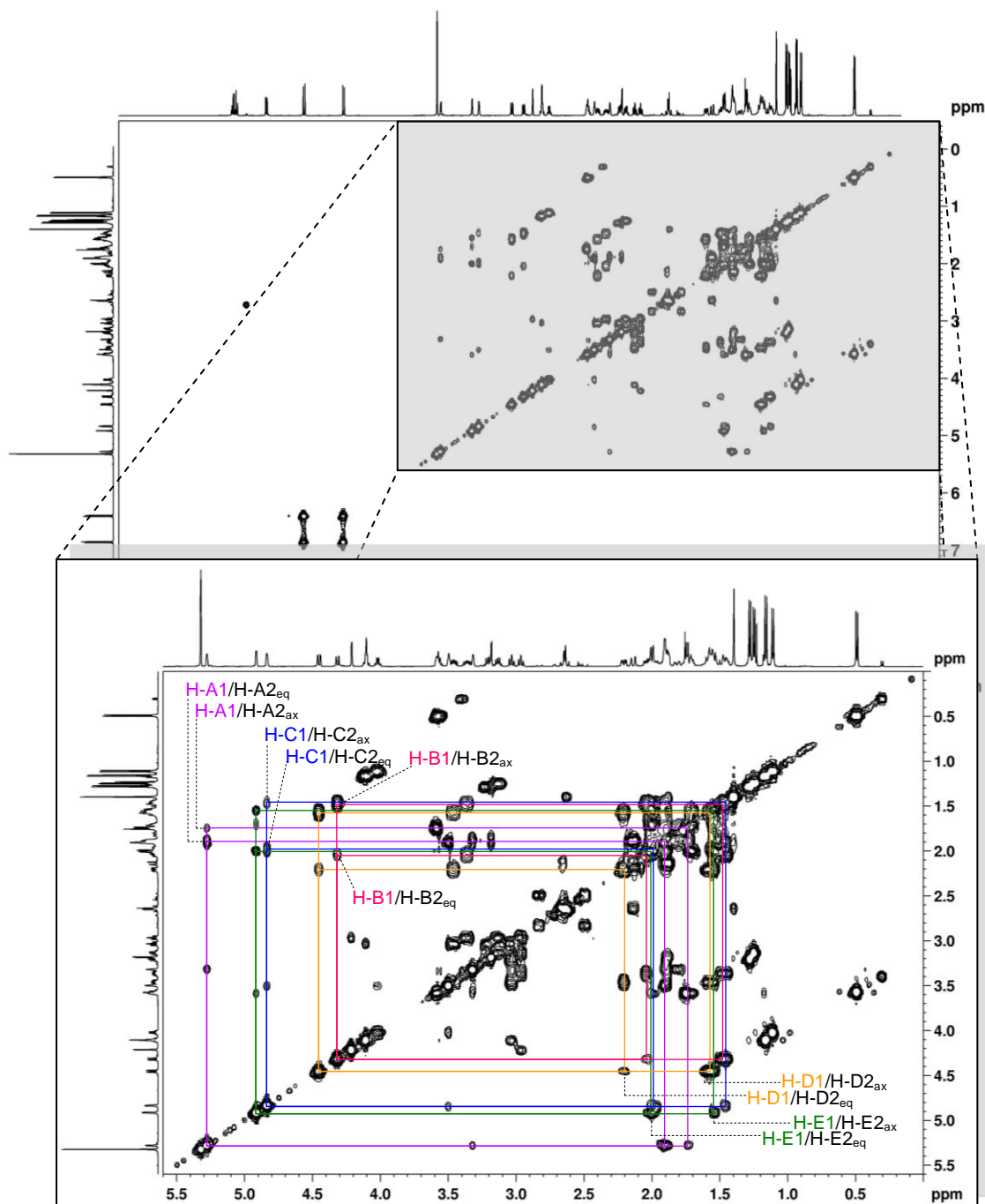
### 5.3.2.3 Das COSY-Spektrum von Langkocyclin A3

Die Ermittlung der  $^3J(^1\text{H},^1\text{H})$ -Konnektivitäten erfolgte mit Hilfe des  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Experiments. Abbildung 5-16 zeigt das COSY-Spektrum von Langkocyclin A3. Die in den Abbildungen 5-16 bis 5-19 farbig eingezeichneten Kreuzkopplungen sind der Übersicht halber in Abbildung 5-20 mit der gleichen Farbe in der Langkocyclin A3-Strukturformel gekennzeichnet. In Abbildung 5-16 sind zwei Kreuzsignale eingezeichnet. Das Proton H-5 zeigt ein Kreuzsignal bei 6.40 ppm / 6.86 ppm, das auf eine  $^3J$ -Kopplung mit H-6 zurückzuführen ist. Das Kreuzsignal bei 7.29 ppm / 7.68 ppm kommt aufgrund der Kopplung von H-9 mit H-11 zustande. Die Kopplung zwischen H-10 und H-11 ist ebenfalls detektierbar, allerdings ist es aufgrund der sehr nah beieinander liegenden Signale (7.63 ppm und 7.68 ppm) nicht möglich diese Kopplung einzuzeichnen. Um die Zuordnung der weiteren Signale besser darzustellen, wurden diese Bereiche in den Abbildungen 5-17 bis 5-19 vergrößert abgebildet.



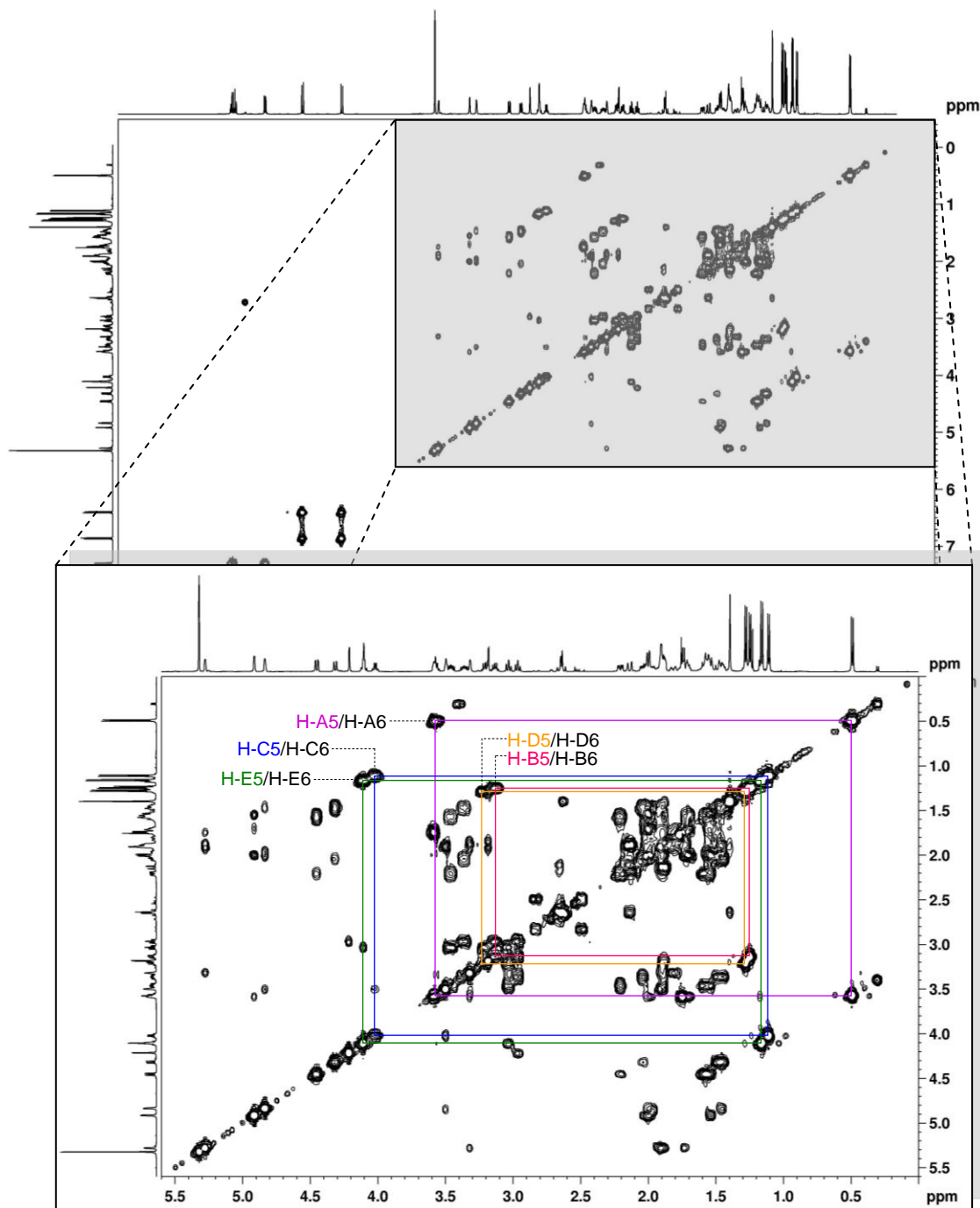
**Abbildung 5-16:** COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung zwei identifizierter Signale, die zu den Protonen des Aglycons gehören.

In Abbildung 5-17 ist der vergrößerte Bereich (F1, F2: 0.0 – 5.6 ppm) des  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrums gezeigt. Hier sind die Kreuzsignale der anomeren Protonen mit den axial und äquatorial stehenden Protonen an den Positionen 2 der Desoxyzucker eingezeichnet. Die Signale liegen bei 1.72 & 1.89 ppm / 5.27 ppm für H-A1, bei 1.54 & 2.00 ppm / 4.91 ppm für H-E1, bei 1.46 & 1.98 ppm / 4.84 ppm für H-C1, bei 1.56 & 2.21 ppm / 4.45 ppm für H-D1 und bei 1.47 & 2.04 ppm / 4.32 ppm für H-B1.

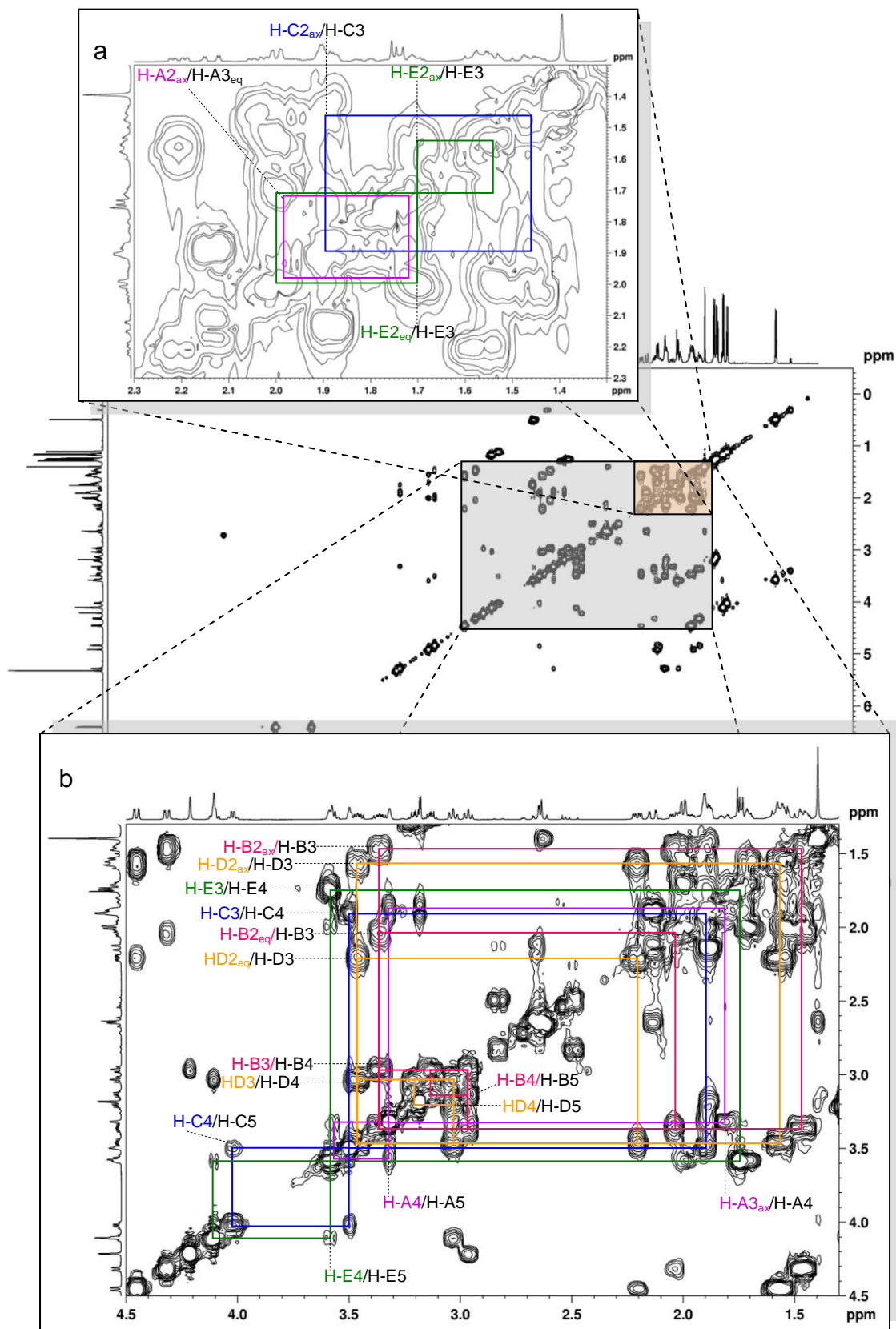


**Abbildung 5-17:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1, F2: 0.0 – 5.6 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker.

In Abbildung 5-18 wurde der gleiche Bereich wie in Abbildung 5-17 vergrößert. Markiert wurden diesmal die Kreuzsignale der Protonen an Position 5 der Desoxyzucker mit den sich an Position 6 befindenden Methylgruppen. Die Signale sind bei 4.10 ppm / 1.16 ppm für H-E5, bei 4.02 ppm / 1.11 ppm für H-C5, bei 3.56 ppm / 0.49 ppm für H-A5, bei 3.21 ppm / 1.28 ppm für H-D5 und bei 3.14 ppm / 1.25 ppm für H-B5 vorzufinden.

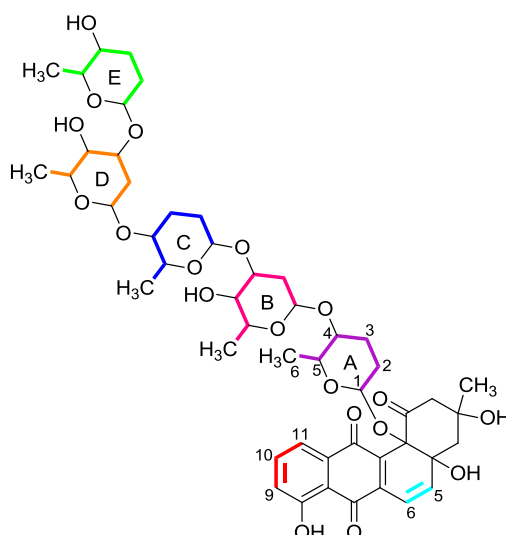


**Abbildung 5-18:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1, F2: 0.0 – 5.6 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker.



**Abbildung 5-19:** Ausschnitte aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich a: (F1, F2: 1.3 – 2.3 ppm), Bereich b: (F1, F2: 1.3 – 4.5 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker.

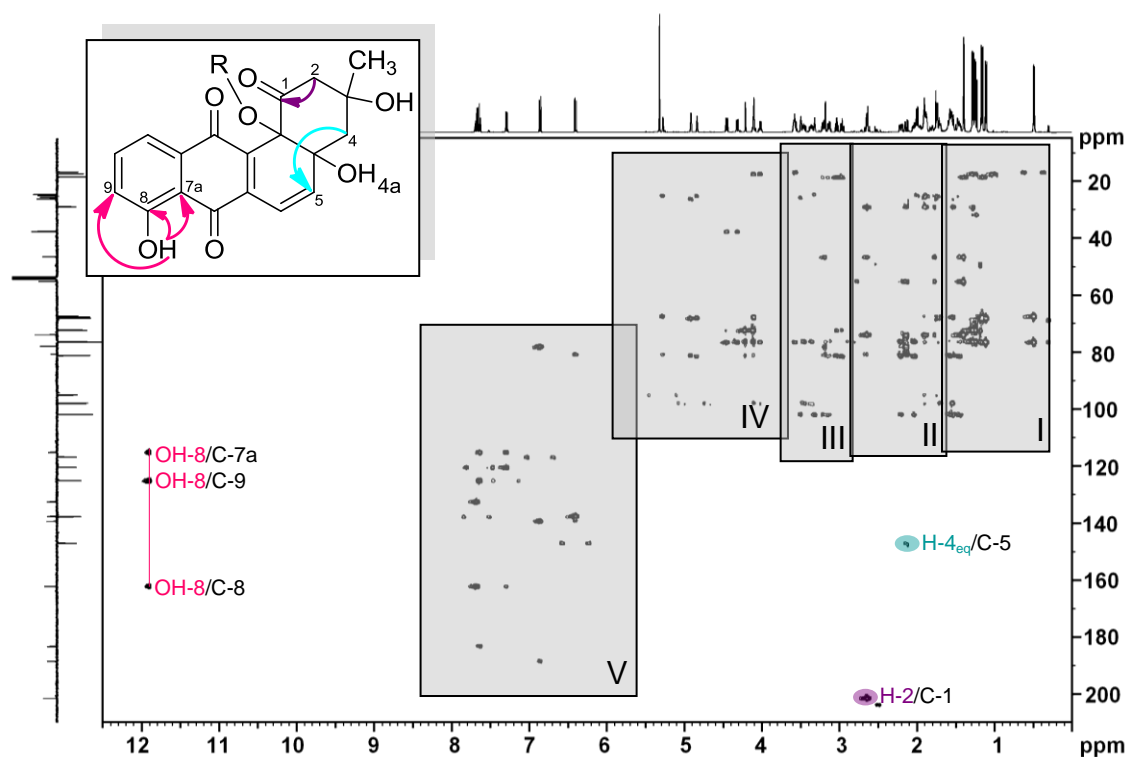
Abbildung 5-19 stellt die beiden vergrößerten Bereiche a (F1, F2: 1.3 – 2.3 ppm) und b (F1, F2: 1.3 – 4.5 ppm) dar. Im Bereich a sind die Kreuzsignale der Protonen an Position 2 der Tridesoxyzucker mit den Protonen der Methylengruppen an Position 3 gezeigt. Die Signale befinden sich bei 1.54 & 2.00 ppm / 1.71 ppm für H-E2<sub>ax/eq</sub>, bei 1.72 ppm / 1.97 ppm für H-A2<sub>ax</sub> und bei 1.46 ppm / 1.90 ppm für H-C2<sub>ax</sub>. Der Bereich b hingegen zeigt die Kreuzsignale der Protonen an Position 2 der Didesoxyzucker mit den Protonen der Methingruppen an Position 3. Diese liegen bei 1.47 & 2.04 ppm / 3.36 ppm für H-B2<sub>ax/eq</sub> und bei 1.56 & 2.21 ppm / 3.46 ppm für H-B2<sub>ax/eq</sub>. Außerdem kann man in diesem Bereich erkennen, dass die Protonen an Position 3 der fünf Desoxyzucker mit den Protonen der Methingruppen an Position 4 koppeln. Diese Kopplungen sind bei 1.71 ppm / 3.58 ppm für H-E3, bei 1.90 ppm / 3.49 ppm für H-C3, bei 1.81 ppm / 3.32 ppm für H-A3<sub>ax</sub>, bei 3.36 ppm / 2.96 ppm für H-B3 und bei 3.46 ppm / 3.03 ppm für H-D3 vorzufinden. Die letzte Kreuzsignalgruppe entsteht aus der Kopplung der Protonen der Methingruppen an Position 4 der Desoxyzucker mit den Protonen der Methingruppen an Position 5. Die Signale befinden sich bei 2.96 ppm / 3.14 ppm für H-B4, bei 3.03 ppm / 3.21 ppm für H-D4, bei 3.32 ppm / 3.56 ppm für H-A4, bei 3.49 ppm / 4.02 ppm für H-C4 und bei 3.58 ppm / 4.10 ppm für H-E4. Die Zusammenfassung der in diesem Experiment gewonnenen Ergebnisse führt zu der Erkenntnis, dass im Langkocyclin A3 sieben Spinsysteme vorhanden sind. Es handelt sich hierbei um die Spinsysteme H-5-H-6, H-9-H-10-H-11, H-A1-H-A2-H-A3-H-A4-H-A5-H-A6, H-B1-H-B2-H-B3-H-B4-H-B5-H-B6, H-C1-H-C2-H-C3-H-C4-H-C5-H-C6, H-D1-H-D2-H-D3-H-D4-H-D5-H-D6 und H-E1-H-E2-H-E3-H-E4-H-E5-H-E6.



**Abbildung 5-20:** COSY-Kopplungen von Langkocyclin A3.

### 5.3.2.4 Das HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3

Die ausschlaggebenden Informationen zur Strukturaufklärung von Langkocyclin A3 wurden mit Hilfe des HMBC-Experiments gewonnen. In Abbildung 5-21 ist das HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 veranschaulicht. Eingezeichnet in pink sind die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung von dem Proton der Hydroxyfunktion an Position 8 zum quartären Kohlenstoffatom C-8 und die beiden  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen zu dem quartären C-Atom C-7a und dem tertiären C-Atom der aromatischen Methingruppe an Position 9. Außerdem sind die  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung vom äquatorial stehenden Proton der Methylengruppe an Position 4 mit dem tertiären C-5 und die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung von den Protonen der Methylengruppe an Position 2 mit dem Carbonylkohlenstoffatom C-1 gekennzeichnet. Das Spektrum wurde der Übersicht halber in fünf Bereiche (I-V) unterteilt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

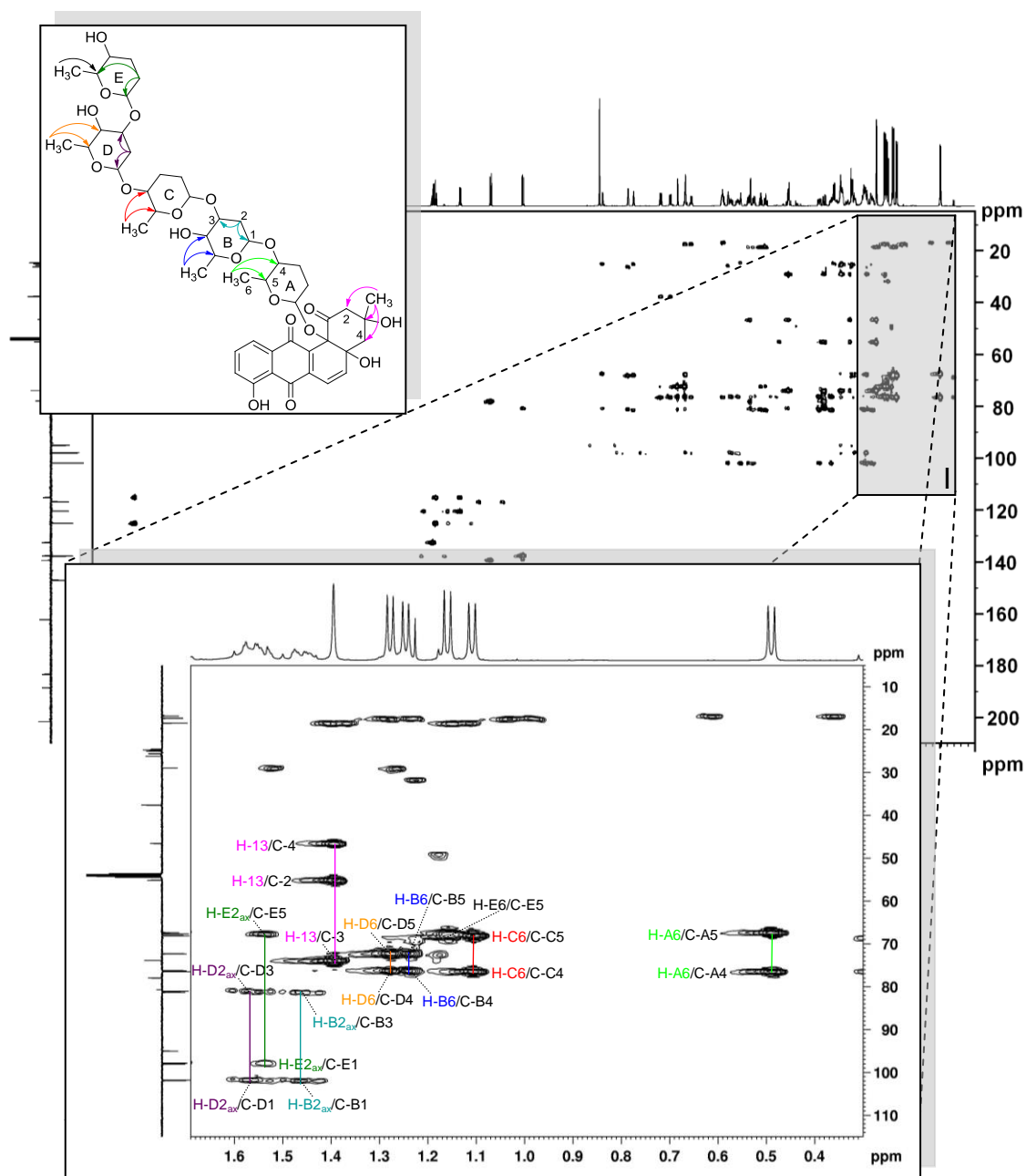


**Abbildung 5-21:** HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3.

In Abbildung 5-22 ist der vergrößerte Bereich I (F1: 0.30 – 1.69 ppm; F2: 5 – 115 ppm) abgebildet. In diesem Bereich sind die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen aller Methylgruppen der Desoxyzucker zu den tertiären Kohlenstoffatomen an den Positionen 5 zu finden. Außerdem wurden für die Zucker A-D die  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen zu den

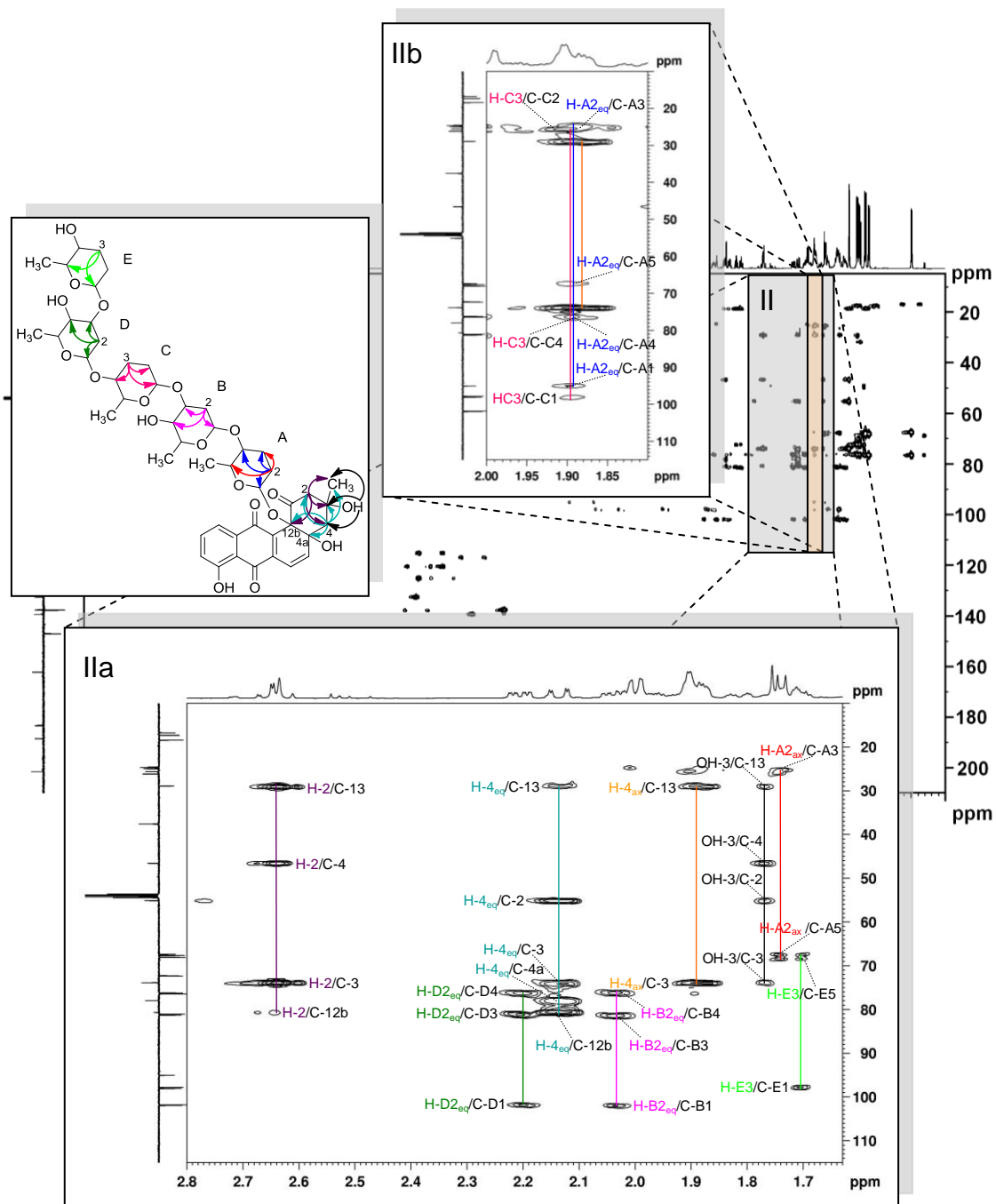


Kohlenstoffatomen der oxygenierten Methingruppen an Position 4 der Desoxyzucker detektiert. Die Protonen der Methylgruppe an Position 3 des Aglycons zeigen ebenfalls eine  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zum quartären C-3 und  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen C-2 und C-4 der beiden Methylengruppen des Chromophors. Ferner sind die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen der axial stehenden Protonen an Position 2 der Didesoxyzucker B und D zu den anomeren Kohlenstoffatomen C-B1 und C-D1, so wie zu den tertiären C-B3- und C-D3-Atomen vorhanden. Schließlich sind die *long range*-Kopplungen vom axialen Proton H-E<sub>2ax</sub> zu C-E1 und C-E5 ersichtlich.



**Abbildung 5-22:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.30 – 1.69 ppm; F2: 5 – 115 ppm).



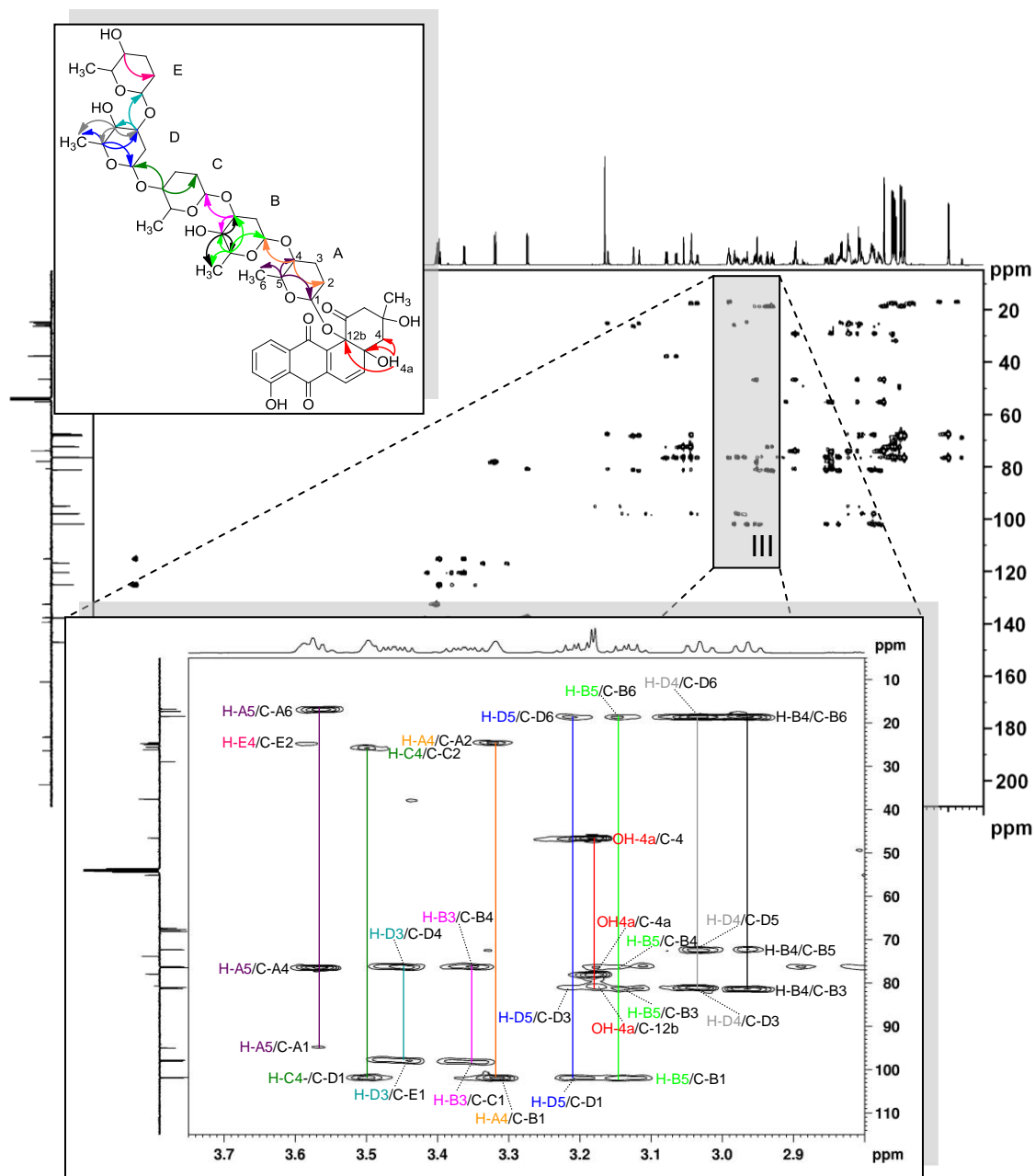


**Abbildung 5-23:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IIa (F1: 1.63 – 2.80 ppm; F2: 10 – 115 ppm), Bereich IIb (F1: 1.80 – 2.00 ppm; F2: 10 – 115 ppm).

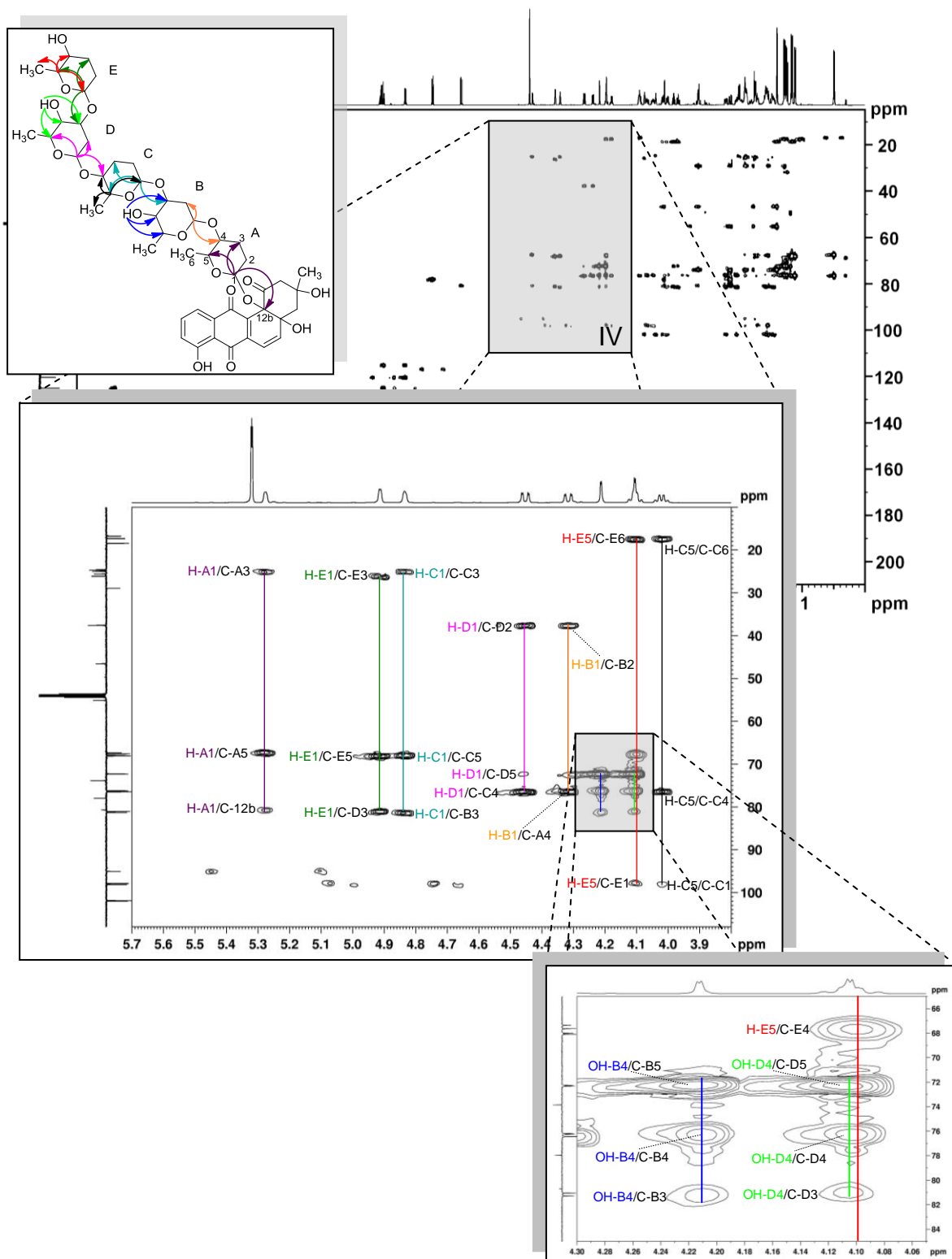
Abbildung 5-23 zeigt den vergrößerten Bereich II. Aus Übersichtsgründen wurde der Zoomfaktor des Ausschnittes IIa (F1: 1.63 – 2.80 ppm; F2: 10 – 115 ppm) bei der Darstellung halbiert. Die aus diesem Grund im Ausschnitt IIa fehlenden HMBC-Signale von H-A2<sub>eq</sub> und H-C3 wurden separat mit dem Zoomfaktor des Originalspektrums in Ausschnitt IIb (F1: 1.80 – 2.00 ppm; F2: 10 – 115 ppm) dargestellt. Im Bereich II wurden sowohl die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung des axial stehenden Protons H-A2<sub>ax</sub> zu C-A3 und die  $^4J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-A5 als auch die  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen des äquatorialen Protons H-A2<sub>eq</sub> zu C-A1 und C-A3 und die  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-A4 detektiert. Darüber hinaus zeigt das Proton H-B2<sub>eq</sub> Kopplungssignale zu C-B1, C-B3 und C-B4 und Proton H-D2<sub>eq</sub> zu C-D1, C-D3 und C-D4. Außerdem sind Kopplungen von H-C3 zu C-C1, C-C2 und C-C4 und von H-E3 zu C-E1 und C-E5 zu beobachten. Gezeigt sind zusätzlich die Kopplungen von den Protonen der Methylengruppe an Position 2 des Aglycons zu C-3, C-4, C-12b und C-13 und die Kopplungen des äquatorial stehenden Protons der Methylengruppe an Position 4 zu C-2, C-3, C-4a, C-12b und C-13. Als Letztes sind die Kopplungen von dem Proton der Hydroxygruppe OH-3 zu C-2, C-3, C-4 und C-13 zu sehen. Nicht im Molekül eingezeichnet, aber trotzdem im HMBC-Spektrum gekennzeichnet sind die Kopplungen von H-4<sub>ax</sub> zu C-3 und C-13.

In Abbildung 5-24 ist der Bereich III (F1: 2.80 – 3.75 ppm; F2: 5 – 115 ppm) gezeigt. In diesem Bereich ist eine der für dieses Molekül wichtigsten Informationen wiederzufinden, nämlich wie die einzelnen Saccharide miteinander verknüpft sind. Die Verknüpfungen konnten anhand der  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen von H-A4 zu C-B1, von H-B3 zu C-C1, von H-C4 zu C-D1 und von C-D3 zu C-E1 identifiziert werden. Somit handelt es sich um eine Saccharidkette, die abwechselnd aus 2,3,6-Tridesoxyzuckern und 2,6-Didesoxyzuckern besteht, beginnend und endend mit dem Tridesoxyzucker. Bei den Tridesoxyzuckern A, C und E liegt eine 1,4-Verknüpfung vor und bei den Didesoxyzuckern B und D eine 1,3-Verknüpfung. Des Weiteren sind die  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen der Methin-Protonen an Position 4 aller Tridesoxyzucker (A, B und C) zu dem Kohlenstoffatom an Position 2 des entsprechenden Zuckers wiederzufinden. Vom Proton H-A5 der Methingruppe an Position 5 des Zuckers A sind Kopplungen zu C-A1, C-A4 und C-A6 vorhanden. Auch sind Kopplungen von H-B4 zu C-B3, C-B5 und C-B6 bzw. von H-D4 zu C-D3, C-D5 und C-D6 zu beobachten. Ebenso wurden die Kopplungen von H-B5 zu C-B1, C-B3, C-B4 und C-B6 und von H-D5 zu C-D1, C-D3 und C-D6 detektiert. Zuletzt sind in diesem Bereich die Kopplungssignale von

dem Proton der Hydroxyfunktion OH-4a an Position 4a des Chromophors zu den beiden quartären Kohlenstoffatomen C-4a und C-12b und zu dem sekundären C-4-Atom zu sehen.



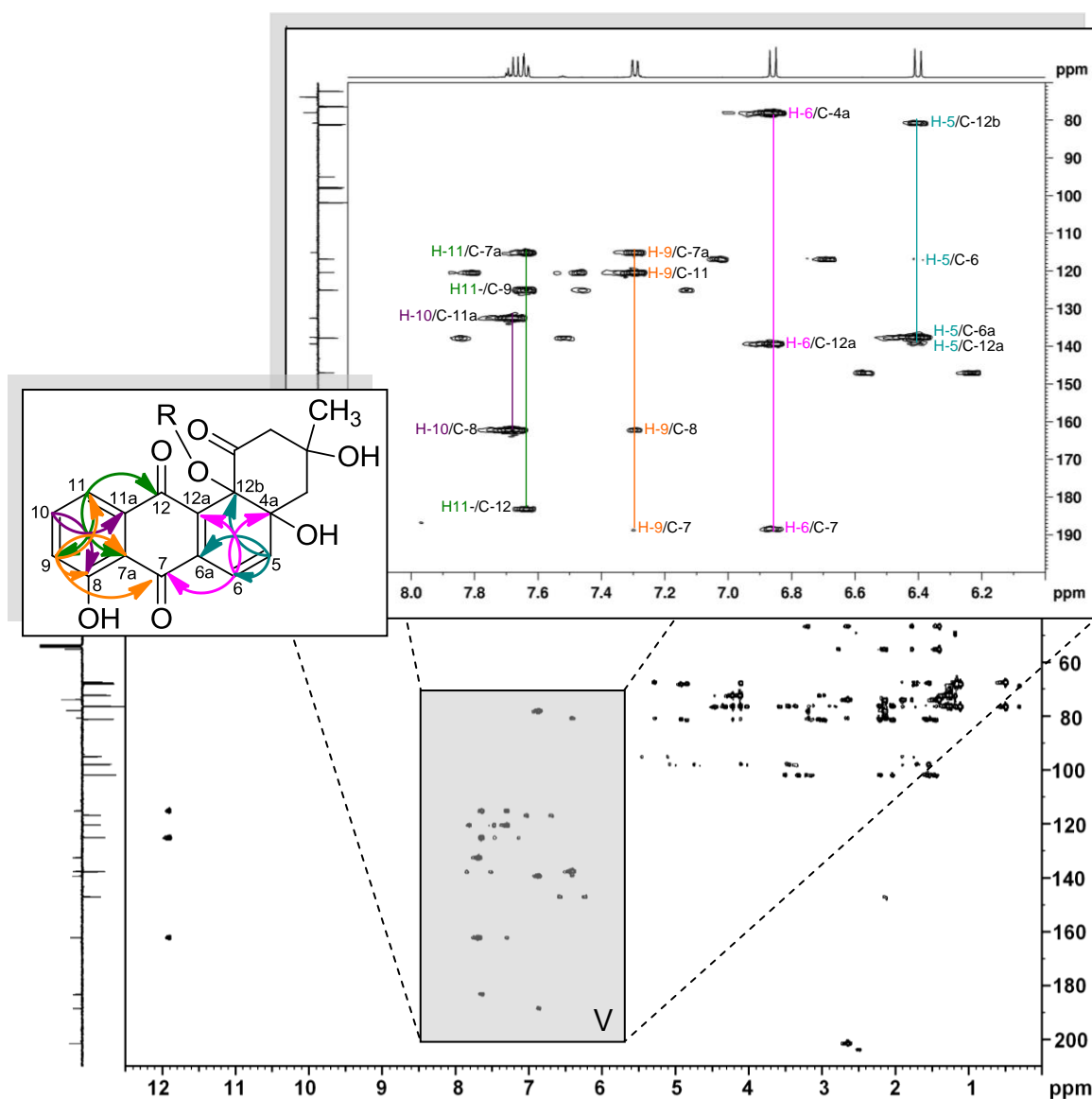
**Abbildung 5-24:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 2.80 – 3.75 ppm; F2: 5 – 115 ppm).



**Abbildung 5-25:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 3.8 – 5.7 ppm; F2: 10 – 110 ppm).

Abbildung 5-25 stellt den vergrößerten Bereich IV dar. In diesem Bereich wurden all die von den anomeren Protonen der Tridesoxyzucker A, C und E aus möglichen

$^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen gefunden. Somit wurde herausgefunden, dass die Zuckerkette mit dem quartären Kohlenstoffatom C-12b verknüpft ist. Das anomere Proton H-B1 des Didesoxyzuckers B weist eine  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-B2 und eine  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-A4 auf. Das anomere Proton H-D1 hingegen koppelt zu C-C4, C-D2 und C-D5. Das Proton der Methingruppe H-C5 an Position 5 des Zuckers C zeigt Kopplungen zu C-C1, C-C4 und C-C6 und das Proton H-E5 des Zuckers E zu C-E1, C-E4 und C-E6. Ebenfalls zu sehen sind die Kopplungen der Protonen der Hydroxyfunktion OH-B4 und OH-D4 an Position 4 der Didesoxyzucker zu jeweils C-B3, C-B4 und C-B5 bzw. C-D3, C-D4 und C-D5.



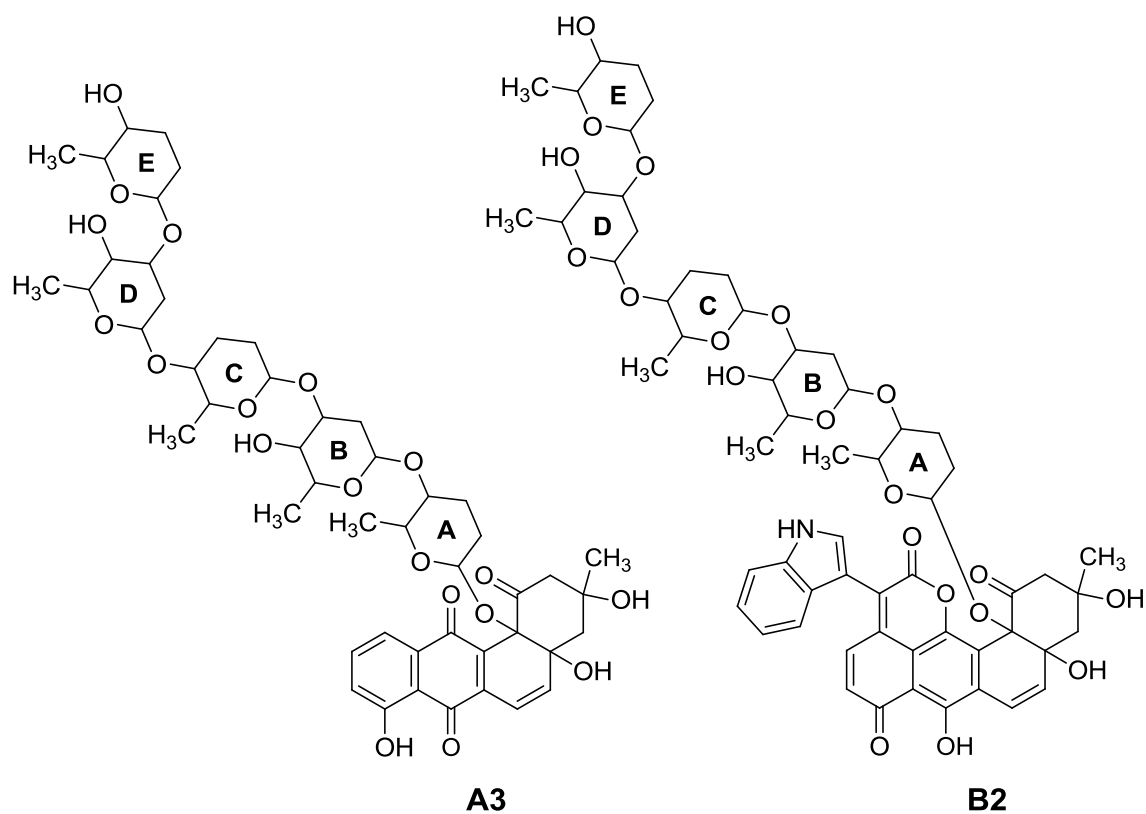
**Abbildung 5-26:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 6.0 – 8.2 ppm; F2: 70 – 198 ppm).

In Abbildung 5-26 sind ausschließlich die Kopplungen der olefinischen und aromatischen Protonen des Polyketidgerüsts zu finden. Das Proton der olefinischen Methingruppe an Position 5 zeigt Kopplungen zu C-6, C-6a, C-12a und C-12b und das Proton an Position 6 zu C-4a, C7 und C-12a. Die  $^4J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung des Protons H-5 ist aus Übersichtsgründen nicht im Molekül eingezeichnet. Proton H-9 koppelt über eine  $^2J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-8, zwei  $^3J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungen zu C-7a und C-11 und eine schwache  $^4J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung zu C-7. Von Proton H-10 sind Kopplungen zu C-8 und C-11a zu sehen und von Proton H-11 zu C-7a, C-9 und C-12.

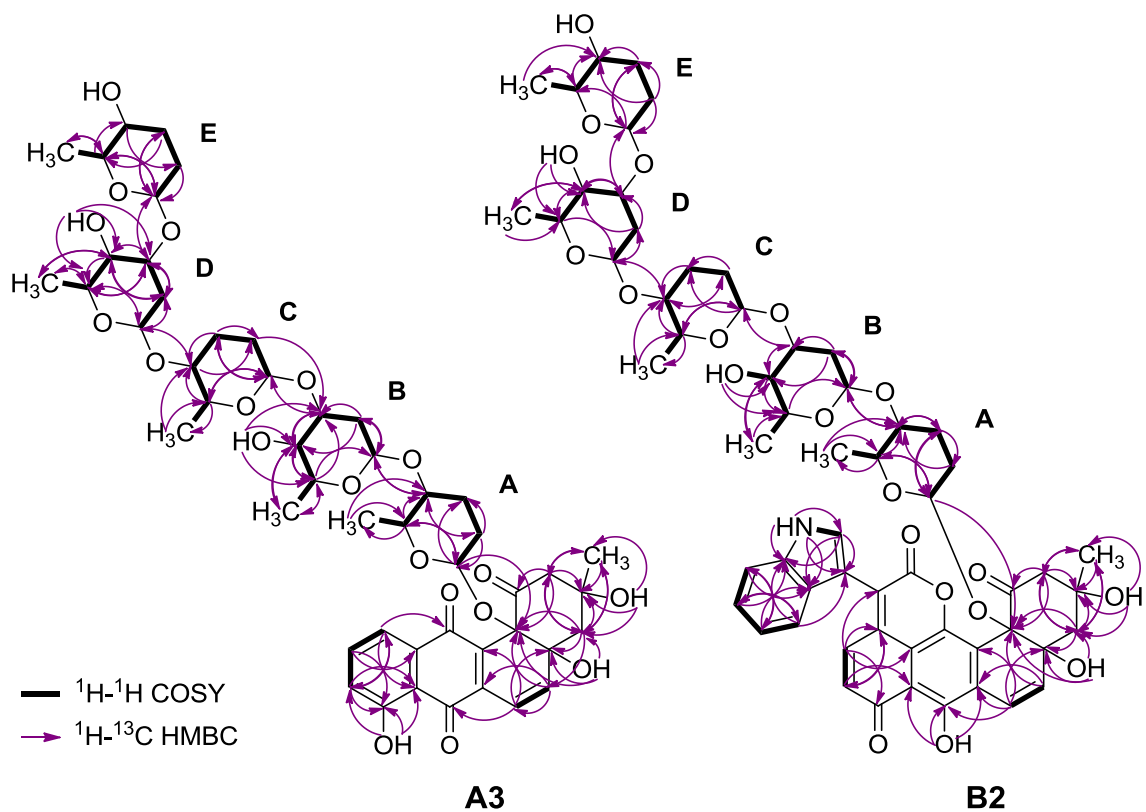
### 5.3.3 Strukturen der Langkocycline

Anhand der in dem Kapitel 5.3.2 am Beispiel von Langkocyclin A3 detailliert aufgeführten Auswertung der NMR-Spektren war es möglich, die Struktur der Langkocycline aufzuklären. Es stellte sich heraus, dass die Langkocycline A1 (**1**), A2 (**2**) und A3 (**3**) eine strukturelle Verwandtschaft zu Urdamycin A besitzen. Sie verfügen über das gleiche Aglycon wie Urdamycin A, jedoch ist die Saccharidkette der Langkocycline an einer anderen Position mit dem Aglycon verknüpft. Bei den Langkocyclinen liegt an Position 9 ein Proton anstelle eines C-glykosidisch gebundenen Trisaccharids vor. Wie bei Urdamycin K<sup>[111]</sup> (Abbildung 5-37), das ein O-Glykosid an Position C-12b trägt, sind die Desoxyzucker der Langkocycline in Form einer einzigen Saccharidkette ebenfalls an das Kohlenstoffatom C-12b gebunden. Bei den Urdamycinen ist an Position 12b ein Tridesoxyzucker gebunden, wie auch bei den Langkocyclinen. Allerdings ist die Zuckerkette an Position 12b auf einen Zucker reduziert. Die Langkocycline A1-A3 unterscheiden sich in der Länge der Saccharidkette. Im Gegensatz zur O-glykosidisch gebundenen Pentasaccharidkette des Langkocyclins A3 ist beim Langkocyclin A1 eine Disaccharidkette vorzufinden und beim Langkocyclin A2 eine Tetrasaccharidkette. Im Vergleich zu den Langkocyclinen A1-A3 besitzen die Langkocycline B1 und B2 einen aus Tryptophan hergestellten indolbasierten Rest im Aglycon vergleichbar mit dem Aglycon von Urdamycin D (Abbildung 5-37).<sup>[112]</sup> Auch die Langkocycline B1 und B2 variieren in der Länge der Saccharidkette. So besitzt das Langkocyclin B1 eine O-glykosidisch gebundene Tetrasaccharidkette und das Langkocyclin B2 eine Pentasaccharidkette. Abbildung 5-27 zeigt die Strukturen,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Korrelationen der Langkocycline A3 und B2, den Vertretern mit den längsten Saccharidketten.

I)



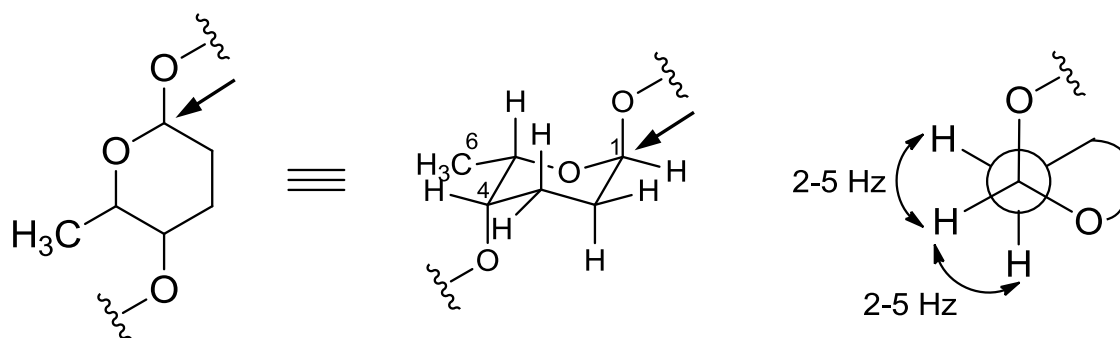
II)



**Abbildung 5-27:** I) Strukturen der Langkocycline A3 (3) und B2 (5). II)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Korrelationen der Langkocycline A3 (3) und B2 (5).

### 5.3.4 Konfigurationsbestimmung der Zucker

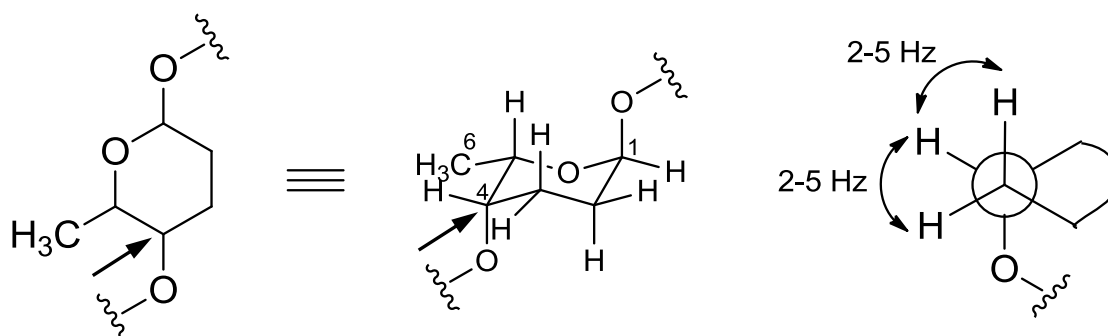
Da die Protonen an Position 1 und 4 der 2,3,6-Tridesoxyhexosen jeweils ein breites Signal im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufwiesen, war es nicht möglich die exakten Kopplungskonstanten dieser Protonen zu bestimmen. Allerdings konnten in Anlehnung an die Halbwertsbreiten der Signale die ungefähren Größen der Kopplungskonstanten abgeschätzt werden. In nicht-aromatischen Sechsring-Systemen beträgt die  $^3J$ -Kopplungskonstante von zwei vicinalen Protonen, die beide jeweils axial angeordnet sind, 9-12 Hz. Die Kopplungskonstante bei einer äquatorial-axialen- bzw. äquatorial-äquatorialen-Anordnung der beiden vicinalen Protonen hingegen liegt bei 2-5 Hz. Die Signale der anomeren Protonen der 2,3,6-Tridesoxyhexosen müssen aufgrund der benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit den diastereotopen Protonen zwei Kopplungskonstanten beinhalten. Da die anomeren Protonen in den Zuckern A, C und E  $^1\text{H-NMR}$ -Signale mit einer Halbwertsbreite von ca. 6-7 Hz besitzen, konnte eine axial-axial-Anordnung ausgeschlossen werden. Da bereits ein Proton der Methylengruppe axial steht, muss das anomere Proton der 2,3,6-Tridesoxyhexosen, wie in Abbildung 5-28 gezeigt, äquatorial stehen.



**Abbildung 5-28:** Bestimmung der Stellung des anomeren Protons der 2,3,6-Tridesoxyhexosen in den Langkocyclinen.

Auch das Proton an Position 4 der 2,3,6-Tridesoxyhexosen zeigte ein Signal mit einer Halbwertsbreite von ca. 7 Hz. Da dieses Proton drei vicinale Protonen in seiner Umgebung hat, mit denen es koppelt, kam auch hier eine axial-axial-Anordnung der Protonen nicht in Frage. Da bereits ein Proton der Methylengruppe an Position 3 axial angeordnet ist, muss das Proton an Position 4 äquatorial stehen (Abbildung 5-29).

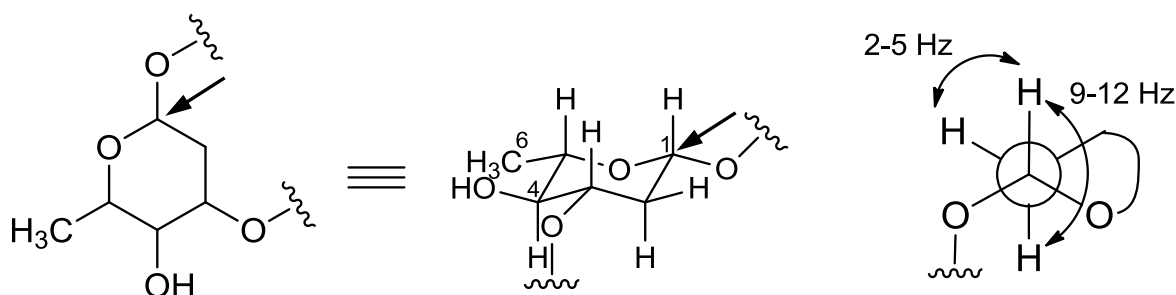




**Abbildung 5-29:** Bestimmung der Stellung des Protons an Position 4 der 2,3,6-Tridesoxyhexosen.

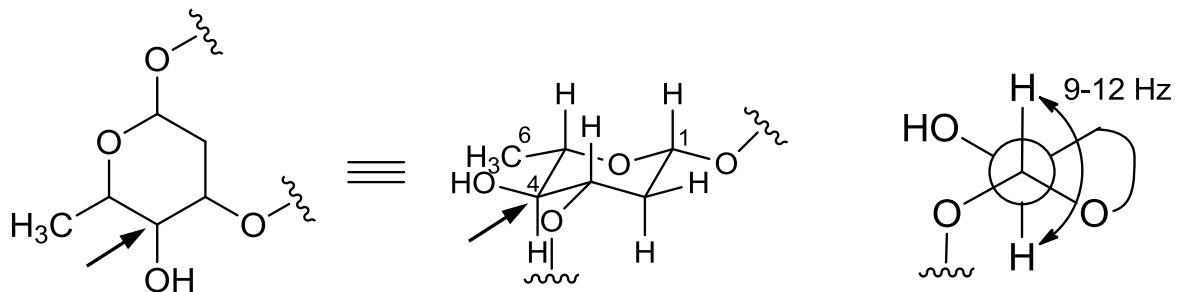
Wie bereits vorher erwähnt wurde, ist die Kopplungskonstante für äquatorial-axiale- bzw. äquatorial-äquatoriale-Anordnungen etwa gleich groß, so dass für die 2,3,6-Tridesoxyhexosen zunächst keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob das Proton an Position 5 äquatorial oder axial steht. Erst durch die Aufnahme von NOESY-Spektren war es möglich, die räumliche Orientierung des Protons an Position 5 zu bestimmen. Es konnte eine NOESY-Kopplung zwischen dem Proton an Position 5 und dem axial-stehenden Proton der Methylengruppe an Position 3 beobachtet werden (Abbildung 5-32), das eine axial-Stellung von ersteren voraussetzt. Bei den 2,3,6-Tridesoxyhexosen handelt es sich somit um  $\alpha$ -Rhodinosen. Dies konnte anhand von Literaturvergleichen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Zucker bestätigt werden.<sup>[113]</sup>

Bei den 2,6-Didesoxyhexosen zeigten die anomeren Protonen jeweils ein Dublett von Dublett mit Kopplungskonstanten von  $J_{B1,B2\text{eq}}=1.8\text{ Hz}$  ( $J_{D1,D2\text{eq}}=1.8\text{ Hz}$ ) und  $J_{B1,B2\text{ax}}=9.9\text{ Hz}$  ( $J_{D1,D2\text{ax}}=9.8\text{ Hz}$ ). Die Kopplungen im Bereich von etwa 10 Hz sind auf eine axial-Stellung des anomeren Protons zurückzuführen, das mit dem axialen Proton der Methylengruppe an Position 2 koppelt (Abbildung 5-30).



**Abbildung 5-30:** Bestimmung der Stellung des anomeren Protons der 2,6-Didesoxyhexosen.

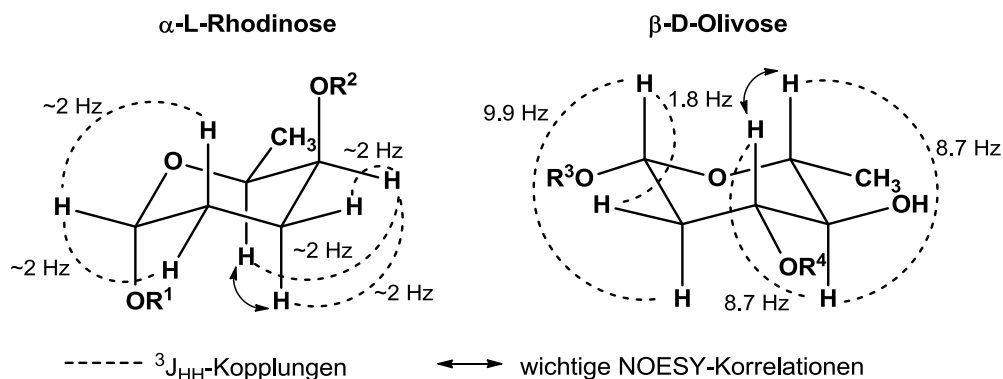
Das Proton an Position 4 der 2,6-Didesoxyhexosen zeigt ein Pseudotriplett mit den Kopplungskonstanten  $J_{B3,B4}=8.7$  Hz ( $J_{D3,D4}\sim 8.7$  Hz) und  $J_{B4,B5}=8.7$  Hz ( $J_{D4,D5}\sim 8.7$  Hz), die durch die axiale Stellung der Protonen an Position 3, 4 und 5 hervorgerufen wird (Abbildung 5-31).



**Abbildung 5-31:** Bestimmung der Stellung des Protons an Position 4 der 2,6-Dideoxyhexosen.

Anhand dieser Informationen konnten die beiden 2,6-Dideoxyhexosen als  $\beta$ -Olivosen bestimmt werden. Durch Literaturvergleiche der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.<sup>[41]</sup>

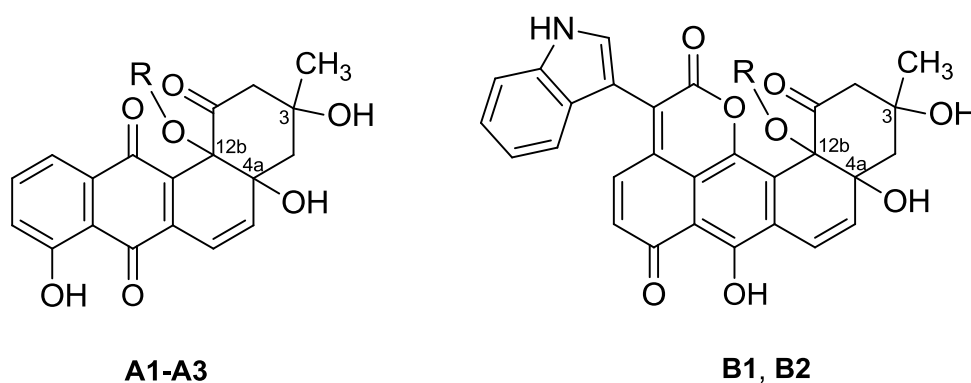
Über die Klyne-Regel kann man indirekt die Konfiguration von Zuckern bestimmen, die in Sterylglykosiden natürlich vorkommen. Nach der Regel besitzen  $\alpha$ -verknüpfte Zucker die L-Konfiguration und  $\beta$ -verknüpfte Zucker die D-Konfiguration.<sup>[114],[115]</sup> Durch die Übertragung der Regel auf die in den Langkocyclinen vorkommenden Desoxyzucker hat man in dieser Naturstofffamilie  $\alpha$ -L-Rhodinosen und  $\beta$ -D-Olivosen vorliegen. Abbildung 5-32 zeigt die beiden Zucker unter Angabe der Kopplungskonstanten und für die Zuckerbestimmung wichtigen NOESY-Korrelationen.



**Abbildung 5-32:** Kopplungskonstanten und wichtige NOESY-Korrelationen der Rhodinosen und Olivosen.

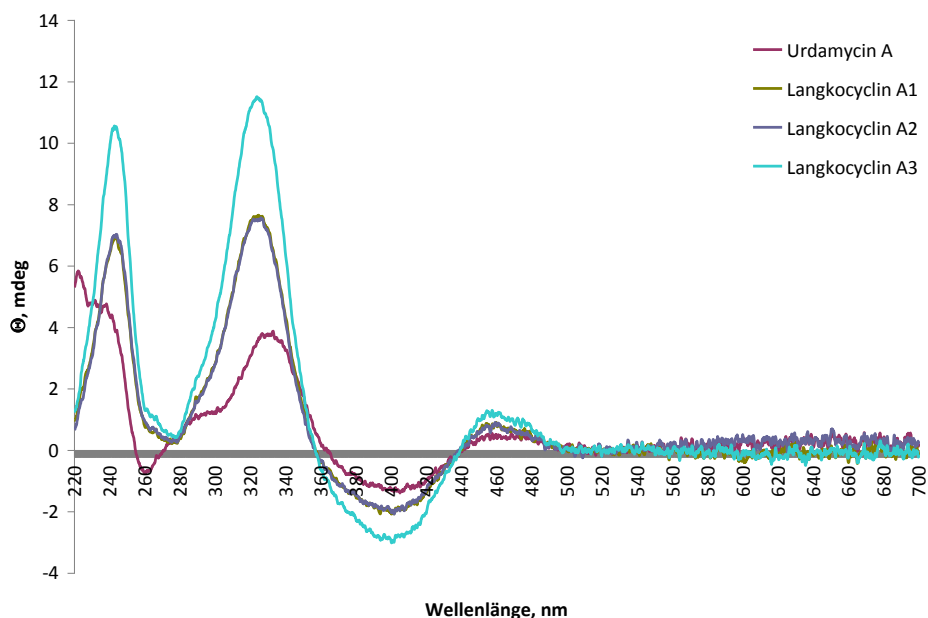
### 5.3.5 CD-spektroskopische Untersuchungen

Um die absolute Konfiguration der drei Stereozentren im Polyketidrückgrat der Langkocycline bestimmen zu können, wurden CD-Spektren aufgenommen und mit den in der Literatur beschriebenen Daten für Urdamycin A bzw. Urdamycin D verglichen.<sup>[41]</sup> Abbildung 5-33 zeigt die mit Hilfe von Ziffern gekennzeichneten Stereozentren an Position 3, 4a und 12b.



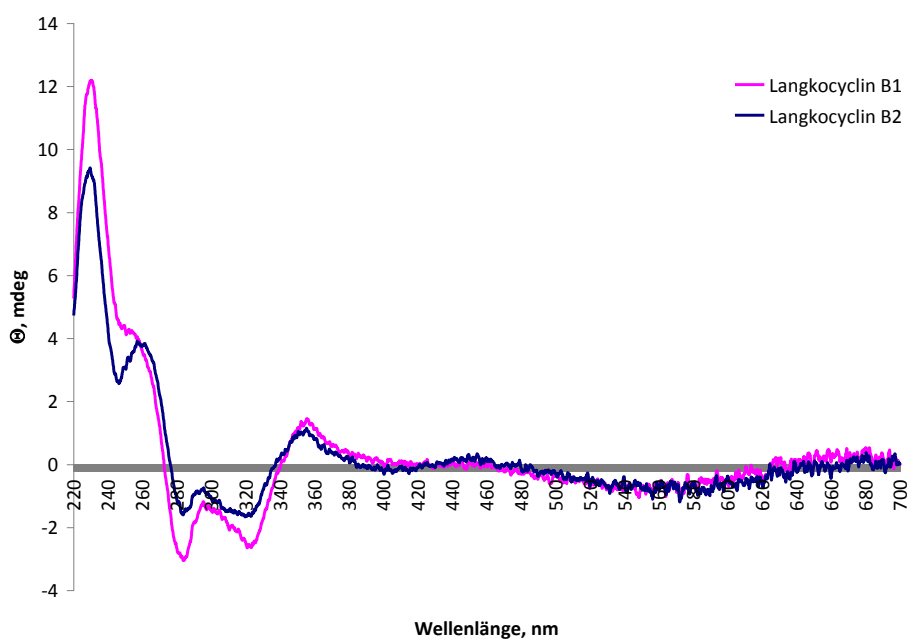
**Abbildung 5-33:** Polyketidrückgrat der Langkocycline mit den beschrifteten Stereozentren.

Die Langkocycline A1-A3 konnten, abgesehen von den Literaturvergleichen, auch direkt mit Urdamycin A als Referenzsubstanz, welches von Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler (Eberhard-Karls-Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde, verglichen werden. Hierzu wurde von Urdamycin A unter den gleichen Bedingungen wie für die Langkocycline A1-A3 ein Vergleichs-CD-Spektrum aufgenommen. Abbildung 5-34 stellt den Vergleich der gemessenen CD-Spektren dar. Die Maxima der Kurven für Langkocyclin A2, das die gleiche Molmasse und die gleichen Zuckerreste wie Urdamycin A besitzt, liegen bei  $\lambda_{\max} \approx 459 (+0,9)$ ,  $400 (-2,0)$ ,  $326 (+7,6)$ ,  $278 (+0,3)$  und  $244 (+7,0)$  nm (Tabelle 5-3). Es ist deutlich zu erkennen, dass die CD-Spektren der Langkocycline A1-A3 gut mit dem Spektrum von Urdamycin A übereinstimmen. Die Maxima der Kurven besitzen das gleiche Vorzeichen, was auf die identische absolute Konfiguration der Stereozentren zurückzuführen ist. Auch die Literaturvergleiche lieferten die gleiche Erkenntnis.<sup>[41]</sup>



**Abbildung 5-34:** CD-Spektren von Langkocyclin A1-A3 verglichen mit Urdamycin A.

Da für die Langkocycline B1 und B2 kein Urdamycin D als Referenzsubstanz vorhanden war, wurden die CD-Spektren (Abbildung 5-35) nur mit dem in der Literatur beschriebenen CD-Spektrum von Urdamycin D verglichen. Auch die Spektren von B1 und B2 zeigten die gleiche Tendenz wie das Spektrum von Urdamycin D ( $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 440 (+1,0), 395 (-3,0), 350 (+1,0), 320 (\text{sh}, -4,0), 278 (-15,0), 245 (+20,0)$  und  $226 (+59,0)$  nm).<sup>[41]</sup> Somit konnte davon ausgegangen werden, dass auch die Langkocycline B1 und B2 die gleiche absolute Konfiguration der Stereozentren im Polyketidrückgrat aufweisen wie das Urdamycin D.

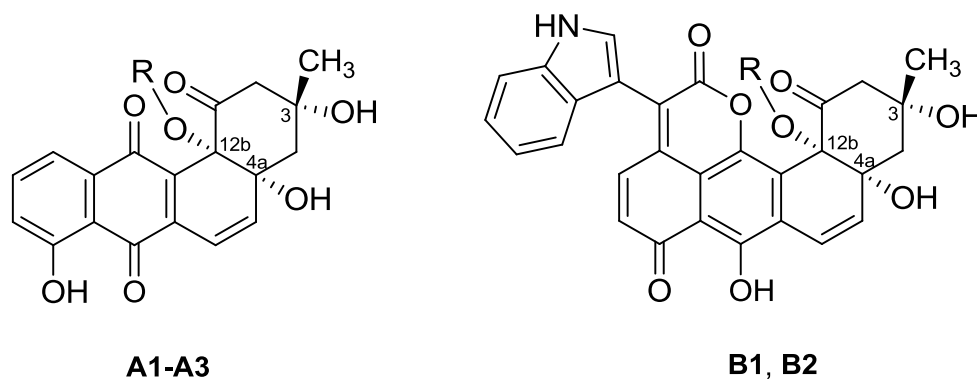


**Abbildung 5-35:** CD-Spektren von Langkocyclin B1 und B2.

**Tabelle 5-3:** Maxima der CD-Spektren der Langkocycline.

	1 (A1)	2 (A2)	3 (A3)	4 (B1)	5 (B2)
CD (MeOH):	459 (+0,9);	459 (+0,9);	457 (+1,3);	440 (+0,1);	441 (+0,2);
$\lambda_{\max}$ [nm] ( $\theta$ )	400 (-2,1);	400 (-2,0);	400 (-3,0);	400 (-0,1);	400 (-0,3);
( $c = 0.2$ mg/ml)	325 (+7,7);	326 (+7,6);	324 (+11,5);	355 (+1,5);	355 (+1,2);
	278 (+0,2);	278 (+0,3);	277 (+0,4);	321 (-2,6);	320 (-1,7);
	244 (+7,0)	244 (+7,0)	243 (+10,6)	296 (-1,2);	296 (-0,7);
				284 (-3,0);	284 (-1,6);
				230 (+12,2)	257 (+3,9);
					246 (+2,6);
					230 (+9,4)

In Abbildung 5-36 sind die absoluten Konfigurationen der Stereozentren im Polyketidrückgrat der Langkocycline gezeigt.



**Abbildung 5-36:** Aufgrund der CD-Spektren abgeleitete absolute Konfigurationen der Stereozentren im Polyketidrückgrat.

## 5.4 Biologische Aktivität

Die Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Langkocycline wurden von Dr. Jutta Wiese in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff im Kieler Wirkstoff-Zentrum KiWiZ am GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung durchgeführt. Getestet wurden die Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* und die humanen Krebszelllinien HepG2 und NIH 3T3. In Tabelle 5-4 sind die Ergebnisse der Bioaktivitätsassays zusammengefasst. Die Langkocycline A1 (**1**), A2 (**2**), A3 (**3**)

und Tetrangomycin (**6**) inhibierten das Wachstum des grampositiven Stammes *Bacillus subtilis* mit IC<sub>50</sub>-Werten von 40.7 (±4.2) µM, 4.07 (±0.47) µM, 2.17 µM und 4.1 (±0.31) µM. Das Wachstum von *Candida albicans* wurde nicht durch die Substanzen **1**, **2**, **3**, und **6** inhibiert. Es konnte allerdings eine zytotoxische Aktivität der Substanzen **1**, **2**, **3**, und **6** gegen menschliche hepatozelluläre Leberkarzinom-Zellen (HepG2) beobachtet werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 26.5 (±3.4) µM, 13.6 (±3.4) µM, im Bereich von 2.5-5.0 µM und im Bereich von 5.0-10.0 µM. Das Wachstum der Zelllinie NIH 3T3 wurde in einem vergleichbaren Bereich wie die HepG2-Zelllinien inhibiert mit IC<sub>50</sub>-Werten von 9.9 (±3.3) µM für Langkocyclin A1, 11.75 (±2.85) µM für Langkocyclin A2, 2.5-5.0 µM für Langkocyclin A3 und 29.2 (±6.7) µM für Langkocyclin B2. Die Bioaktivitätsassays waren für das Langkocyclin B1 aufgrund der geringen Substanzmenge nicht durchführbar. Das Langkocyclin B2 konnte aus dem gleichen Grund nur auf die Aktivität gegen die Zelllinie NIH 3T3 getestet werden. Diese verbleibenden Tests müssen in Zukunft noch ausgeführt werden.

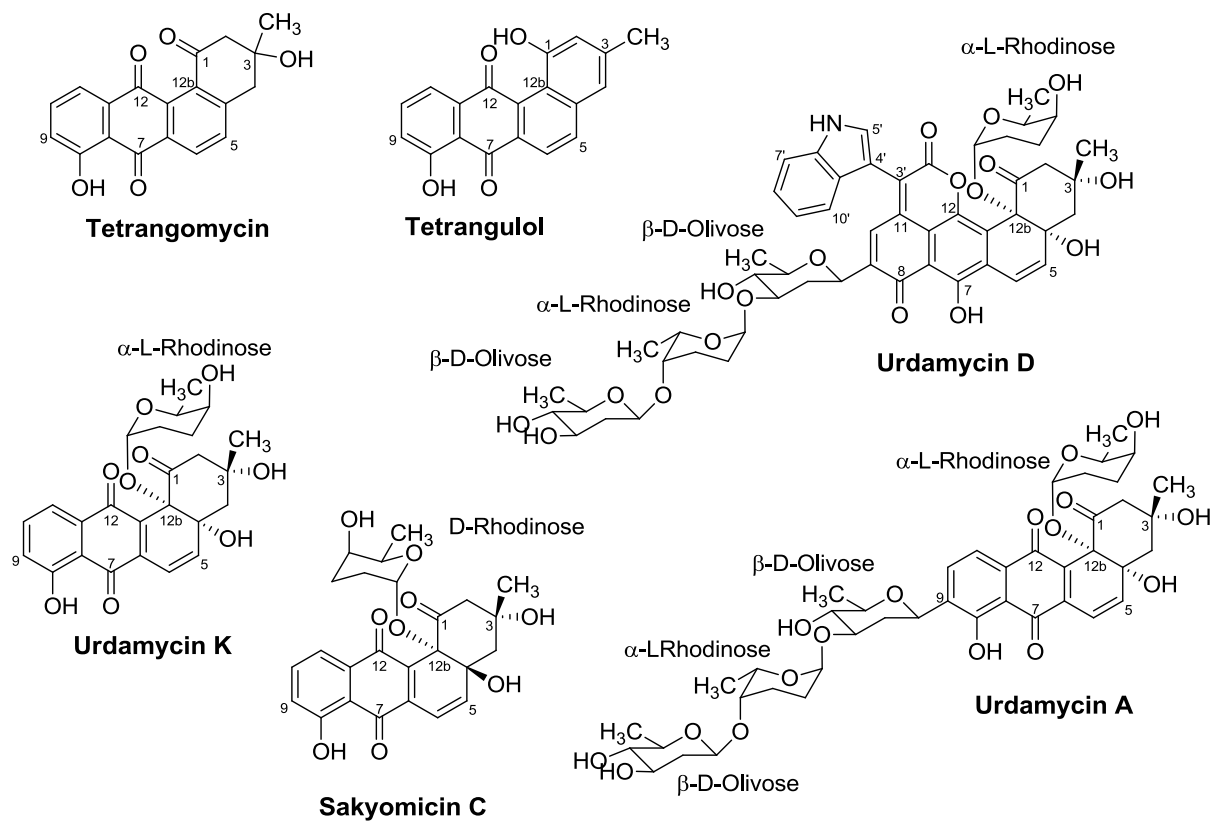
**Tabelle 5-4:** Biologische Aktivität der Substanzen **1-6**, IC<sub>50</sub>-Werte angegeben in µM, n.b.= nicht bestimmt aufgrund geringer Substanzmenge; <sup>a</sup> = Der Bereich ist angegeben, da die Messungen aufgrund nicht ausreichender Substanzmengen nicht wiederholt werden konnten.<sup>[110]</sup>

	<b>1 (A1)</b>	<b>2 (A2)</b>	<b>3 (A3)</b>	<b>4 (B1)</b>	<b>5 (B2)</b>	<b>6</b>
<i>B. subtilis</i>	40.7 (±4.2)	4.07 (±0.47)	2.17	n.b.	n.b.	4.1 (±0.31)
<i>C. albicans</i>	nicht aktiv	nicht aktiv	nicht aktiv	n.b.	n.b.	nicht aktiv
HepG2	26.5 (±3.4)	13.6 (±3.4)	2.5-5.0 <sup>a</sup>	n.b.	n.b.	5.0-10.0 <sup>a</sup>
NIH 3T3	9.9 (±3.3)	11.75 (±2.85)	2.5-5.0 <sup>a</sup>	n.b.	29.2 (±6.7)	n.b.

## 5.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die Langkocycline A1 (**1**), A2 (**2**), A3 (**3**), B1 (**4**) und B2 (**5**) wurden im Zuge eines chemischen Screening-Programms aus dem *Streptomyces*-Stamm Acta 3034 isoliert. Der Name Langkocyclin ist auf die Herkunft des Produktionsstammes, der Insel

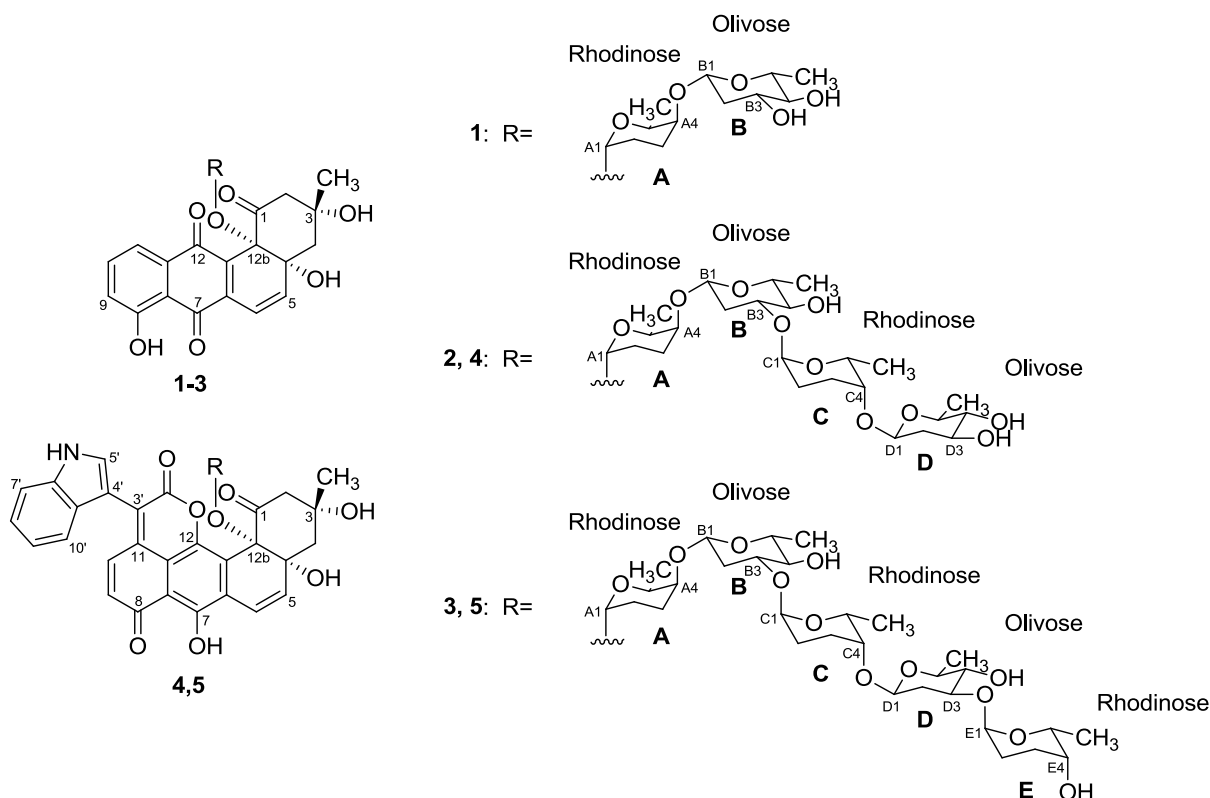
Langkawi im Nordwesten von Malaysia, zurückzuführen. Die mittels DAD-HPLC detektierten Metabolite wurden mit der UV/Vis-Naturstoffdatenbank verglichen.<sup>[108]</sup> Hierbei stellte sich heraus, dass drei der produzierten Sekundärmetabolite nahezu übereinstimmende UV/Vis-Spektren mit Urdamycin A besaßen. Urdamycin A wurde aus dem Stamm *Streptomyces fradiae* Tü 2717 isoliert<sup>[41]</sup> und gehört zu der Gruppe der Angucyclin-Antibiotika, der größten Gruppe polyzyklischer aromatischer Polyketide.<sup>[40]</sup> Der Begriff Angucyclin- bzw. Angucyclinon-Antibiotika, der im Jahr 1986 von Drautz *et al.* eingeführt wurde,<sup>[41]</sup> stammt aus dem lateinischen „angus“ (engl. *angle*) und ist zurückzuführen auf die winkelige, tetrazyklische Benzanthracen-Struktur des Aglycons. Die erste in der Literatur beschriebene Struktur dieser Substanzklasse stellt das Angucyclinon Tetrangomycin dar.<sup>[43]</sup> Auch in dem analysierten *Streptomyces*-Stamm Acta 3034 wurde das Tetrangomycin (**6**) gefunden, zusammen mit den fünf neuen Verbindungen Langkocyclin A1 (**1**), A2 (**2**), A3 (**3**), B1 (**4**) und B2 (**5**). Die Strukturen der Langkocycline konnten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Langkocyclin A1 (**1**), A2 (**2**) und A3 (**3**) besitzen eine strukturelle Verwandtschaft zu Urdamycin A (Abbildung 5-37). Sie weisen das gleiche Aglycon wie Urdamycin A auf, allerdings sind die Glykoside der Langkocycline an anderen Positionen mit dem Aglycon verknüpft. Bei den Langkocyclinen liegt an Position 9 ein H-Atom anstelle eines C-glykosidisch gebundenen Trisaccharids vor. Wie bei Urdamycin K<sup>[111]</sup> und Sakyomicin C<sup>[116]</sup> (Abbildung 5-37), die jeweils ein O-Glykosid an Position C-12b tragen, sind die Desoxyzucker der Langkocycline zu einer einzigen Saccharidkette aneinandergereiht und ebenfalls an das Kohlenstoffatom C-12b gebunden. Die gleiche Analogie ist zwischen den beiden Langkocyclinen B1 (**4**), B2 (**5**) und Urdamycin D (Abbildung 5-37) gegeben.



**Abbildung 5-37:** Strukturen von Tetrangomycin, Tetrangulol, Urdamycin A, Urdamycin D, Urdamycin K und Sakyomicin C.

Die Saccharidketten der Langkocycline setzen sich aus 2,3,6-Tridesoxyhexosen und 2,6-Didesoxyhexosen zusammen. Die Analyse der  $^3J$ -Kopplungskonstanten, NOESY-Experimente und Literaturvergleiche der chemischen Verschiebungen<sup>[41],[113]</sup> lieferten die Erkenntnis, dass es sich bei den 2,3,6-Tridesoxyhexosen um α-Rhodinosen handelt und bei den 2,6-Didesoxyhexosen um β-Olivosen. Durch Anwendung der Klyne-Regel,<sup>[114],[115]</sup> die α-verknüpften Zuckern eine L-Konfiguration und β-verknüpften Zuckern eine D-Konfiguration zuweist, konnte somit von α-L-Rhodinosen und β-D-Olivosen ausgegangen werden. Das Langkocyclin A1 trägt an Position C-12b ein O-glykosidisch gebundenes Disaccharid (α-L-Rhodinose-β-D-Olivose), die Langkocycline A2 und B1 jeweils ein Tetrasaccharid (α-L-Rhodinose-β-D-Olivose-α-L-Rhodinose-β-D-Olivose) und die Langkocycline A3 und B2 jeweils ein Pentasaccharid (α-L-Rhodinose-β-D-Olivose-α-L-Rhodinose-β-D-Olivose-α-L-Rhodinose) (Abbildung 5-38).





**Abbildung 5-38:** Strukturen der Langkocycline A1 (1), A2 (2), A3 (3), B1 (4) und B2 (5).

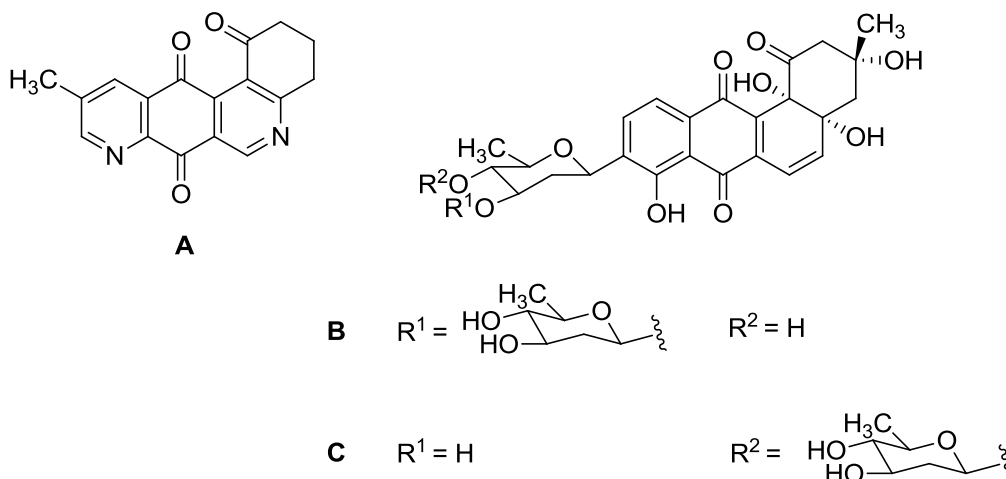
Mittels CD-Spektroskopie konnten die Konfigurationen der Stereozentren an Position 3, 4a und 12b im Polyketidrückgrat bestimmt werden. Hierzu wurden die gemessenen CD-Spektren der Langkocycline A1, A2 und A3 mit dem CD-Spektrum der Referenzsubstanz Urdamycin A, welches unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde, verglichen. Die Absorptionsbanden der CD-Spektren besaßen die gleichen Vorzeichen, was auf die gleiche Stereochemie des Chromophors der Langkocycline A1, A2, A3 und Urdamycin A schließen ließ. Dieses Ergebnis wurde auch durch den Vergleich der gemessenen CD-Spektren mit dem in der Literatur beschriebenen CD-Spektrum für Urdamycin A bestätigt.<sup>[41]</sup> Die CD-Spektren der Langkocycline B1 und B2 wurden mit dem in der Literatur beschriebenen CD-Spektrum für Urdamycin D verglichen.<sup>[41]</sup> Auch diese zeigten die gleiche Tendenz wie das Spektrum von Urdamycin D, so dass von identischen Stereozentren im Polyketidrückgrat ausgegangen wurde. Die absoluten Konfigurationen der Stereozentren sind in Abbildung 5-38 gezeigt.

Angucycline stellen die größte Untergruppe der von Typ-II-Polyketidsynthasen hergestellten Polyketide dar.<sup>[40]</sup> Tetrangomycin und Tetrangulol (Abbildung 5-37), die im Jahr 1965 entdeckt wurden,<sup>[43],[117]</sup> sind die ersten Vertreter dieser Substanzklas-

se. Unmittelbar danach folgten die Isolierung von Ochromycinon,<sup>[118]</sup> Aquayamycin<sup>[119],[120]</sup> und Rabelomycin<sup>[121]</sup>. In den darauffolgenden Jahren blieben die Angucycline noch sehr diskret bis sie sich Anfang der 1980er Jahre anhand von Screenings auf antibakteriell und antitumoral wirkende Substanzen zu einer immer größer werdenden Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe entwickelten.<sup>[42]</sup> Aufgrund der diversen post-PKS-Modifikationen, die während der Biosynthese mittels beispielsweise Oxygenasen, Glykosyltransferasen, Halogenasen und Zyklasen stattfinden,<sup>[29]</sup> besitzen die Angucycline eine hohe strukturelle Vielfalt mit einer breiten Spanne an biologischen Aktivitäten. Zu den bis zum heutigen Zeitpunkt bekannten biologischen Aktivitäten gehören die zytotoxische, antibakterielle und antivirale Wirkung sowie die Wirkung als Enzyminhibitor und Thrombozytenaggregationshemmer.<sup>[42]</sup> Die Antitumoraktivität der Angucycline ist vermutlich neben anderen Faktoren auch auf das Hydroxyanthrachinon-Chromophor im Aglycon zurückzuführen.<sup>[42]</sup> Beispiele für zytotoxisch hochwirksame Substanzen sind das Grincamycin mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.013 µg/ml gegen murine P388-Leukämiezellen,<sup>[122]</sup> die Saquayamycine A und B mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.003-0.004, 0.2 und 0.06 µg/ml gegen L1210-, HT29- und A549-Leukämiezellen,<sup>[123]</sup> Marmycin A mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60.5 nM gegen die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116<sup>[124]</sup> und Landomycinon und Landomycin A mit IC<sub>50</sub>-Werten von jeweils 1.4 µM gegen Östrogen-refraktäre MDA-231-Brustkrebszellen und 2.1-2.5 µM gegen Östrogen-empfindliche MCF-7-Brustkrebszellen.<sup>[113]</sup> Die Landomycine mit kürzeren Saccharidketten hingegen zeigen nur geringe bzw. keine zytotoxische Wirkung gegen die MCF-7-Krebszelllinien. Die Tatsache, dass die Landomycine mit Penta- bzw. Heptasaccharidketten und das Landomycinon ohne Zuckerreste eine hohe zytotoxische Aktivität aufweisen, ließ darauf schließen, dass beide Substanzarten unterschiedliche Targets besitzen und somit zwei verschiedene Wirkmechanismen existieren. Es ist möglich, dass Angucyclinone in die DNA interkalieren und so die Nucleinsäuresynthese verhindern, während die Landomycine mit den langen Saccharidketten möglicherweise die Thymidylat-Synthase hemmen.<sup>[40],[113]</sup>

Um neue bioaktive Angucycline zu gewinnen, wurden zusätzlich zu den Screeningmethoden auch die traditionelle Synthesechemie und die kombinatorische Biosynthese herangezogen.<sup>[40]</sup> So gelang es Valderrama *et al.* Angucyclinon-Aza-Analoga zu synthetisieren, die hohe zytotoxische Aktivitäten aufweisen.<sup>[24]</sup> Das in Abbildung 5-39 dargestellte Aza-Analogon (**A**), bei dem Stickstoffsubstitutionen an

Position 5 und 8 durchgeführt wurden, stellt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.7-2.4  $\mu\text{g/ml}$  gegen verschiedene Tumorzelllinien die aussichtsreichste Komponente dar.<sup>[40]</sup>



**Abbildung 5-39:** Strukturen des Aza-Analogons **A** und der glykomodifizierten Angucycline **B** und **C**.

Die meisten Angucycline besitzen eine antibakterielle Wirkung gegen grampositive Bakterien, wie beispielsweise *Bacillus*-Stämme und Staphylokokken.<sup>[42]</sup> Vineomycin A<sub>1</sub> mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von 0.78  $\mu\text{g/ml}$  gegen *Staphylococcus aureus* FDA 209P und *Micrococcus luteus* (früher: *Sarcina lutea*) PCI 1001,<sup>[126]</sup> Benzanthrin B mit MHK-Werten von jeweils 0.20  $\mu\text{g/ml}$  gegen *Streptococcus bovis* A5169 und *Streptococcus pyogenes* 930<sup>[127]</sup> und SS 228Y mit MHK-Werten von jeweils 1.56  $\mu\text{g/ml}$  gegen *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* PCI 219 und *Staphylococcus aureus* Smith<sup>[128]</sup> zählen zu den wirksamsten antibakteriell wirkenden Angucyclinen.<sup>[42]</sup> Bei einigen Angucyclinen, wie zum Beispiel den Urdamycinen, Yronomycin und Rabelomycin wurde eine geringe Aktivität gegen gramnegative Bakterien beobachtet.<sup>[42]</sup> Interessanterweise wurde für einige Angucycline auch eine schwache antifungale Aktivität nachgewiesen, darunter die Sakyomicine A, B und C mit MHK-Werten von >200  $\mu\text{g/ml}$  gegen *Candida albicans* IFO 1060.<sup>[116]</sup> Auch die Saccharothrixmicine A und B zeigten fungizide Wirkung gegen *Candida albicans*.<sup>[129]</sup>

Bei dem Angucyclinon SM 196 B wurde eine antivirale Eigenschaft gegen die *Herpes simplex* Virus-Typen 1 und 2 festgestellt, wobei die MHK-Werte bei 0.55 und 4.54  $\mu\text{g/ml}$  lagen.<sup>[130]</sup>

Bei einigen Angucyclinen, die nur geringe zytotoxische und antibakterielle Aktivität aufwiesen, wurde eine hohe Wirkung als Enzyminhibitor beobachtet.<sup>[40]</sup> Hierzu gehören die von Kirschning *et al.* synthetisierten glykomodifizierten Angucycline **B** und **C** (Abbildung 5-39). Sie zählen mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.42 µM zu den stärksten Inhibitoren der Xanthinoxidase.<sup>[131]</sup> Die Xanthinoxidase ist ein Enzym, das die Entstehung von Harnsäure aus Hypoxanthin katalysiert. Kommt es zu einer erhöhten Harnsäureproduktion, die sich als Gicht bemerkbar macht, können Xanthinoxidase-Inhibitoren zur Behandlung eingesetzt werden.

Ein Beispiel für ein Thrombozytenaggregationshemmer ist das Aggreticin (früher OM-4842). Es besitzt die Fähigkeit aggregationsfördernde Substanzen wie ADP und Arachidonsäure zu hemmen. Die minimalen Hemmkonzentrationen liegen bei 12.5 und 5.0 µg/ml.<sup>[132]</sup>

Obwohl die Angucycline ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten abdecken, hat es keines dieser Substanzen aufgrund ihrer Zytotoxizität gegenüber gesundem Gewebe bzw. aus Löslichkeitsproblemen bisher geschafft, ein klinisch anwendbares Arzneimittel zu werden.<sup>[40]</sup>

Die Langkocycline stellen die erste Naturstofffamilie dar, bei der eine Saccharidkette an Position C-12b verknüpft ist. Dieser Eigenschaft zufolge ergab sich die Fragestellung, ob dies eine große Auswirkung auf die biologische Aktivität haben könnte.

Die von Dr. Jutta Wiese aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff des Kieler Wirkstoff-Zentrums durchgeführten Bioaktivitätsassays zeigten eine Inhibition von *Bacillus subtilis* durch die Langkocycline A1 (**1**), A2 (**2**), A3 (**3**) und Tetrangomycin (**6**) mit IC<sub>50</sub>-Werten von 40.7 (±4.2) µM, 4.07 (±0.47) µM, 2.17 µM und 4.1 (±0.31) µM. Eine antifungale Wirkung gegen *Candida albicans* wurde nicht beobachtet. Es konnte allerdings eine zytotoxische Aktivität der Substanzen **1**, **2**, **3** und **6** gegen menschliche hepatozelluläre Leberkarzinom-Zellen (HepG2) nachgewiesen werden, wobei die IC<sub>50</sub>-Werte bei 26.5 (±3.4) µM, 13.6 (±3.4) µM, im Bereich von 2.5-5.0 µM und im Bereich von 5.0-10.0 µM lagen. Das Wachstum der Zelllinie NIH 3T3 wurde in einem vergleichbaren Bereich wie die HepG2-Zelllinien inhibiert mit IC<sub>50</sub>-Werten von 9.9 (±3.3) µM für Langkocyclin A1, 11.75 (±2.85) µM für Langkocyclin A2, 2.5-5.0 µM für Langkocyclin A3 und 29.2 (±6.7) µM für Langkocyclin B2. Wenn man sich die IC<sub>50</sub>-Werte näher anschaut, stellt man die gleiche Tendenz wie bei den Landomycinen fest. Die Verlängerung der Saccharidkette hat eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung zur Folge. Auch das Angucyclinon Tetrangomycin

(6) zeigte eine stärkere Aktivität als das Langkocyclin A1 mit der Disaccharidkette und das Langkocyclin A2 mit der Tetrasaccharidkette. Daraus folgt, dass bei den Langkocyclinen, wie es bei den Landomycinen auch der Fall ist, von zwei verschiedenen Targets ausgegangen werden kann, nämlich dass das Tetrangomycin möglicherweise in die DNA interkaliert und das Langkocyclin A3 mit der Pentasaccharidkette eventuell die Thymidylat-Synthase hemmt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Aktivitätsprofil der Langkocycline A1-A3 (1-3) dem Aktivitätsprofil der in der Literatur beschriebenen Angucycline entspricht. Um herauszufinden, ob die vorher noch nicht beschriebene Lage der Saccharidkette einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung hat, ist es notwendig die Testung der Bioaktivität in Zukunft auf verschiedene andere Zelllinien auszudehnen. Es ist nämlich denkbar, dass die Verknüpfung der Saccharidkette an Position C-12b die Aktivität gegenüber einer bestimmten Art von Krebszelllinien erhöht. Auch ist zu testen, ob die Lage der Saccharidkette die Fähigkeit zur Enzyminhibition bzw. zur Hemmung der Thrombozytenaggregation beeinflusst. Des Weiteren ist anhand von weiteren Bioaktivitätsassays zu klären, ob die Indolyl-Einheit im Aglycon der Langkocycline B1 und B2 eine Auswirkung auf die biologische Aktivität hat. Somit müssen die Langkocycline in Zukunft einer Reihe von Bioaktivitätsassays unterzogen werden, um eine genaue Aussage über das tatsächliche Aktivitätsprofil treffen zu können.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemisches Screening mittels HPLC-DAD

Das chemische Screening mittels HPLC-DAD wurde nach der von Fiedler *et al.* etablierten Methode durchgeführt.<sup>[108]</sup> Hierfür wurden eine Agilent HP 1090M Anlage mit thermostatisiertem Autosampler und Diodenarray Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die gemessenen Wellenlängen betragen  $\lambda = 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435, 500$  nm und als Pilotenwellenlänge diente  $\lambda = 210$  nm. Es wurden 10  $\mu$ l Analytlösung injiziert und die Flussrate lag bei 2 ml/min. Tabelle 6-1 zeigt eine Zusammenfassung der eingesetzten Parameter.

**Tabelle 6-1:** HPLC-Parameter für das chemische Screening.

Parameter	Eigenschaft
Säulenmaterial	Nucleosil 100 C-18 (Maisch, Ammerbuch)
Korngröße	5 $\mu$ m
Maße der Hauptsäule	125 mm x 4,6 mm I. D.
Maße der Vorsäule	20 mm x 4,6 mm I. D.
mobile Phase	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (A), CH <sub>3</sub> CN (B)
Gradient	0% - 100% B in 15 min

Die Charakterisierung der Langkocycline erfolgte mit Hilfe ihrer UV/Vis-Spektren und Retentionszeiten. Um die Isolierung von bereits bekannten Substanzen zu verhindern, wurden die UV/Vis-Spektren mit den Spektren der HPLC-UV/Vis-Datenbank<sup>[108]</sup> der Arbeitsgruppe Fiedler verglichen.

### 6.2 HPLC-DAD-ESI-Massenspektroskopie

Die massenspektrometrischen Experimente von Plantazolicin wurden mit Hilfe eines QTRAP 2000-Massenspektrometers (MDS Sciex/Applied Biosystems, Darmstadt), das mit einer ESI-Ionenquelle ausgestattet ist, durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde mit einer Kapillar 1100-HPLC-Anlage mit DAD-Detektor (Agilent Technolo-

gies, Waldbronn) gekoppelt. Eine Zusammenfassung der chromatographischen Parameter ist in Tabelle 6-2 wiedergegeben. Die Massenspektren wurden anhand der *Analyst*-Software (Version 1.4.2) des Geräteherstellers ausgewertet.

**Tabelle 6-2:** Chromatographische Parameter der HPLC-DAD-ESI-Massenspektrometrie.

Parameter	Eigenschaft
Säulenmaterial	Luna 3u C18(2) 100A (Phenomenex, Aschaffenburg)
Korngröße	3 $\mu\text{m}$
Maße der Säule	50 mm x 1 mm I. D.
Mobile Phase	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCO <sub>2</sub> H (A), CH <sub>3</sub> CN + 0,1% HCO <sub>2</sub> H (B)
Flussrate	60 $\mu\text{l}/\text{min}$
Gradient	0-10 min: 10% - 100% B 10-13 min: 100% B 13.1-15 min: 10% B

### 6.3 HPLC-ESI-FT-Orbitrap-Massenspektrometrie

Für die hochauflösende Massenspektrometrie wurde eine LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Bremen) mit einer ESI-Ionenquelle verwendet. Für die chromatographische Trennung der Proben wurde das Massenspektrometer mit einer HPLC-Anlage (Agilent Technologies 1200 Serie, Waldbronn) gekoppelt. In Tabelle 6-3 sind die chromatographischen Parameter zusammengefasst. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit Hilfe der Software *Xcalibur* (Version 2.1) des Geräteherstellers.

**Tabelle 6-3:** Chromatographische Parameter der HPLC-ESI-FT-Orbitrap-Massenspektrometrie.

Parameter	Eigenschaft
Säulenmaterial	Hypersil-100 C18 (Thermo Scientific)
Korngröße	5 $\mu\text{m}$
Maße der Säule	50 mm x 3 mm I. D.
mobile Phase	H <sub>2</sub> O + 0,025% HCO <sub>2</sub> H (A), MeOH + 0,025% HCO <sub>2</sub> H (B)
Flussrate	1.3 ml/min
Gradient	0-12 min: 5% - 100% B 12-14 min: 100% B 14-16.5 min: 5% B

## 6.4 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Experimente der in dieser Arbeit aufgeklärten Strukturen wurden an verschiedenen Geräten durchgeführt. Welches Gerät für welche Verbindung genutzt wurde, ist in Tabelle 6-4 erläutert.

**Tabelle 6-4:** Auflistung der verwendeten NMR-Geräte.

Gerät	Substanz
500 MHz	Plantazolicin ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY)
500 MHz	Langkocyclin A1, A2, A3 ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) Langkocyclin B1 ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC) Langkocyclin B2 ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, NOESY)
700 MHz	Langkocyclin B1 (COSY, TOCSY, HMBC, NOESY) Langkocyclin B2 (HMBC)
600 MHz FMP	<sup>15</sup> N-Plantazolicin ( <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HMQC, <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HMBC)
900 MHz FMP	<sup>15</sup> N-Plantazolicin ( <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HMQC, <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HMBC)

Die Messung des Plantazolicins erfolgte an einem DRX 500 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem Breitband-Invers Probenkopf mit z-Gradient.



Der Großteil der Langkocyclin-NMR-Spektren wurde an einem weiteren DRX 500 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) gemessen.

Einige NMR-Experimente des Langkocyclin-Projektes wurden an einem DRX 700 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt.

Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Experimente des  $^{15}\text{N}$ -markierten Plantazolicins wurden an einem AV 600 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe), ausgestattet mit einem TXI Kryo-Probenkopf mit z-Gradient und an einem AV 900 NMR-Spektrometer mit TCI Kryo-Probenkopf mit z-Gradient gemessen.

Die NMR-Spektren wurden anhand der Software *Topspin* (Version 3.1) ausgewertet.

## 6.5 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO J-815-150S CD-Spektrometer (Jasco, Groß-Umstadt) gemessen. Hierzu wurden Proben mit einer Konzentration von 0.2 mmol/l in MeOH vorbereitet. Reines Methanol diente als Nullprobe, dessen Spektrum von den CD-Spektren der Proben abgezogen wurde. Tabelle 6-5 zeigt die eingesetzten Parameter. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden vier Spektren gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet.

**Tabelle 6-5:** Eingesetzte Parameter bei der CD-Spektroskopie.

Parameter	Eigenschaft
Küvettenlänge	1 cm
Wellenlängenbereich	200-700 nm
Bandbreite	1 nm
Scangeschwindigkeit	50 nm/min
Auflösung	0.1 nm
Akkumulation	4 Spektren

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Nuhn, P., *Naturstoffchemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [2] Heilmann, J. *Chem. Unserer Zeit* **2007**, *41*, 376-389.
- [3] Bergmann, W., Feeney, R. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.
- [4] Zhang, W., Guo, Y. W., Gu, Y., *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2041-2090
- [5] Decker, H., Haag, S., Udvarnoki, G., Rohr, J. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1214-1217.
- [6] Terlau, H., Bach, G., Zeeck, A. *Gynäkologe* **2000**, *33*, 6-10.
- [7] Bode, H. B., Müller, R. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988-7007.
- [8] Hoffmeister, D., Bechthold, A., Pelzer, S., Wohlleben, W. *Biospektrum* **2002**, *Sonderausgabe*, 508-511.
- [9] Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. *J Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [10] Newman, D. J., Cragg, G. M. *J Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.
- [11] Mebs, D. *Nat.wiss. Rundsch.* **2010**, *6*, 397-402.
- [12] Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 40-56.
- [13] Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., Göransson, U., Gruber, C. W., Haft, D. H., Hemscheidt, T. K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A. R., Jaspars, M., Kelly, W. L., Klinman, J. P., Kuipers, O. P., Link, A. J., Liu, W., Marahiel, M. A., Mitchell, D. A. Moll, G. N., Moore, B. S., Müller, R., Nair, S. K., Nes, I. F., Norris, G. E., Olivera, B. M., Onaka, H., Patchett, M. L., Piel, J., Reaney, M. J. T., Rebuffat, S., Ross, R. P., Sahl, H.-G., Schmidt, E. W., Selsted, M. E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süssmuth, R. D., Tagg, J. R., Tang, G.-L., Truman, A. W., Vederas, J. C., Walsh, C. T., Walton, J. D., Wenzel, S. C., Willey, J. M., van der Donk, W. A. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108-160.
- [14] Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R., Jung, G. *Nature* **1988**, *333*, 276-278.
- [15] Klebe, G. *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, **2009**.

- [16] Wiesner, J., Vilcinskas, A. *Virulence* **2010**, *1*, 440-464.
- [17] McIntosh, J. A., Donia, M. S., Schmidt, E. W. *Nat Prod Rep.* **2009**, *26*, 537-559.
- [18] Widdick D. A., Dodd H. M., Barraille P., White J., Stein T. H., Chater K. F., Gasson M. J., Bibb M. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4316-4321.
- [19] Rogers, L. A. *J. Bacteriol.* **1928**, *16*, 321-325.
- [20] Gross, E., Morell, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4634-4635.
- [21] Delves-Broughton, J. *Food Australia* **2005**, *57*, 525-527.
- [22] Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vertesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, G. M., Süssmuth, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1151-1154.
- [23] Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J.-F., Leboul, J. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1756-1757.
- [24] Scholz, R., Molohon, K. J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A. L., Süssmuth, R. D., Mitchell, D. A., Borriss, R. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 215–224.
- [25] Madison, L. L., Vivas, E. I., Li, Y.-M., Walsh, C. T., Kolter, R. *Mol. Microbiol.* **1997**, *23*, 161-168.
- [26] Asensio, C., Perez-Diaz, J. C., Martinez, M. C., Baquero, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *69*, 7-14.
- [27] Heddle, J. G., Blance, S. J., Zamble, D. B., Hollfelder, F., Miller, D. A., Wentzell, L. M., Walsh, C. T., Maxwell, A. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1223-1234.
- [28] Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716.
- [29] Rix, U., Fischer, C., Remsing, L. L., Rohr, J. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 542-580.
- [30] Antranikian, G. *Angewandte Mikrobiologie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, **2006**.
- [31] Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162-190.
- [32] Bisang, C., Long, P. F., Cortes, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A.-L., Cox, R. J., Simpson, T. J., Staunton, J., Leadlay, P. F. *Nature* **1999**, *401*, 502-505.
- [33] Moore, B. S., Hertweck, C. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70-99.
- [34] Di Marco, A., Gaetani, M., Scarpinato, B. M. *Cancer Chemother. Rep.* **1969**, *53*, 33-37.

- [35] Di Marco, A., Gaetani, M., Orezzi, P., Scarpinato, B. M., Silvestrini, R., Soldati, M., Dasdia, T., Valentini, L. *Nature* **1964**, *201*, 706-707.
- [36] Tyleckova, J., Hrabakova, R., Mairychova, K., Halada, P., Radova, L., Dzubak, P., Hajduch, M., Gadher, S. J., Kovarova, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 15536-15564.
- [37] Dingermann, T., Hänsel, R., Zündorf, I., *Pharmazeutische Biologie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, **2002**.
- [38] Bustamante, J., Galleano, M., Medrano, E. E., Boveris, A. *Breast Cancer Res. Treat.* **1990**, *17*, 145-153.
- [39] Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185-229.
- [40] Kharel, M. K., Pahari, P., Shepherd, M. D., Tibrewal, N., Nybo, S. E., Shaaban K. A., Rohr, J. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 264-325.
- [41] Drautz, H., Zähner, H., Rohr, J. & Zeeck, A. *J. Antibiot.* **1986**, *49*, 1657-1669.
- [42] Rohr, J. & Thiericke, R. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103-137.
- [43] Dann, M., Lefemine, D. V., Barbatschi, F., Shu, P., Kunstmann, M. P., Mitscher, L. A. & Bohonos, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1965**, *1965*, 832-835.
- [44] Rohr, J., Beale, J. M., Floss, H. G. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1151-1157.
- [45] Imamura, N., Kakinuma, K., Ikekawa, N., Tanaka, H., Omura, S. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 602-608.
- [46] Takahashi, K., Tomita, F. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1531-1535.
- [47] Carter, G. T., Fantini, A. A., James, J. C., Borders, D. B., White, R. J. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 255-258.
- [48] Carter, G. T., Fantini, A. A., James, J. C., Borders, D. B., White, R. J. *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 242-248.
- [49] Weber, S., Zolke, C., Rohr, J., Beale, J. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4211-4214.
- [50] Gould, S. J. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2499-2509.
- [51] Gould, S. J., Cheng, X. C., Halley, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10066-10068.
- [52] Sasaki, E., Ogasawara, Y., Liu, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7405-7417.
- [53] Liu, H.-W., Thorson, J. S. *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 223-256.

- [54] Romo, A. J., Liu, H.-W. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1814, 1534-1547.
- [55] Helm, S., Wölfl, S. *Instrumentelle Bioanalytik*, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [56] Cammann, K. *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, **2001**.
- [57] Renneberg, R. *Bioanalytik für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [58] Lottspeich, F., Engels, J. W. *Bioanalytik*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2012**.
- [59] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2012**.
- [60] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B. *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240-2247.
- [61] Schmelzeisen-Redeker, G., Bütfering, L., Röllgen, F. W. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1989**, 90, 139-150.
- [62] Iribarne, J. V., Thomson, B. A. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287-2294.
- [63] Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2001**.
- [64] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, **2003**.
- [65] Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- [66] Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. *Nature* **1980**, 286, 885-886.
- [67] Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M. A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., Hevesi, M. *J. Plant. Dis. Prot.* **1998**, 105, 181-197.
- [68] Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R. *Microbiology* **2002**, 148, 2097-2109.
- [69] Hoch, J. A., Losick, R., Sonenshein, A. E., *Bacillus subtilis and its closest Relatives: From Genes to Cells*, American Society for Microbiology, Washington, DC, **2002**.
- [70] Idriss, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., Borriss, R. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, 20, 619-626.
- [71] Chen, X.-H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heine-meyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt,

- B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1007-1014.
- [72] Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1084-1096.
- [73] Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 1506-1509.
- [74] Moldenhauer, J., Götz, D., Albert, C., Bischof, S., Schneider, K., Süssmuth, R. D., Engeser, M., Gross, H., Bringmann, G., Piel, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465-1467.
- [75] Wilson, K. E., Flor, J. E., Schwartz, R. E., Joshua, H., Smith, J. L., Pelak, B. A., Liesch, J. M., Hensens, O. D. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1682-1691.
- [76] Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S. A., Tejera, E. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1677-1681.
- [77] Gustafson, K., Roman, M., Fenical, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7519-7524.
- [78] Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishijima, M., Sano, H. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 333-339.
- [79] Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. D., Borriss, R. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4024-4036.
- [80] Schneider, K., Chen, X.-H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., Süssmuth, R. D. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1417-1423.
- [81] Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J., Borriss, R. *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 27-37.
- [82] Vanittanakom, N., Löffler, W., Koch, U., Jung, G. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 888-901.
- [83] Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *31*, 488-494.
- [84] Peypoux, F., Bonmatin, J. M., Wallach, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 553-563.
- [85] Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Delcambe, L. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 323-327.
- [86] Budzikiewicz, H.; Bössenkamp, A.; Taraz, K.; Pandey, A.; Meyer, J.-M. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1997**, *52*, 551-554.

- [87] Butcher, B. G., Helmann, J. D. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 765-782.
- [88] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- [89] Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673-4680.
- [90] Todd, E. W. *J. Pathol. Bacteriol.* **1938**, *47*, 423-445.
- [91] Li, Y.-M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R., Walsh, C. T. *Science* **1996**, *274*, 1188-1193.
- [92] Schmidt, E. W., Nelson, J. T., Rasko, D. A., Sudek, S., Eisen, J. A., Haygood, M. G., Ravel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 7315-7320.
- [93] Kelly, W. L., Pan, L., Li, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327-4334.
- [94] Liao, R., Duan, L., Lei, C., Pan, H., Ding, Y., Zhang, Q., Chen, D., Shen, B., Yu, Y., Liu, W. *Chem Biol.* **2009**, *16*, 141-147.
- [95] Scholz, R. *Dissertation* 2011, Humboldt-Universität Berlin.
- [96] Spizizen, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 1072-1078.
- [97] Kalyon, B., Helaly, S. E., Scholz, R., Nachtigall, J., Vater, J., Borriss, R., Süßmuth, R. D. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2996-2999.
- [98] Reuter, P. *Springer Lexikon Medizin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, **2004**.
- [99] Molloy, E. M., Cotter, P. D., Hill, C., Mitchell, D. A., Ross, R. P. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 670-681.
- [100] Hryniewicz, W., Pryjma, J. *Infect. Immun.* **1977**, *16*, 730-733.
- [101] Bernheimer, A. W., Schwartz, L. L. *J. Path. Bact.* **1965**, *89*, 209-223.
- [102] Carr, A., Sledjeski, D. D., Podbielski, A., Boyle, M. D. P., Kreikemeyer, B. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41790-41796.
- [103] Videnov, G., Kaiser, D., Brooks, M., Jung, G. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1607-1609.
- [104] Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 708-734.
- [105] Bayer, A., Freund, S., Jung, G. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 414-426.
- [106] Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K.-I., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H., Furumai, T. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 1045-1053.

- [107] Molohon, K. J., Melby, J. O., Lee, J., Evans, B. S., Dunbar, K. L., Bumpus, S. B., Keleher, N. L., Mitchell, D. A. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1307-1313.
- [108] Fiedler, H.-P. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119-128.
- [109] <http://www.hpriedler-group.de/photogallery.php>
- [110] Kalyon, B., Ramachandran, K., Tan, G. Y. A., Foo, C. Y., Wiese, J., Imhoff, J. F., Süssmuth, R. D., Sabaratnam, V., Fiedler, H.-P. *J. Antibiot.* **2013**, im Druck.
- [111] Künzel, E., Faust, B., Oelkers, C., Weissbach, U., Bearden, D. W., Weitnauer, G., Westrich, L., Bechthold, A., Rohr, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11058-11062.
- [112] Rohr, J., Zeeck, A. *J. Antibiot* **1988**, *XLI (1)*, 126-129.
- [113] Shaaban, K. A., Srinivasan, S., Kumar, R., Damodaran, C., Rohr, J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2-11.
- [114] Klyne, W. *Biochem. J.*, **1950**, *47*, XLI-XLII.
- [115] Dürr, C., Hoffmeister, D., Wohler, S.-E., Ichinose, K., Weber, M., von Mulert, U., Thorson, J. S., Bechthold, A. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3022-3025.
- [116] Nagasawa, T., Fukao, H., Irie, H., Yamada, H. *J. Antibiot* **1984**, *37*, 693-699.
- [117] Kunstmann, M. P., Mitscher, L. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2920-2925.
- [118] Bowie, J. H., Johnson, A. W. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *16*, 1449-1452.
- [119] Sezaki, M., Hara, T., Ayukawa, S., Takeuchi, T., Okami, Y., Hamada, M., Nagatsu, T., Umezawa, H. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 91-97.
- [120] Sezaki, M., Kondo, S., Maeda, K., Umezawa, H., Ohno, M. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 5171-5190.
- [121] Liu, W.-C., Parker, W. L., Slusarchyk, D. S., Greenwood, G. L., Graham, S. F., Meyers, E. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 437-441.
- [122] Hayakawa, Y., Iwakiri, T., Imamura, K., Seto, H., Otake, N. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1785-1787.
- [123] Henkel, T., Zeeck, A. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 830-837.
- [124] Martin, G. D. A., Tan, L. T., Jensen, P. R., Dimayuga, R. E., Fairchild, C. R., Raventos-Suarez, C., Fenical, W. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1406-1409.
- [125] Valderrama, J. A., Colonelli, P., Vasquez, D., Gonzalez, M. F., Rodriguez J. A., Theoduloz, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10172-10181.



- [126] Omura, S., Tanaka, H., Oiwa, R., Awaya, J., Masuma, R., Tanaka, K. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 908-916.
- [127] Theriault, R. J., Rasmussen, R. R., Kohl, W. L., Prokop, J. F., Hutch, T. B., Barlow, G. J. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1509-1514.
- [128] Okazaki, T., Kitahara, T., Okami, Y. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 176-184.
- [129] Kalinovskaya, N. I., Kalinovsky, A. I., Romanenko, L. A., Dmitrenok, P. S., Kuznetsova, T. A. *Nat Prod. Commun.* **2010**, *5*, 597-602.
- [130] Grabley, S., Hammann, P., Hütter, K., Kluge, H., Thiericke, R., Wink, J., Zeeck, A. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 670-673.
- [131] Kirschning, A., Chen, G.-W., Dräger, G., Schuberth, I., Tietze, L. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2347-2354.
- [132] Omura, S., Nakagawa, A., Fukamachi, N., Miura, S., Takahashi, Y., Komiyama, K., Kobayashi, B. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 812-813.

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1-1:</b> Strukturen von Morphin, Penicillin G, Spongouridin und Spongothymidin. ....	1
<b>Abbildung 1-2:</b> Alle neu zugelassenen Medikamente eingeteilt nach Quelle und Jahr; <sup>[10]</sup> B: Biopharmazeutika (große Peptide bzw. Proteine, <i>Biologics</i> ), N: Naturstoffe, NB: botanische Naturstoffe, ND: Naturstoffderivate (semisynthetisch), S: synthetisch, S*: synthetisch, wobei das Pharmakophor von einem Naturstoff stammt, V: Impfstoffe ( <i>Vaccines</i> ), Untergruppe „NM“: <sup>[9]</sup> <i>Natural product mimic</i> . ....	3
<b>Abbildung 1-3:</b> Prozentualer Anteil von Naturstoffen (N: Naturstoffe, NB: botanische Naturstoffe, ND: Naturstoffderivate) in neu zugelassenen Medikamenten eingeteilt nach Jahr für den Zeitraum 1981-2010. <sup>[10]</sup> ....	3
<b>Abbildung 1-4:</b> Thiazol/Oxazol-modifizierte Microcin (TOMM)-Biosynthese. Der trimere „BCD“-Synthetase-Komplex, bestehend aus einer Cyclodehydratase (C, grün), Dehydrogenase (B, gelb) und einem „docking“-Protein (D, blau), katalysiert die Thiazol- und (Methyl-) Oxazolbildung am Peptidgerüst (schwarz). Die Heterozyklen entstehen aus den Aminosäuren Serin/Threonin (X = O; R = H/CH <sub>3</sub> ) und Cystein (X = S; R = H) des inaktiven Präkursors. Auch gezeigt sind die chemische Umsetzung und der Massenverlust in Dalton pro modifizierter Aminosäure ausgehend vom Präkursor. Modifiziert nach Scholz et al. 2011. <sup>[24]</sup> ....	7
<b>Abbildung 1-5:</b> Strukturen von Microcin B17 und Goadsporin. ....	7
<b>Abbildung 1-6:</b> Schematische Darstellung der Biosynthese der Polyketidkette. <sup>[31]</sup> ....	9
<b>Abbildung 1-7:</b> Strukturen von Doxorubicin und Daunorubicin. ....	10
<b>Abbildung 1-8:</b> Zwei verschiedene Biosynthesewege zur Herstellung des Polyketidrückgrats der Angucycline. <sup>[40]</sup> ....	11
<b>Abbildung 1-9:</b> Strukturen von Landomycin A und Urdamycin A. ....	12
<b>Abbildung 1-10:</b> Strukturen der 2,6-Didesoxyhexosen und der 2,3,6-Tridesoxyhexosen <b>I-VI</b> . <sup>[53]</sup> ....	14
<b>Abbildung 2-1:</b> Chromatographische Trennung eines Substanzgemisches. <sup>[56]</sup> ....	15
<b>Abbildung 2-2:</b> Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage. <sup>[56]</sup> ....	17
<b>Abbildung 2-3:</b> Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers und Auflistung der Arten von Ionenquellen, Massenanalytoren und Detektoren, modifiziert nach Lottspeich, 2012. <sup>[58]</sup> ....	19
<b>Abbildung 2-4:</b> Schematische Darstellung des ESI-Prozesses. <sup>[58]</sup> ....	22
<b>Abbildung 2-5:</b> Beschreibung des Auflösungsvermögens R eines Massenanalytators anhand a) der 10%-Tal-Definition und b) der Halbwertsbreite FWHM. <sup>[59]</sup> ....	23
<b>Abbildung 2-6:</b> Funktionsweise eines linearen Quadrupols. <sup>[59]</sup> ....	24
<b>Abbildung 2-7:</b> Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupolmassenspektrometers. <sup>[58]</sup> ....	25
<b>Abbildung 2-8:</b> Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie. <sup>[59]</sup> ....	26
<b>Abbildung 2-9:</b> Schematischer Aufbau einer Orbital-Ionenfalle. <sup>[58]</sup> ....	27

<b>Abbildung 2-10:</b> a) Schematische Darstellung der $\alpha$ - und $\beta$ -Spins vor dem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes. <sup>[63]</sup> b) Darstellung der beiden aufgespalteten Spinzustände nach dem Anlegen eines äußeren Magnetfeldes. <sup>[63]</sup> c) Schematische Darstellung der Energiedifferenz zwischen den beiden Spinzuständen in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke. <sup>[64]</sup> .....	29
<b>Abbildung 2-11:</b> a) Schematische Darstellung der Anlegung des elektromagnetischen Strahlungsimpulses $B_1$ , <sup>[63]</sup> b) Wirkung eines 90°-Pulses auf z-Magnetisierung. <sup>[63]</sup> .....	29
<b>Abbildung 2-12:</b> Pulssequenz von zweidimensionalen NMR-Experimenten. <sup>[58]</sup> .....	30
<b>Abbildung 4-1:</b> Das Genom von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42. 1. äußerer Kreis: beinhaltet alle Gene und Gencluster, die für die Synthese und den Export von Sekundärmetaboliten zuständig sind. Alle Gene sind entsprechend ihrer Funktion farbig dargestellt: Zellhülle und molekulare Prozesse (grün), Informationsprozesse (rot), Intermediärstoffwechsel (lila), unbekannt (schwarz); 2. Kreis: Gene, die nicht in <i>B. subtilis</i> vorkommen. Darunter vier riesige Gencluster, die in der Synthese von Sekundärmetaboliten involviert sind (rot); 3. Kreis: DNA-Inseln 1-17 (schwarz); 4. Kreis: GC-Gehalt-Profil; 5. Kreis: rRNAs (grün); 6. Kreis: tRNAs (blau); 7. Kreis: Prophagen (schwarz), Transposons und IS-Elemente (rot); 8. Kreis: Maßstab (bp). <sup>[69]</sup> .....	34
<b>Abbildung 4-2:</b> Strukturen der PKS- und NRPS-Produkte von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42.....	35
<b>Abbildung 4-3:</b> Das pzn-Gencluster mit einer Größe von 9862 bp setzt sich aus zwölf Genen zusammen. Das Vorläuferpeptid, welches von <i>pznA</i> kodiert wird, besteht aus 41 Aminosäuren, wobei die Serine, Threonine und Cysteine, aus denen die (Methyl-) Oxazole und Thiazole entstehen können, blau gekennzeichnet sind. Angegeben ist die Längeneinheit für 1 kb = 1 Kilobase. ....	37
<b>Abbildung 4-4:</b> a) Totalionenchromatogramm von Plantazolicin A im Positiv-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=6.91$ min; c) DAD-Chromatogramm von Plantazolicin A mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit $R_t=6.79$ min. ....	40
<b>Abbildung 4-5:</b> a) Totalionenchromatogramm von <sup>15</sup> N-Plantazolicin im Positiv-Ionenmodus; b) Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=6.96$ min; c) DAD-Chromatogramm von <sup>15</sup> N-Plantazolicin mit dem UV-Spektrum bei der Retentionszeit $R_t=6.80$ min. ....	41
<b>Abbildung 4-6:</b> Ausschnitt aus dem <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (0.5 – 4.3 ppm) von Plantazolicin A mit Oxz = Oxazol und Oxl = Oxazolin. ....	43
<b>Abbildung 4-7:</b> Ausschnitt aus dem <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (4.3 – 9.5 ppm) von Plantazolicin A mit Thz = Thiazol. ....	43
<b>Abbildung 4-8:</b> HSQC-Spektrum von Plantazolicin. ....	44
<b>Abbildung 4-9:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.6 – 1.7 ppm; F2: 0 – 40 ppm). ....	45
<b>Abbildung 4-10:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1: 1.75 – 3.35 ppm; F2: 6 – 49 ppm). ....	46

<b>Abbildung 4-11:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 3.6 – 5.2 ppm; F2: 39 – 93 ppm).....	47
<b>Abbildung 4-12:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IV (F1: 6.8 – 9.4 ppm; F2: 115 – 148 ppm).....	48
<b>Abbildung 4-13:</b> COSY-Spektrum von Plantazolicin. ....	49
<b>Abbildung 4-14:</b> Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1, F2: 0.6 – 2.2 ppm). Aus Übersichtsgründen wurde der Zoomfaktor des Ausschnittes bei der Darstellung halbiert. ....	50
<b>Abbildung 4-15:</b> Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1, F2: 1.0 – 5.5 ppm).....	51
<b>Abbildung 4-16:</b> Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1, F2: 3.5 – 10.0 ppm)....	52
<b>Abbildung 4-17:</b> Farbig eingezeichnete $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ -COSY-Kopplungen von Plantazolicin A. ....	52
<b>Abbildung 4-18:</b> Das HMBC-Spektrum von Plantazolicin.....	53
<b>Abbildung 4-19:</b> Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich Ia (F1: 0.7 – 1.0 ppm; F2: 0 – 70 ppm), Bereich Ib (F1: 1.0 – 3.3 ppm; F2: 0 – 200 ppm).....	54
<b>Abbildung 4-20:</b> Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IIa (F1: 3.5 – 5.3 ppm; F2: 10 – 190 ppm), Bereich IIb (F1: 6.75 – 7.25 ppm; F2: 25 – 165 ppm). ....	56
<b>Abbildung 4-21:</b> Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Plantazolicin A mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 8.1 – 9.4 ppm; F2: 110 – 190 ppm).....	57
<b>Abbildung 4-22:</b> Ausschnitt aus dem $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A und Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 6.6 – 9.9 ppm; F2: 70 – 140 ppm).....	58
<b>Abbildung 4-23:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für $^{15}\text{N}$ liegt bei 100 ppm). ....	59
<b>Abbildung 4-24:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für $^{15}\text{N}$ liegt bei 300 ppm). ....	60
<b>Abbildung 4-25:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von Plantazolicin A (900-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für $^{15}\text{N}$ liegt bei 200 ppm). ....	61
<b>Abbildung 4-26:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Kopplungen von Plantazolicin A. Die Farben der Pfeile entsprechen den Farben der in den Abbildungen 4-23 bis 4-25 gekennzeichneten Signale. ....	62
<b>Abbildung 4-27:</b> $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-, $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC- und $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC Korrelationen von Plantazolicin A. ....	63
<b>Abbildung 4-28:</b> Orbitrap-ESI-MS-MS-Spektren von a) $^{15}\text{N}$ -markiertem Plantazolicin A ( <b>1b</b> ) mit $\Delta m = +17$ amu im Vergleich zu b) Plantazolicin A ( <b>1a</b> ) und c) Plantazolicin B (Desmethyl-Plantazolicin, <b>2</b> ). Die gestrichelten Linien symbolisieren den Unterschied von $\Delta m = 28$ amu zwischen <b>1a</b> und <b>2</b> und ist zurückzuführen auf das Fehlen der beiden Methylgruppen am <i>N</i> -Terminus. <sup>[97]</sup> .....	64

<b>Abbildung 4-29:</b> MS/MS-Fragmentierungsschema und Peak-Zuordnung von Plantazolicin A ( <b>1a</b> ). Fragmentierungen am N- und gleichzeitig C-terminalen Ende von Plantazolicin A. ....	66
<b>Abbildung 4-30:</b> MS/MS-Fragmentierungsschema und Peak-Zuordnung von Plantazolicin A ( <b>1a</b> ). Fragmentierungen nur am C-terminalen Ende von Plantazolicin A. ....	67
<b>Abbildung 4-31:</b> Das Biosynthesemodell der Plantazolicin-Biosynthese. Oxz = Oxazol, Thz = Thiazol, MeOxz = 5-Methyloxazol, MeOxl = 5-Methyloxazolin. <sup>[97]</sup> .....	70
<b>Abbildung 5-1:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme von dem Stamm <i>Streptomyces</i> sp. Acta 3034 (Kolonie auf der Agarplatte). <sup>[109]</sup> .....	72
<b>Abbildung 5-2:</b> HPLC-Analyse des Kulturfiltratextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. Acta 3034 bei einer Fermentationszeit von 70 h, gemessen bei $\lambda = 230$ nm. Einfügungen: UV/Vis-Spektren der Hauptkomponente Langkocyclin A3 ( <b>3</b> , <b>1</b> und <b>2</b> sind fast deckungsgleich) und von Tetrangomycin ( <b>6</b> ). <sup>[110]</sup> .....	73
<b>Abbildung 5-3:</b> <b>a)</b> Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A1 im Negativ-Ionenmodus; <b>b)</b> Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=6.74$ min. ....	75
<b>Abbildung 5-4:</b> <b>a)</b> Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A2 im Negativ-Ionenmodus; <b>b)</b> Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=7.71$ min. ....	75
<b>Abbildung 5-5:</b> <b>a)</b> Totalionenchromatogramm des Langkocyclins A3 im Negativ-Ionenmodus; <b>b)</b> Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=8.47$ min. ....	76
<b>Abbildung 5-6:</b> <b>a)</b> Totalionenchromatogramm des Langkocyclins B1 im Negativ-Ionenmodus; <b>b)</b> Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=10.02$ min. ....	76
<b>Abbildung 5-7:</b> <b>a)</b> Totalionenchromatogramm des Langkocyclins B2 im Negativ-Ionenmodus; <b>b)</b> Massenspektrum bei der Retentionszeit $R_t=10.19$ min. ....	77
<b>Abbildung 5-8:</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3. OH-8 stellt die Hydroxygruppe an Position 8 des Aglycons dar. ....	78
<b>Abbildung 5-9:</b> Ausschnitt aus dem <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (0.2 – 3.8 ppm) von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben. ....	80
<b>Abbildung 5-10:</b> Ausschnitt aus dem <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (3.8 – 8.0 ppm) von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben. ....	80
<b>Abbildung 5-11:</b> <sup>13</sup> C-APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3. Die Buchstaben A-E bezeichnen Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben. ....	81
<b>Abbildung 5-12:</b> HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3. ....	82
<b>Abbildung 5-13:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.3 – 2.8 ppm; F2: 12 – 58 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. Die Signale des Aglycons besitzen eine Zahlenbezeichnung ohne Buchstaben. ....	83
<b>Abbildung 5-14:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich II (F1: 2.8 – 5.5 ppm; F2: 63 – 106 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. ....	84

<b>Abbildung 5-15:</b> Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 6.2 – 7.9 ppm; F2: 112 – 150 ppm). Die Zahlenbezeichnung beschreibt die Signale des Aglycons. ....	85
<b>Abbildung 5-16:</b> COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung zwei identifizierter Signale, die zu den Protonen des Aglycons gehören. ....	86
<b>Abbildung 5-17:</b> Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1, F2: 0.0 – 5.6 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. ....	87
<b>Abbildung 5-18:</b> Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1, F2: 0.0 – 5.6 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. ....	88
<b>Abbildung 5-19:</b> Ausschnitte aus dem COSY-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich a: (F1, F2: 1.3 – 2.3 ppm), Bereich b: (F1, F2: 1.3 – 4.5 ppm). Die Buchstaben A-E bezeichnen die Signale der Desoxyzucker. ....	89
<b>Abbildung 5-20:</b> COSY-Kopplungen von Langkocyclin A3. ....	90
<b>Abbildung 5-21:</b> HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3. ....	91
<b>Abbildung 5-22:</b> Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich I (F1: 0.30 – 1.69 ppm; F2: 5 – 115 ppm).....	92
<b>Abbildung 5-23:</b> Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich IIa (F1: 1.63 – 2.80 ppm; F2: 10 – 115 ppm), Bereich IIb (F1: 1.80 – 2.00 ppm; F2: 10 – 115 ppm). ....	93
<b>Abbildung 5-24:</b> Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale; Bereich III (F1: 2.80 – 3.75 ppm; F2: 5 – 115 ppm).....	95
<b>Abbildung 5-25:</b> Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 3.8 – 5.7 ppm; F2: 10 – 110 ppm). ....	96
<b>Abbildung 5-26:</b> Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Langkocyclin A3 mit Zuordnung der identifizierten Signale (F1: 6.0 – 8.2 ppm; F2: 70 – 198 ppm). ....	97
<b>Abbildung 5-27: I)</b> Strukturen der Langkocycline A3 ( <b>3</b> ) und B2 ( <b>5</b> ). <b>II)</b> $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Korrelationen der Langkocycline A3 ( <b>3</b> ) und B2 ( <b>5</b> ). ....	99
<b>Abbildung 5-28:</b> Bestimmung der Stellung des anomeren Protons der 2,3,6-Tridesoxyhexosen in den Langkocyclinen. ....	100
<b>Abbildung 5-29:</b> Bestimmung der Stellung des Protons an Position 4 der 2,3,6-Tridesoxyhexosen. ....	101
<b>Abbildung 5-30:</b> Bestimmung der Stellung des anomeren Protons der 2,6-Didesoxyhexosen. ....	101
<b>Abbildung 5-31:</b> Bestimmung der Stellung des Protons an Position 4 der 2,6-Didesoxyhexosen. ....	102
<b>Abbildung 5-32:</b> Kopplungskonstanten und wichtige NOESY-Korrelationen der Rhodinosen und Olivosen. ....	102

---

<b>Abbildung 5-33:</b> Polyketidrückgrat der Langkocycline mit den beschrifteten Stereozentren. ....	103
<b>Abbildung 5-34:</b> CD-Spektren von Langkocyclin A1-A3 verglichen mit Urdamycin A. ....	104
<b>Abbildung 5-35:</b> CD-Spektren von Langkocyclin B1 und B2. ....	104
<b>Abbildung 5-36:</b> Aufgrund der CD-Spektren abgeleitete absolute Konfigurationen der Stereozentren im Polyketidrückgrat. ....	105
<b>Abbildung 5-37:</b> Strukturen von Tetrangomycin, Tetrangulol, Urdamycin A, Urdamycin D, Urdamycin K und Sakyomicin C. ....	108
<b>Abbildung 5-38:</b> Strukturen der Langkocycline A1 (1), A2 (2), A3 (3), B1 (4) und B2 (5). ....	109
<b>Abbildung 5-39:</b> Strukturen des Aza-Analogons <b>A</b> und der glykomodifizierten Angucycline <b>B</b> und <b>C</b> . ....	111

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1-1:</b> Überblick über die verschiedenen PKS-Typen, ihre Bausteine und ihr Vorkommen. <sup>[28]</sup> .....	8
<b>Tabelle 1-2:</b> Liste einiger 2,6-Di- und 2,3,6-Tridesoxyhexosen. <sup>[53]</sup> .....	13
<b>Tabelle 2-1:</b> Einteilung der Ionisationsmethoden. ....	20
<b>Tabelle 2-2:</b> Einteilung der Massenanalytoren. ....	22
<b>Tabelle 4-1:</b> Physikochemische Eigenschaften von Plantazolicin A, <sup>15</sup> N-Plantazolicin und Plantazolicin B; n.b. = nicht bestimmt. ....	39
<b>Tabelle 5-1:</b> Physikochemische Eigenschaften der Langkocycline A1, A2, A3, B1 und B2. ....	74
<b>Tabelle 5-2:</b> Ergebnisse der hochauflösenden ESI-Orbitrap-Massenspektrometrie.....	77
<b>Tabelle 5-3:</b> Maxima der CD-Spektren der Langkocycline. ....	105
<b>Tabelle 5-4:</b> Biologische Aktivität der Substanzen <b>1-6</b> , IC <sub>50</sub> -Werte angegeben in µM, n.b.= nicht bestimmt aufgrund geringer Substanzmenge; <sup>a</sup> = Der Bereich ist angegeben, da die Messungen aufgrund nicht ausreichender Substanzmengen nicht wiederholt werden konnten. <sup>[110]</sup> .....	106
<b>Tabelle 6-1:</b> HPLC-Parameter für das chemische Screening.....	114
<b>Tabelle 6-2:</b> Chromatographische Parameter der HPLC-DAD-ESI-Massenspektrometrie.....	115
<b>Tabelle 6-3:</b> Chromatographische Parameter der HPLC-ESI-FT-Orbitrap-Massenspektrometrie.....	116
<b>Tabelle 6-4:</b> Auflistung der verwendeten NMR-Geräte.....	116
<b>Tabelle 6-5:</b> Eingesetzte Parameter bei der CD-Spektroskopie. ....	117



## 10 Anhang

### 14.1 Plantazolicin

**Tabelle 14-1:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ - Signale von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

	Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	$\delta$ ( $^{15}\text{N}$ ) (p.p.m.)
<i>N,N</i> -diMeArg <sup>1</sup>	$\alpha$	3.93 (t, 7.1)	65.2	30.7
	$\beta$	1.84, 1.99 (m)	28.5	—
	$\gamma$	0.84, 1.24 (m)	22.2	—
	$\delta$	3.09 (m)	40.0	—
	$\epsilon$	9.23	—	84.9
	$\zeta$	—	n.d.	—
	$\eta_1/\eta_2$	7.67, 7.72 (m)	—	109.17, 123.62
	gem-CH <sub>3</sub>	2.26 (s)	41.1	—
Thz <sup>2</sup>	2	—	173.4	—
	3	—	—	312.1
	4	—	141.0	—
	5	8.41 (s)	122.2	—
5-MeOxz <sup>3</sup>	2	—	n.d.	—
	3	—	—	250.0
	4	—	129.7	—
	5	—	147.4	—
	6	2.83 (s)	11.4	—
Thz <sup>4</sup>	2	—	161.5	—
	3	—	—	303.7
	4	—	142.5	—
	5	8.47 (s)	121.5	—
5-MeOxz <sup>5</sup>	2	—	n.d.	—
	3	—	—	249.5
	4	—	124.8	—
	5	—	150.5	—
	6	2.75 (s)	11.3	—
5-MeOxz <sup>6</sup>	2	—	n.d.	—
	3	—	—	246.9
	4	—	129.0	—
	5	—	152.2	—
	6	2.64 (s)	11.00	—
	C(O)	—	171.0	—
Ile <sup>7</sup>	NH	7.89 (d, 9.2)	—	113.9
	$\alpha$	4.48 (pt, 8.4, 8.7)	56.4	—
	$\beta$	1.93 (m)	36.7	—
	$\gamma_1$	1.42, 1.06 (d, 6.6)	24.1	—
	$\gamma_2$	0.88 (m)	10.5	—
	$\delta$	0.83 (m)	10.6	—

Ile <sup>8</sup>	C(O)	—	176.9	—
	NH	8.78 (d, 7.1)	—	118.6
	α	4.93 (t, 7.8)	51.2	—
	β	2.04 (m)	36.6	—
	γ1	1.23, 1.06 (d, 6.6)	28.5	—
	γ2	0.86	15.1	—
	δ	0.85 (m)	13.7	—
Oxz <sup>9</sup>	2	—	164.2	—
	3	—	—	248.5
	4	—	n.d.	—
	5	8.96 (s)	140.6	—
Oxz <sup>10</sup>	2	—	155.2	—
	3	—	—	246.8
	4	—	n.d.	—
	5	9.08 (s)	140.6	—
Oxz <sup>11</sup>	2	—	n.d.	—
	3	—	—	247.2
	4	—	n.d.	—
	5	9.11 (s)	140.8	—
Oxz <sup>12</sup>	2	—	154.7	—
	3	—	—	250.1
	4	—	n.d.	—
	5	8.81 (s)	142.5	—
5-MeOxl <sup>13</sup>	2	—	156.9	—
	3	—	—	222.1
	4	4.23 (d, 7.6)	74.3	—
	5	4.61 (m)	79.4	—
	6	1.44 (d, 6.2)	20.9	—
	C(O)	—	168.53	—
Phe <sup>14</sup>	NH	7.23 (d, 6.3)	—	122.0
	α	4.06 (pq(dt), 5.3, 6.9)	54.4	—
	β	2.92 (d, 12.3), 3.03 (d, 5.8)	37.1	—
	γ	—	138.4	—
	δ1/δ2	6.96 (Signalüberlagerung mit 6.99)	129.2	—
	ε1/ε2	7.02 (t, 7.1)	127.1	—
	ζ	6.99 (Signalüberlagerung mit 6.96)	125.3	—
	C(O)	—	172.4	—

pq = pseudoquartett (dt)

*N,N*-diMeArg = *N,N*-Dimethylarginin, Thz = Thiazol, 5-MeOxz = 5-Methyloxazol, Ile = Isoleucin, Oxz = Oxazol, 5-MeOxl = 5-Methyloxazolin and Phe<sup>14</sup> = Phenylalanin.

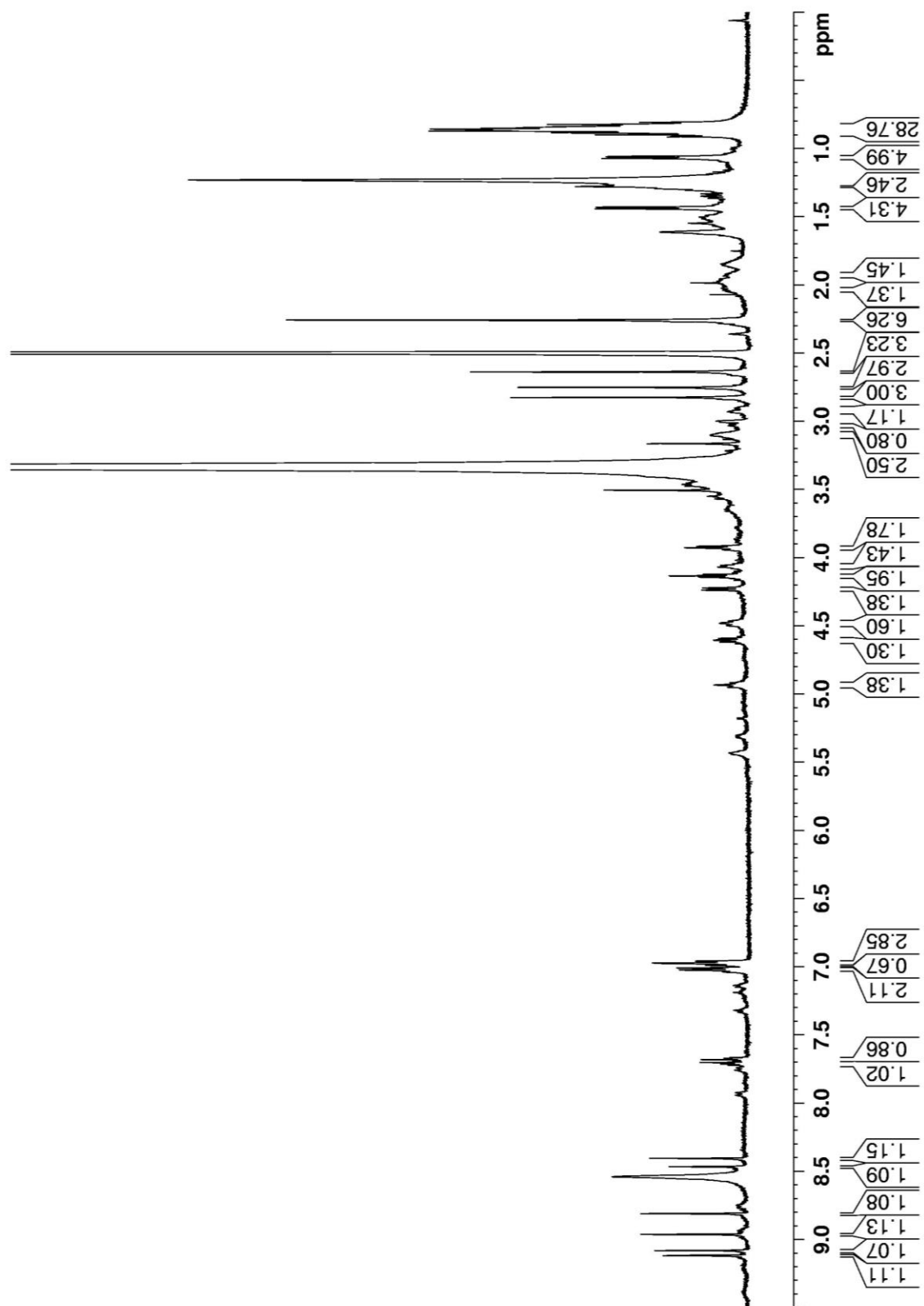


Abbildung 14-1:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

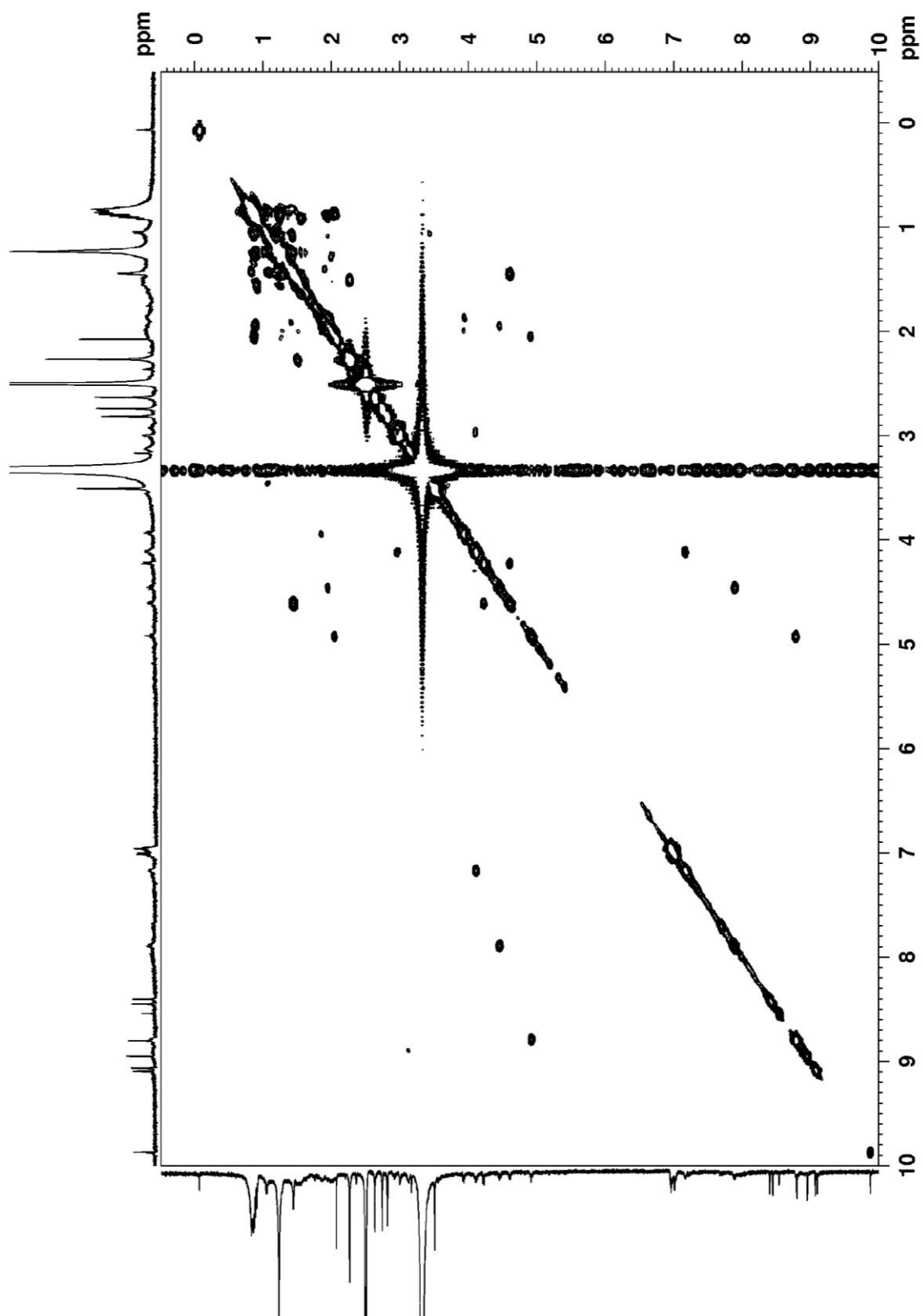


Abbildung 14-2:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

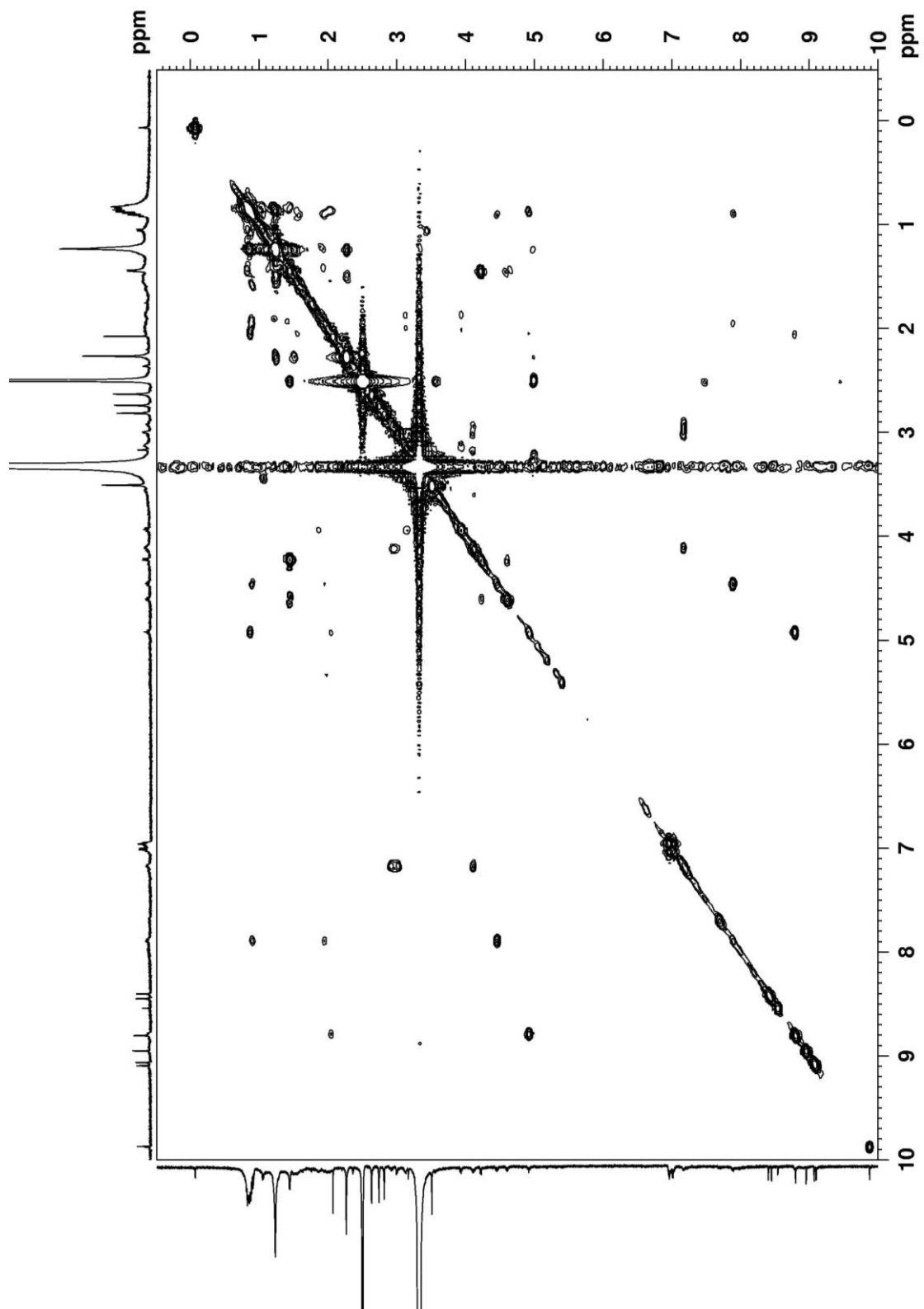


Abbildung 14-3:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

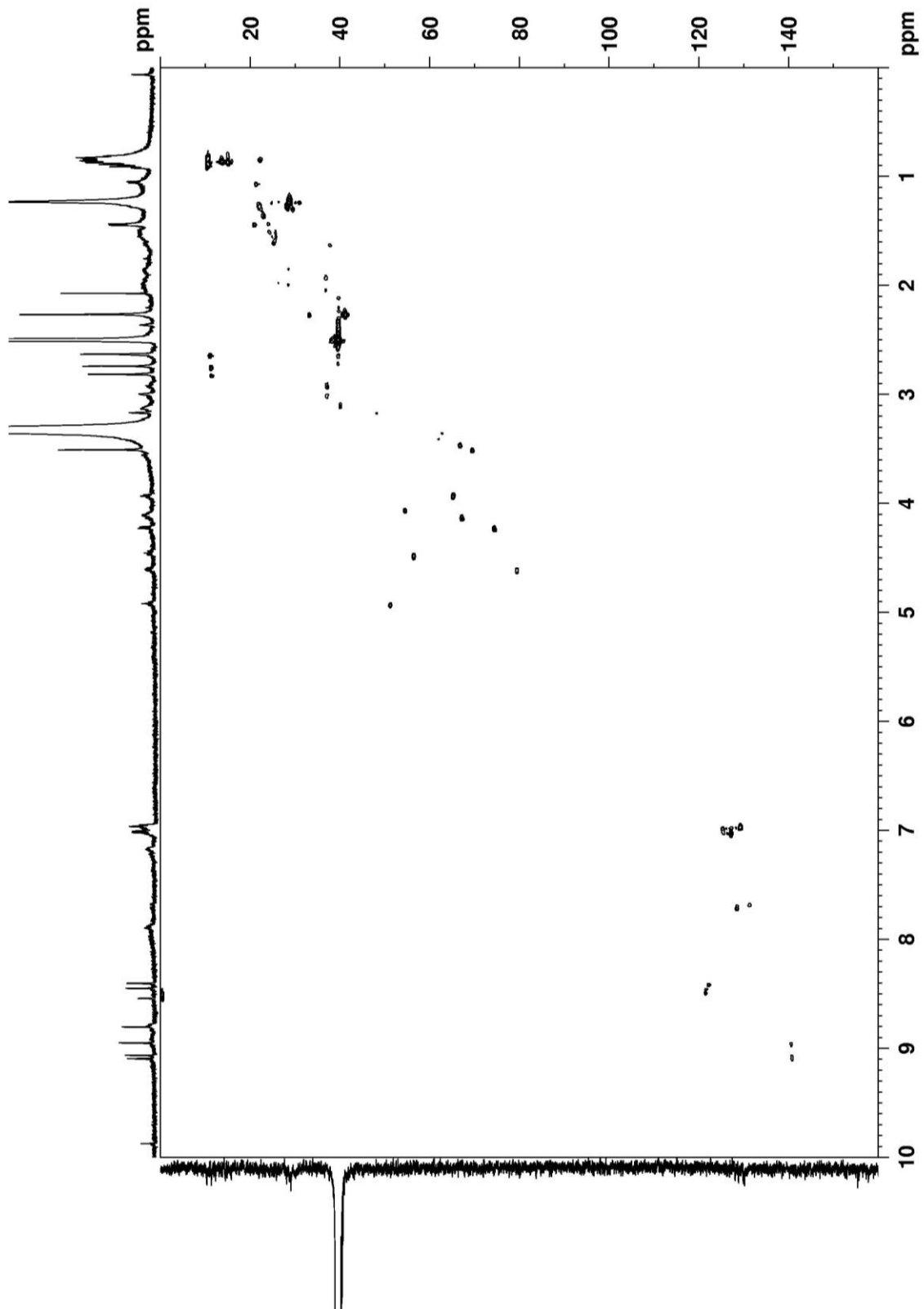


Abbildung 14-4:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

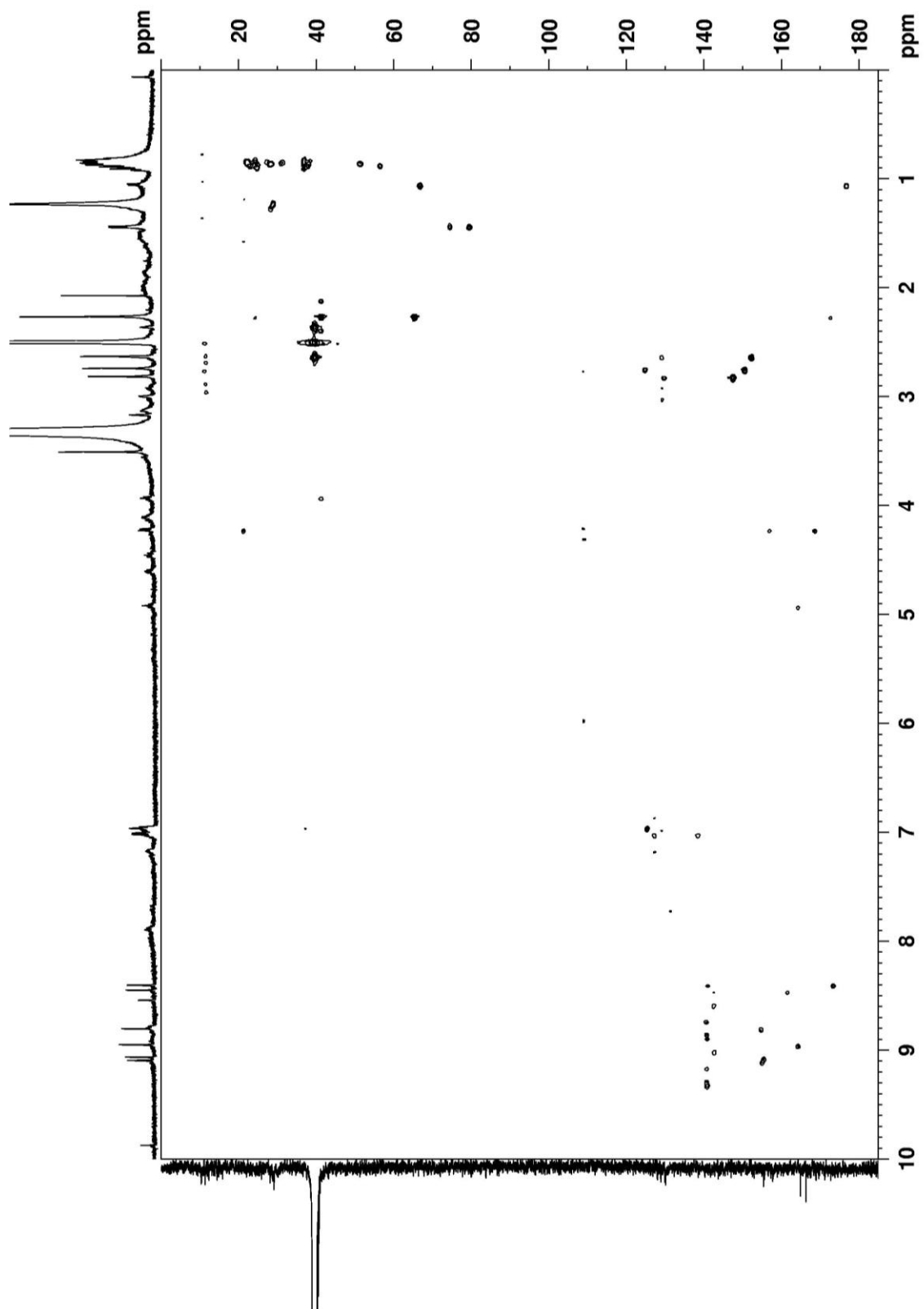


Abbildung 14-5:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO}-d_6$ .

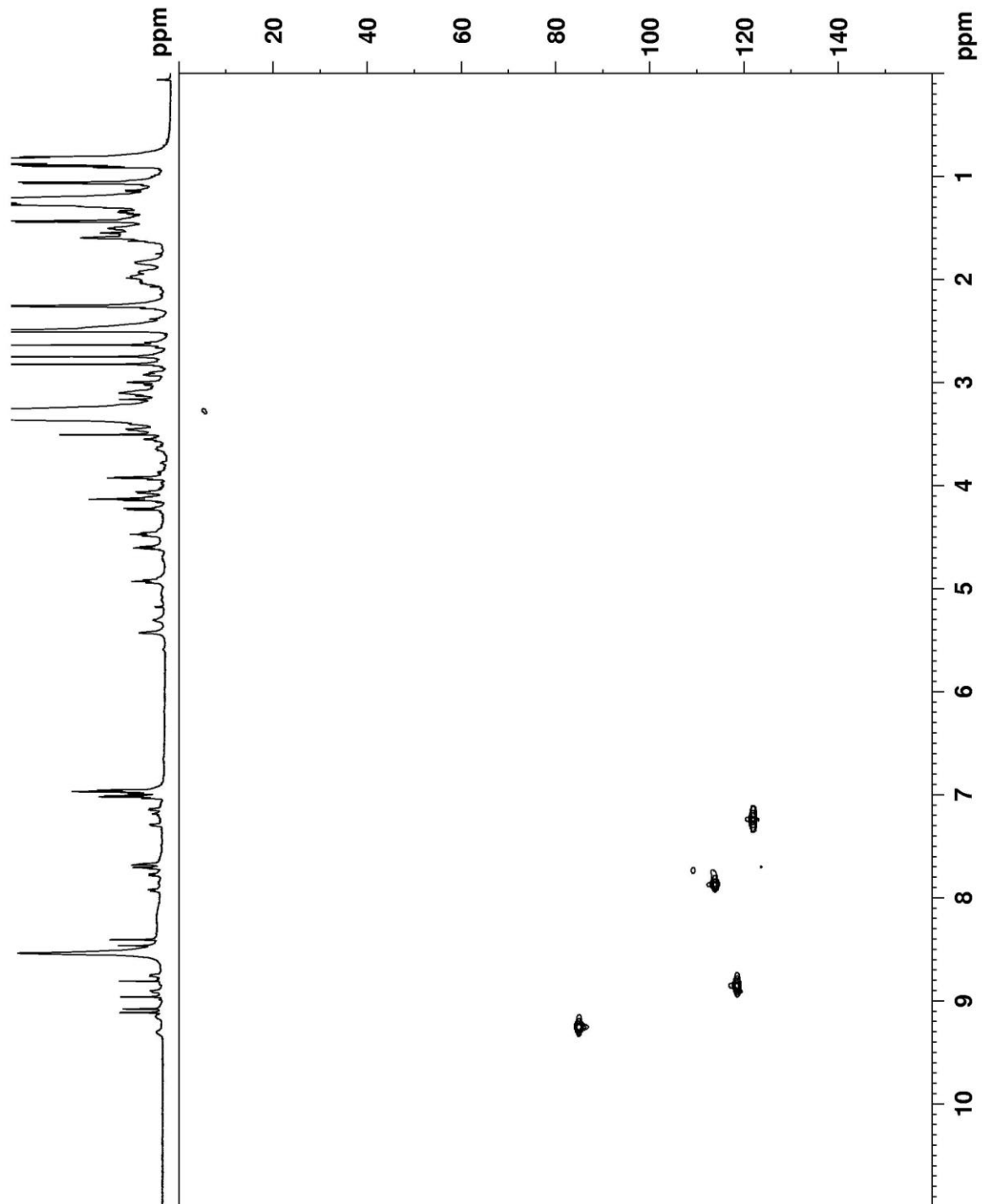
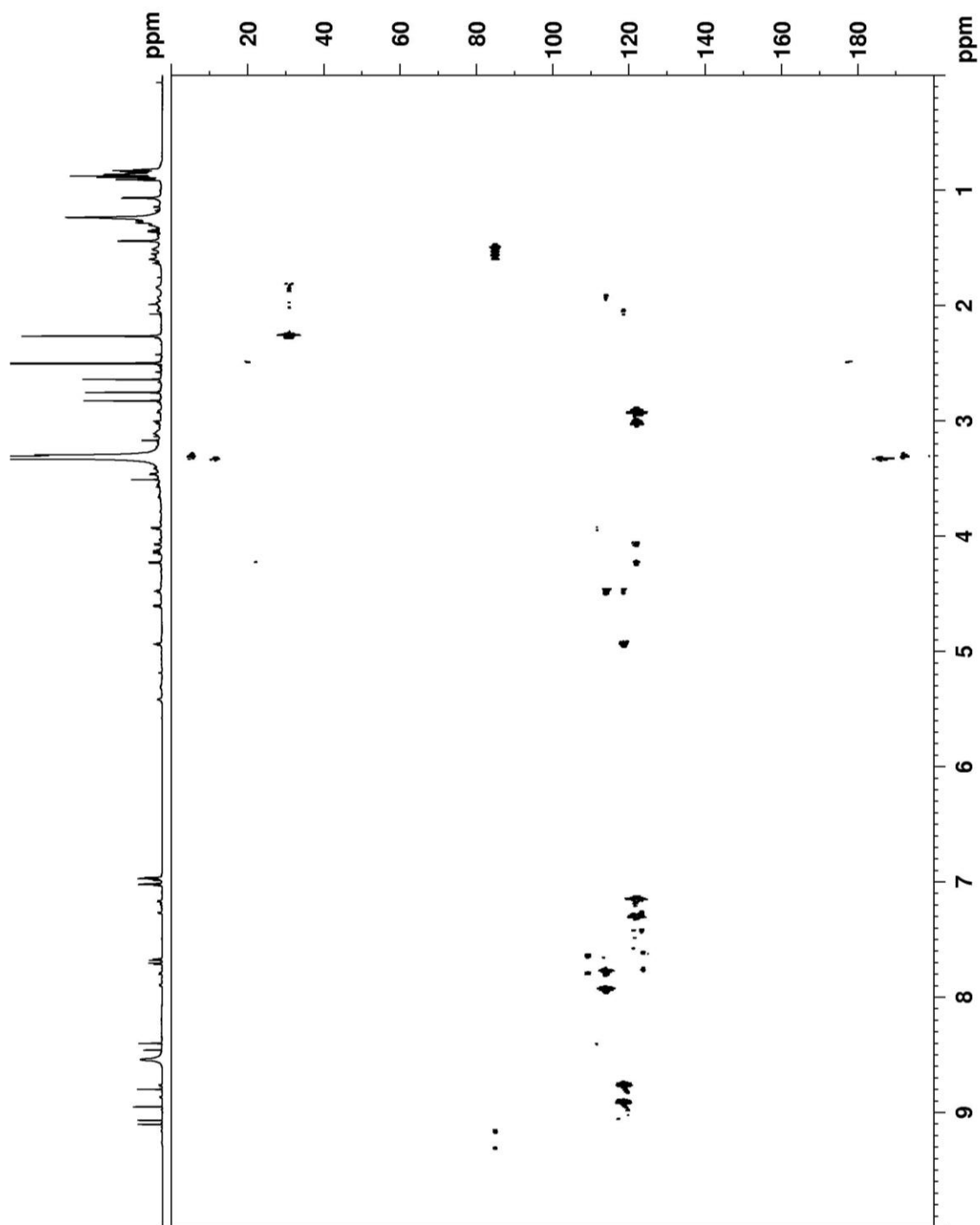
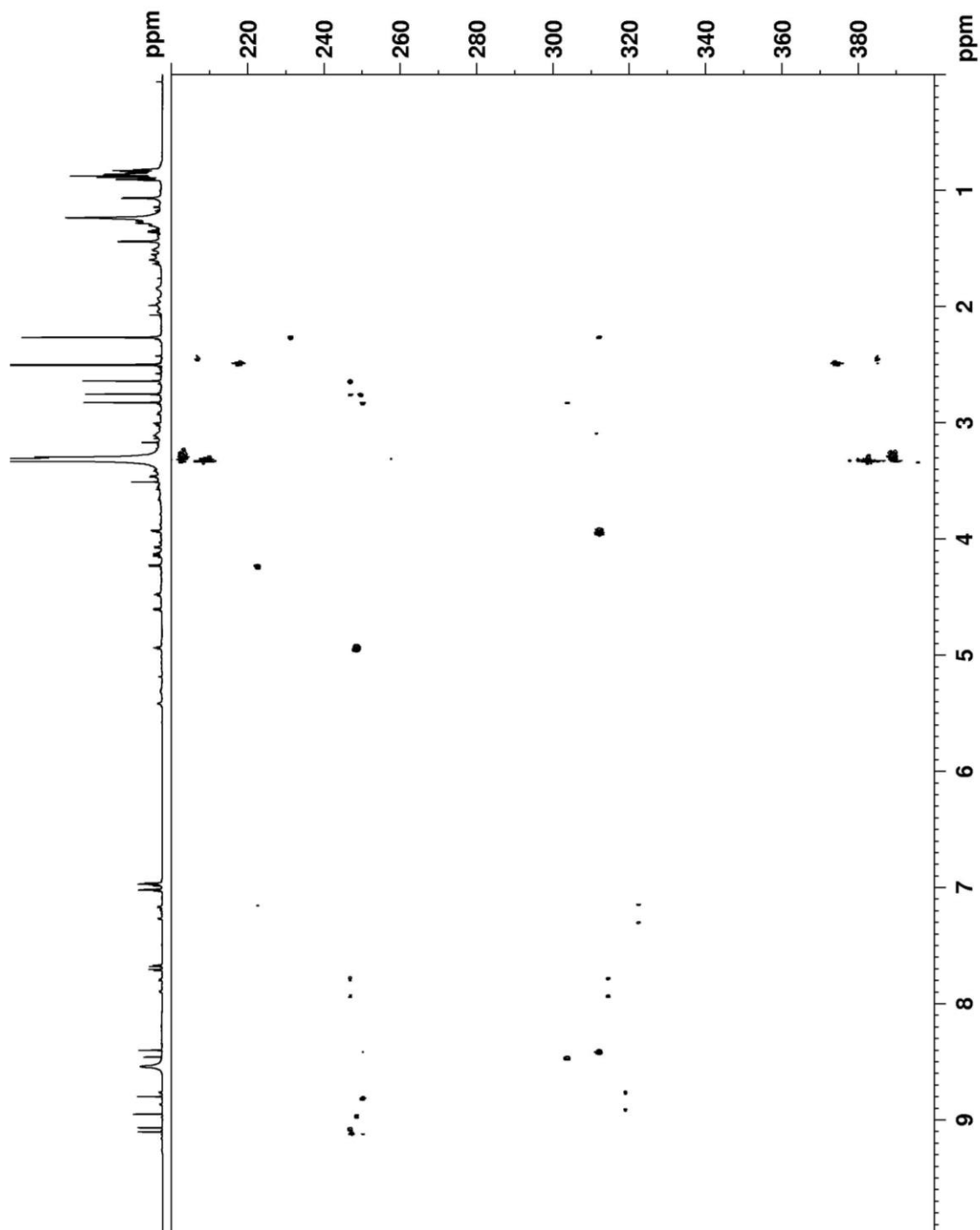


Abbildung 14-6:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

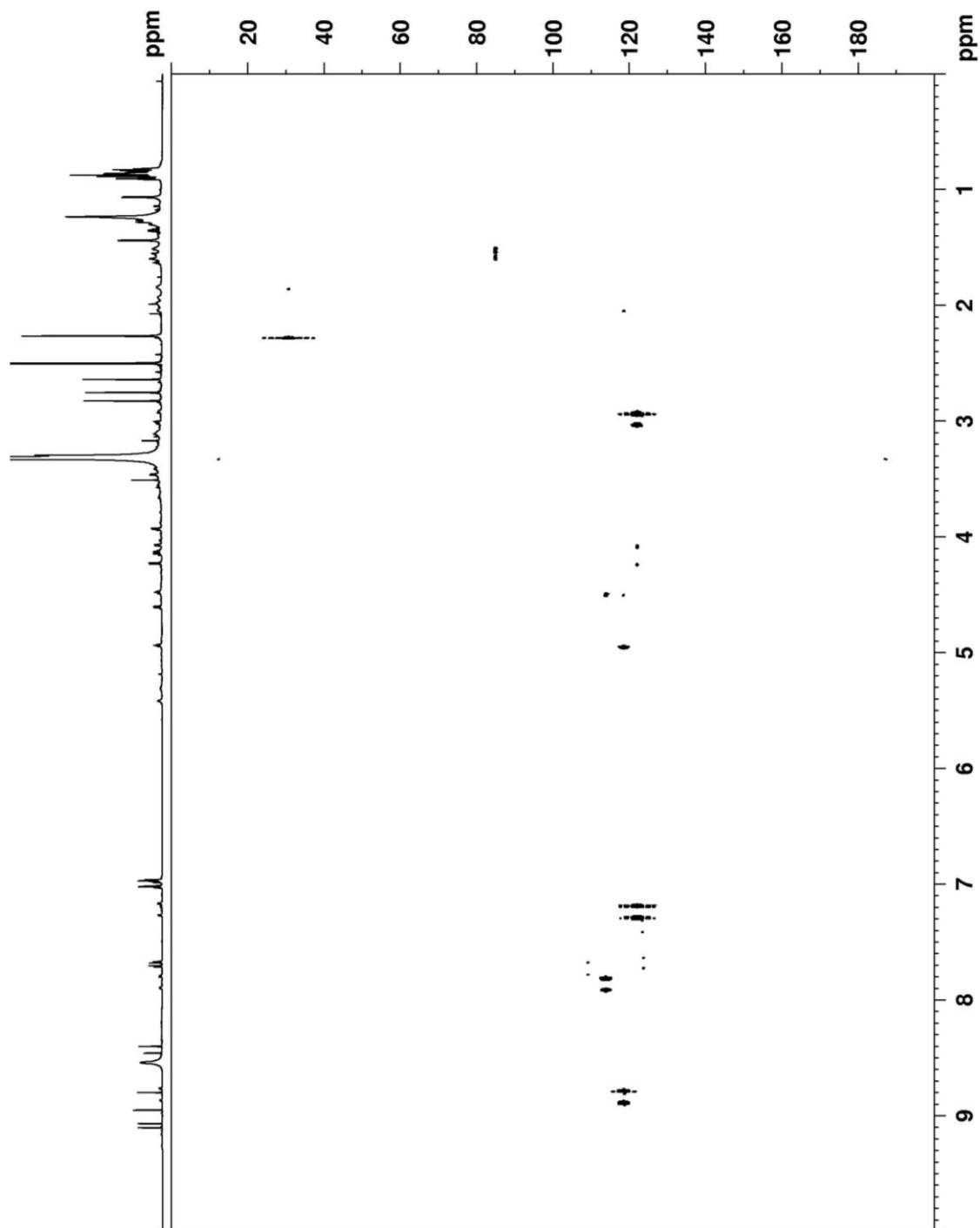




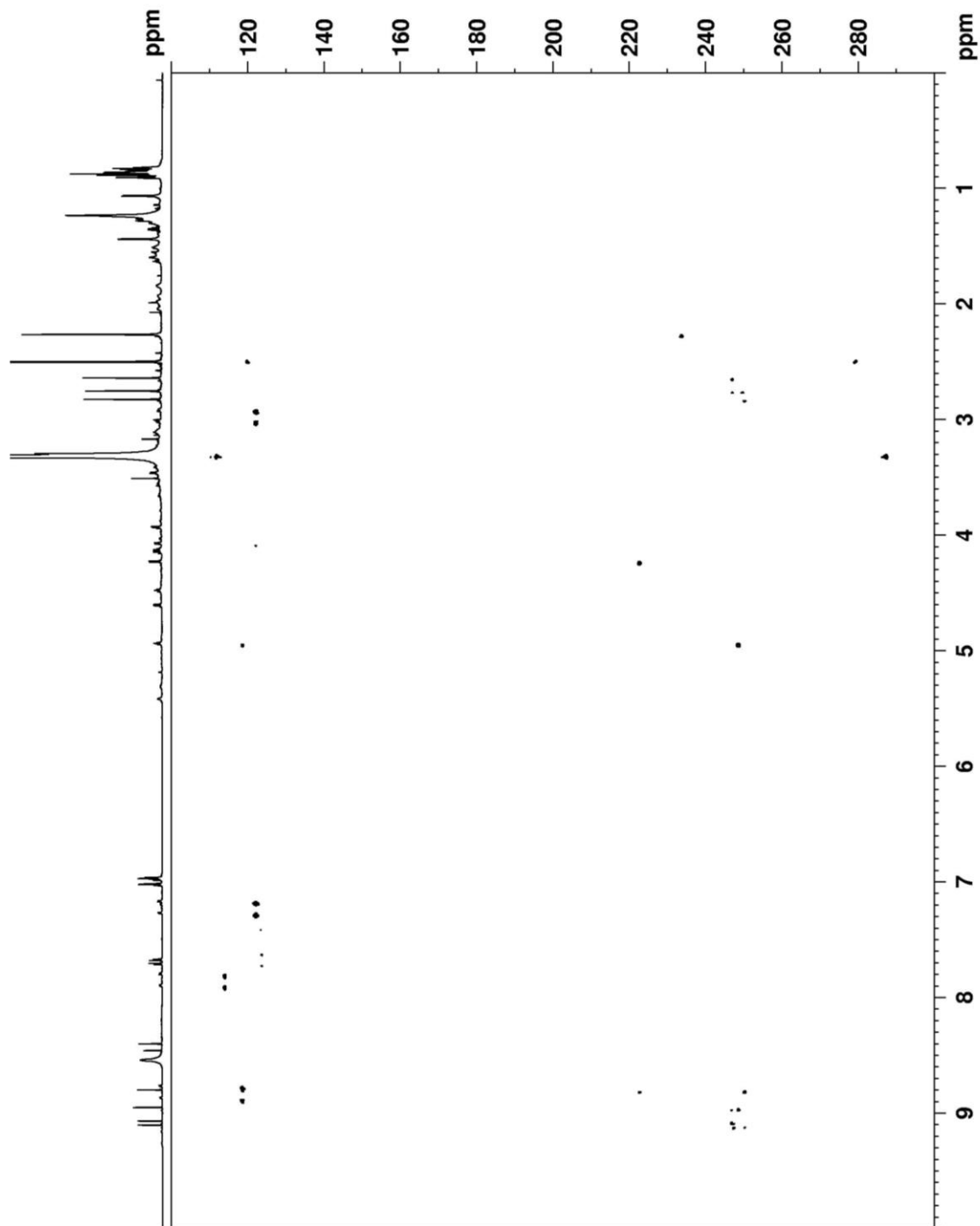
**Abbildung 14-7:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$  (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 100 ppm).



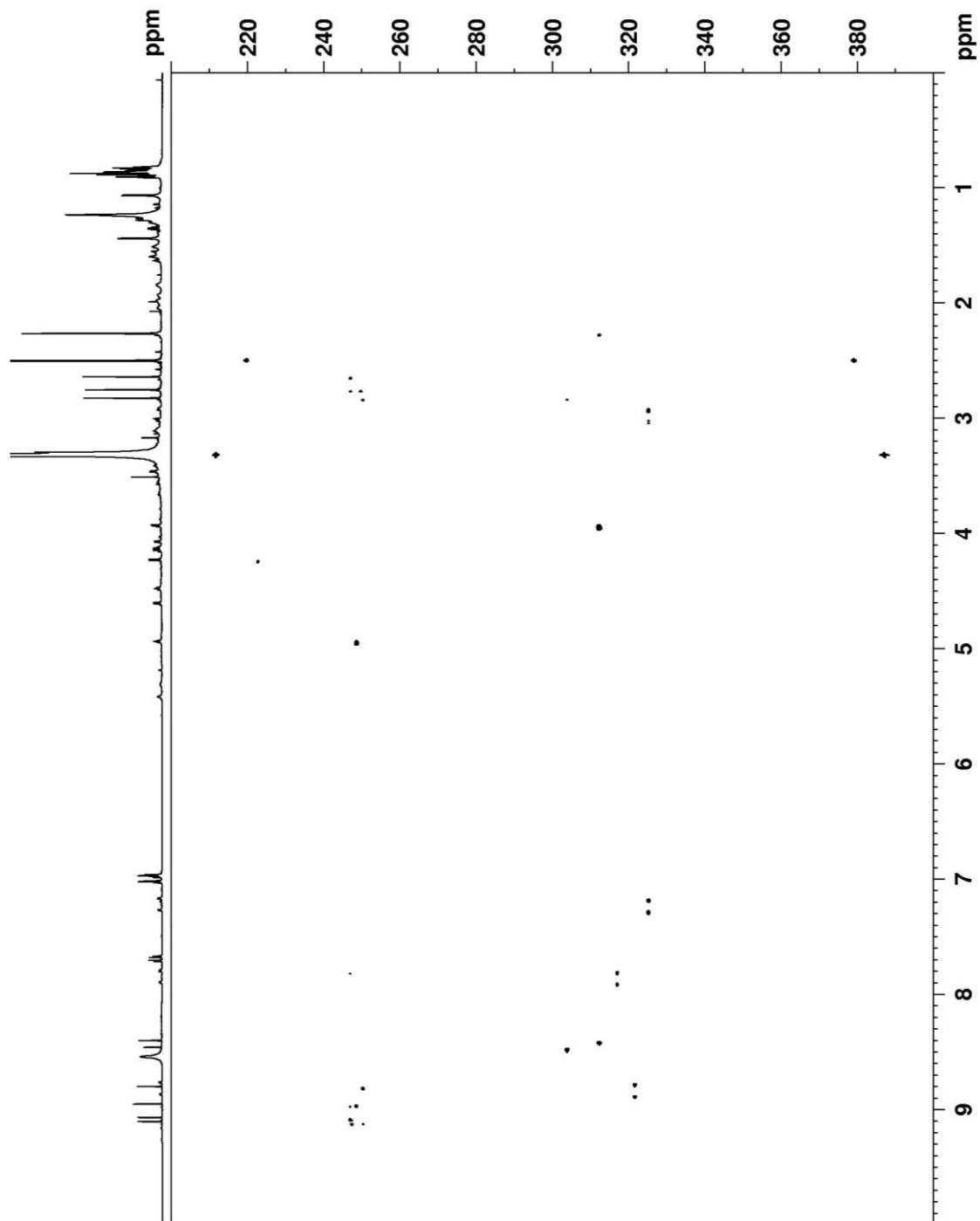
**Abbildung 14-8:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$  (600-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 300 ppm).



**Abbildung 14-9:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$  (900-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 100 ppm).



**Abbildung 14-10:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO-}d_6$  (900-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 200 ppm).



**Abbildung 14-11:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Plantazolicin A in  $\text{DMSO}-d_6$  (900-MHz-NMR-Spektrometer, die Mitte des Messbereichs für  $^{15}\text{N}$  liegt bei 300 ppm).

## 14.2 Langkocyclin A1

**Tabelle 14-2:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und COSY Signale von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	HMBC	COSY
1	—	201.5	—	—
2 <sub>eq</sub>	2.66 (1H, dd, 12.0, 2.5)	55.2	1, 3, 4, 12b, 13	4 <sub>eq</sub>
2 <sub>ax</sub>	2.62 (1H, d, 12.0)	55.2	1, 3, 4, 12b, 13	13
3	—	73.9	—	—
3-OH	1.79 (1H, s)	—	2, 3, 4, 13	—
4 <sub>eq</sub>	2.14 (1H, dd, 14.6, 2.4)	46.6	2, 3, 4a, 5, 12b, 13	2 <sub>eq</sub> , 4 <sub>ax</sub>
4 <sub>ax</sub>	1.89 (1H, Signalüberlagerung)	46.6	3, 12b, 13	4 <sub>eq</sub>
4a	—	78.0	—	—
4a-OH	3.19 (1H, s)	—	4, 4a, 12b	—
5	6.40 (1H, d, 9.8)	147.1	1, 4, 4a, 6, 12, 12a, 12b	6
6	6.86 (1H, d, 9.8)	116.9	4, 4a, 6a, 7, 12, 12a, 12b	5
6a	—	137.7	—	—
7	—	188.6	—	—
7a	—	115.2	—	—
8	—	162.3	—	—
8-OH	11.89 (1H, s)	—	7a, 8, 9, 10	—
9	7.29 (1H, dd, 8.2, 1.4)	125.1	7, 7a, 8, 11, 11a	10
10	7.68 (1H, pt, 7.6, 8.2)	137.8	7, 7a, 8, 9, 11, 11a, 12	9, 11
11	7.63 (1H, dd, 7.6, 1.4)	120.5	7, 7a, 9, 12	10
11a	—	132.5	—	—
12	—	183.3	—	—
12a	—	139.4	—	—
12b	—	80.8	—	—
13	1.40 (3H, s)	29.0	2, 3, 4	2 <sub>ax</sub>

Zuckersignale

A1	5.28 (1H, br, s)	95.1	12b, A3, A5	A2 <sub>eq</sub> , A2 <sub>ax</sub>
A2 <sub>eq</sub>	1.90 (1H, m)	24.6	A1, A4, A5	A1, A2 <sub>ax</sub>
A2 <sub>ax</sub>	1.73 (1H, m)	24.6	A1, A3, A4	A1, A2 <sub>eq</sub>
A3 <sub>eq</sub>	n.d	—	—	—
A3 <sub>ax</sub>	1.86 (1H, m)	25.0	A5	A4
A4	3.32 (1H, br, s)	76.5	A3	A3 <sub>ax</sub> , A5
A5	3.58 (1H, q, 6,5)	67.4	A1, A4, A6	A4, A6
A6	0.50 (3H, d, 6.5)	16.8	A4, A5	A5
B1	4.35 (1H, dd, 9.7, 1.9)	101.9	A4, B2, B3, B5	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub>
B2 <sub>eq</sub>	2.05 (1H, ddd, 12.6, 5.1, 1.9)	39.6	B1, B3, B4	B1, B2 <sub>ax</sub> , B3
B2 <sub>ax</sub>	1.47 (1H, m)	39.6	B1, B3, B4	B1, B2 <sub>eq</sub> , B3
B3	3.45 (1H, m)	72.3	B2, B4, B5	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub> , B4
B4	2.98 (1H, pt, 8.8, 8.8)	78.3	B2, B3, B5, B6	B3, B5
B4-OH	n.d.	—	—	—
B5	3.15 (1H, m)	72.1	B1, B3, B4, B6	B4, B6
B6	1.24 (3H, d, 6.1)	18.2	B4, B5	B5

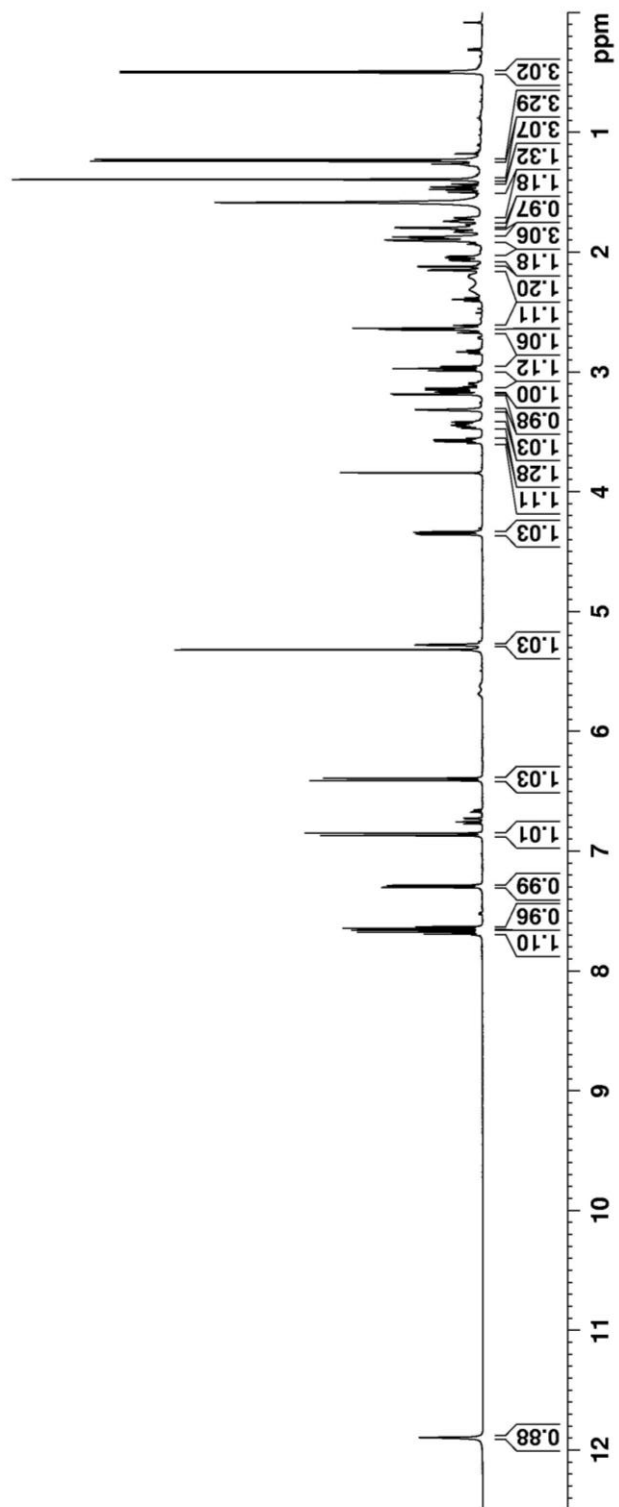


Abbildung 14-12:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .



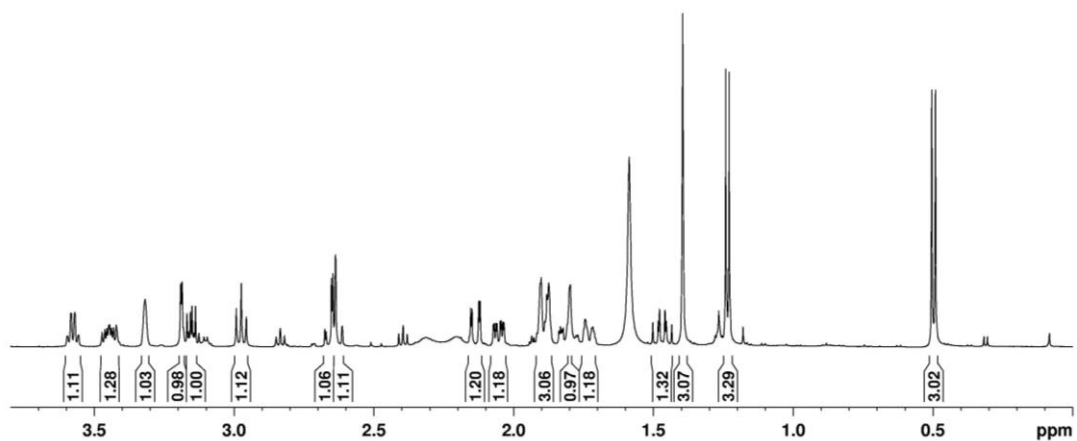


Abbildung 14-13: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (0.0 – 3.8 ppm) von Langkocyclin A1 (1) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.

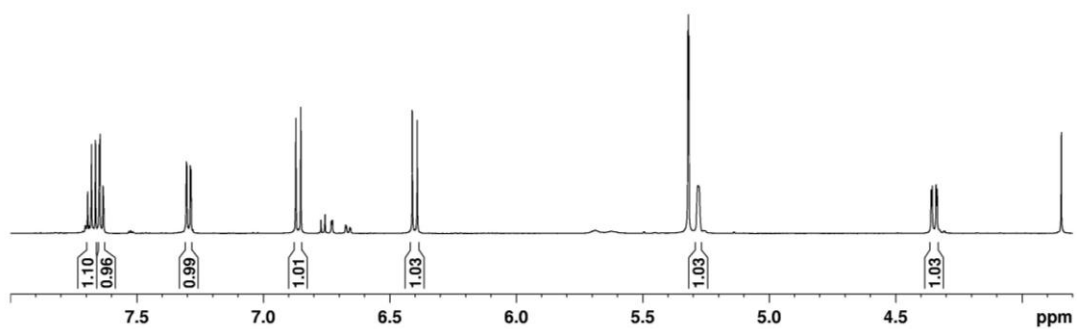
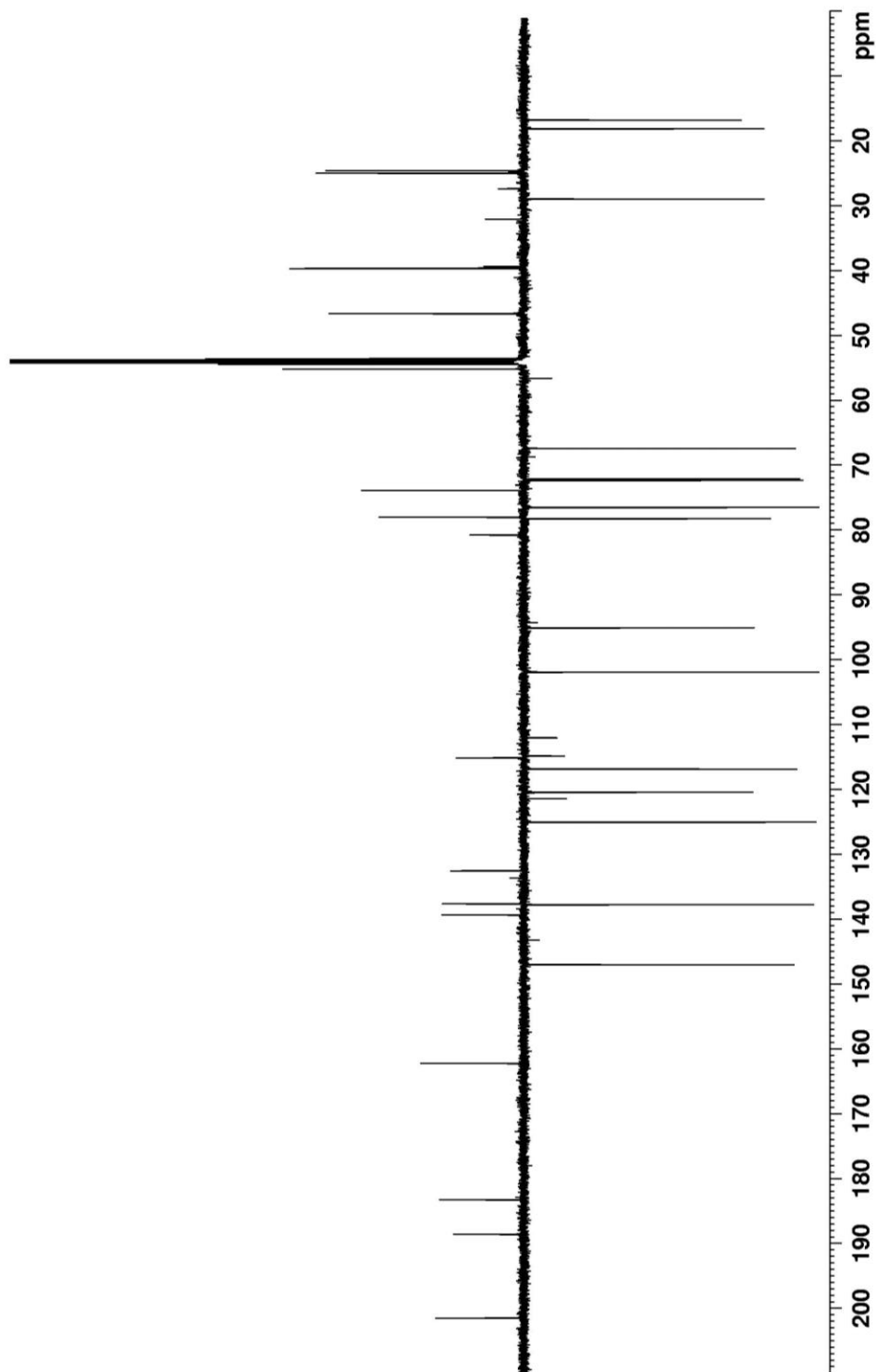


Abbildung 14-14: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (3.8 – 8.0 ppm) von Langkocyclin A1 (1) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.



**Abbildung 14-15:**  $^{13}\text{C}$ -APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

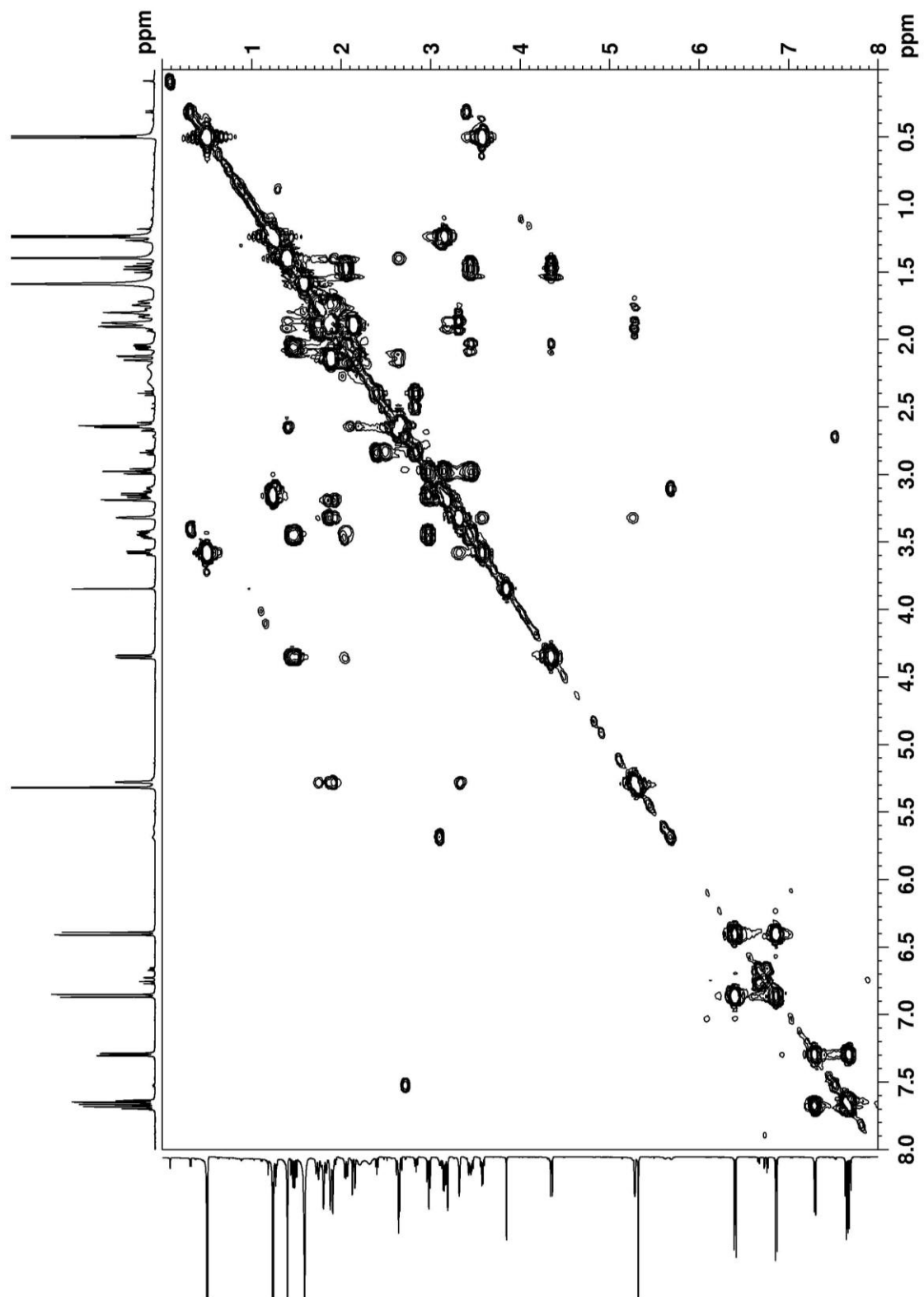


Abbildung 14-16:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

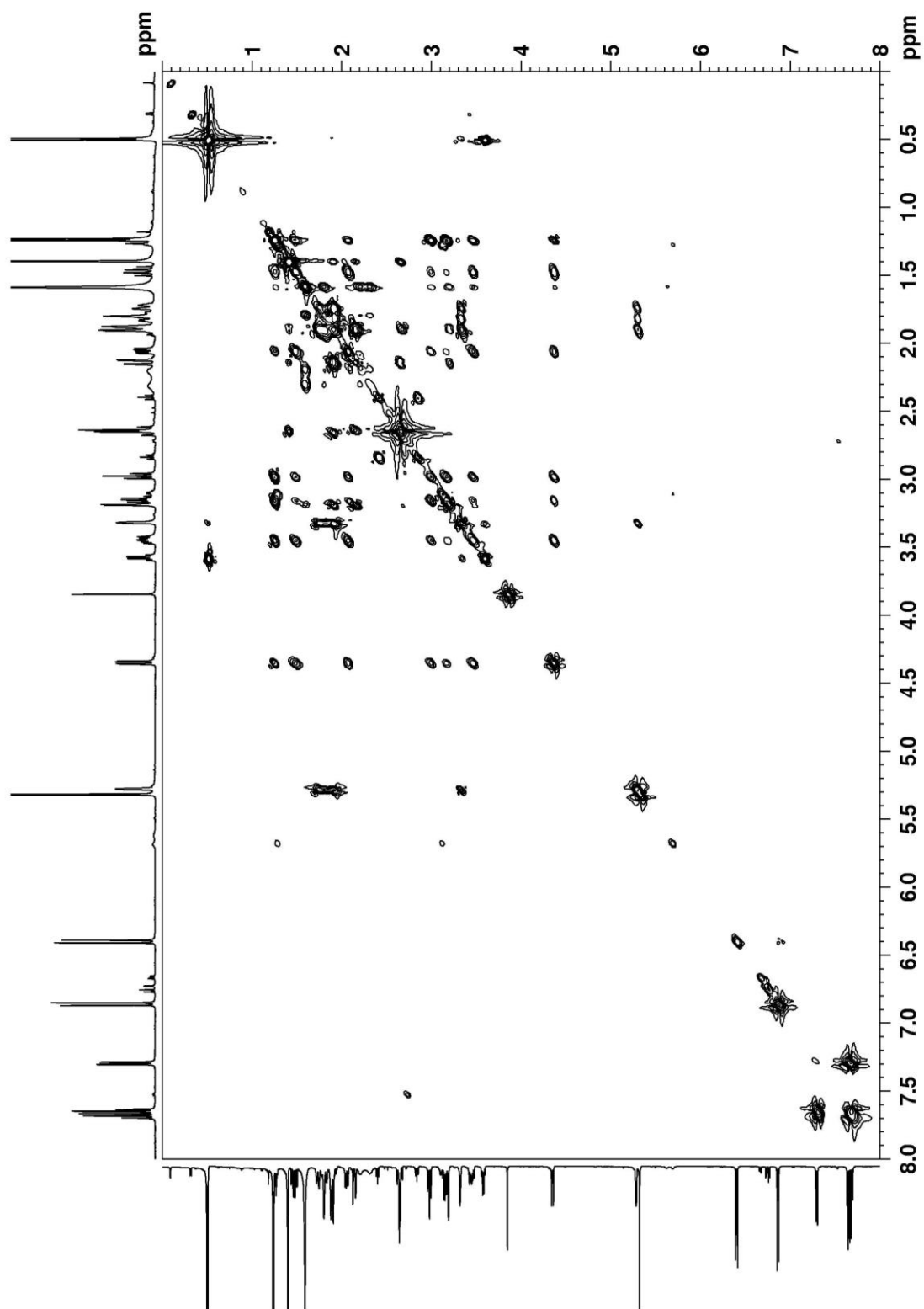


Abbildung 14-17:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (**1**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

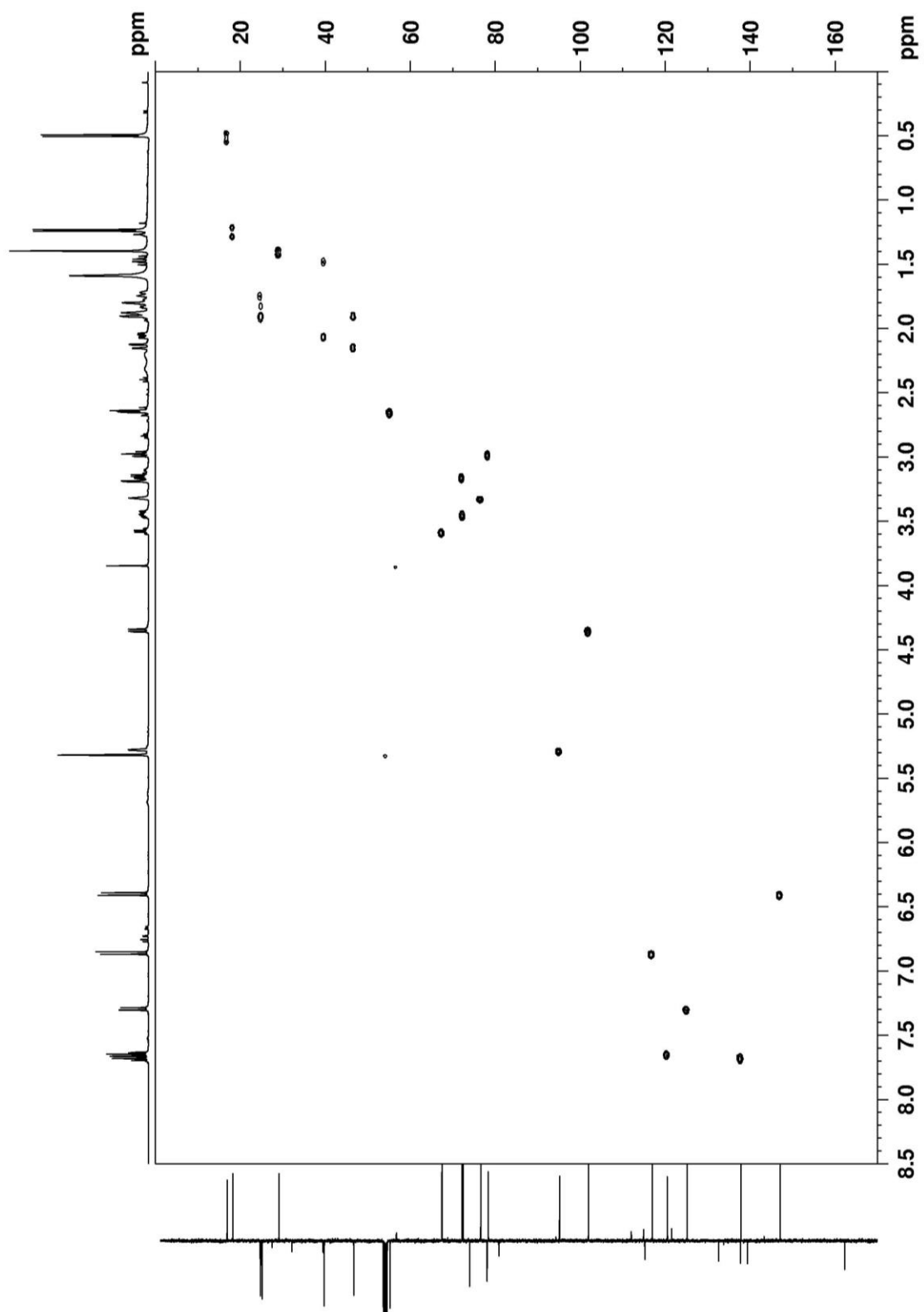


Abbildung 14-18:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

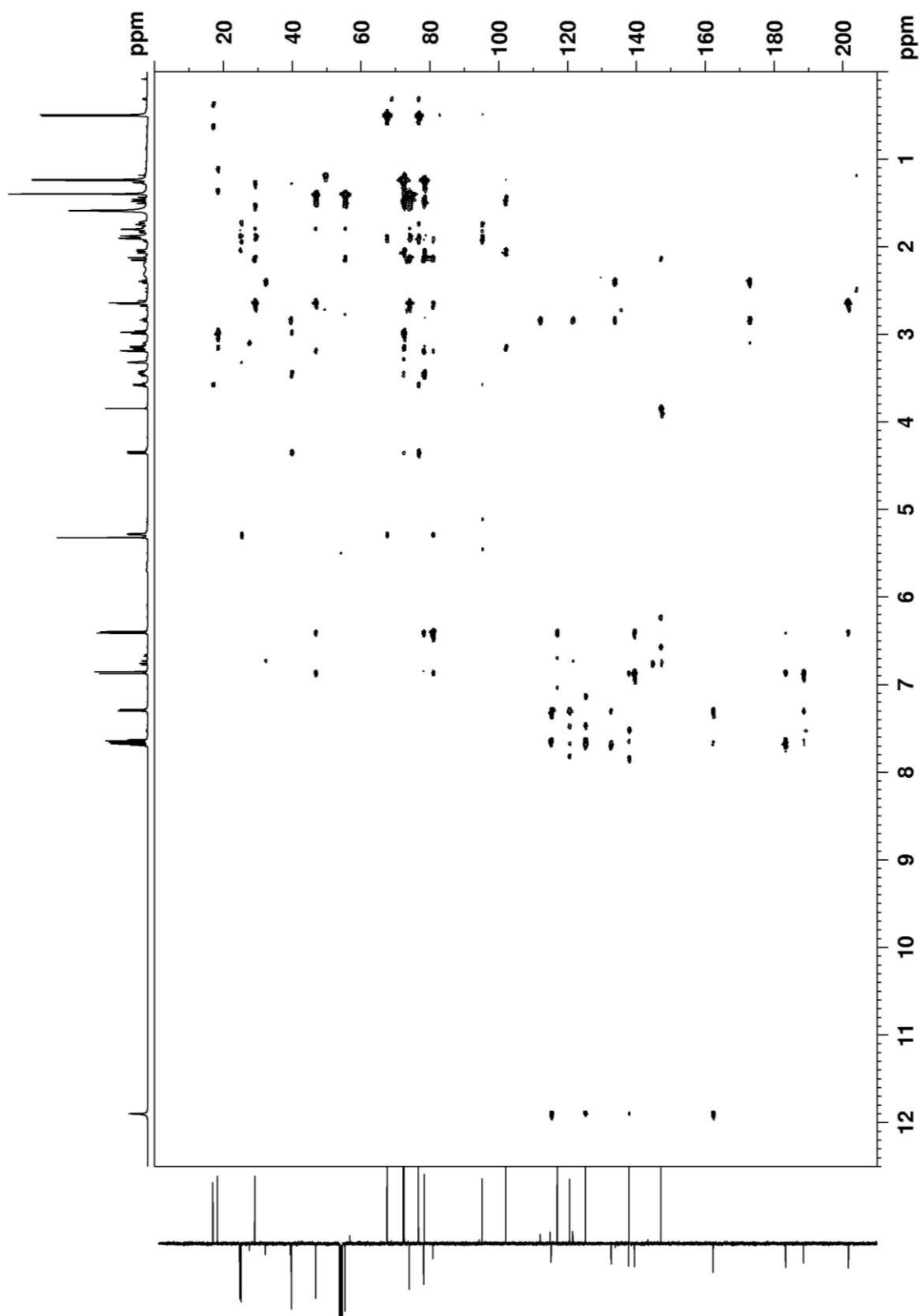


Abbildung 14-19:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

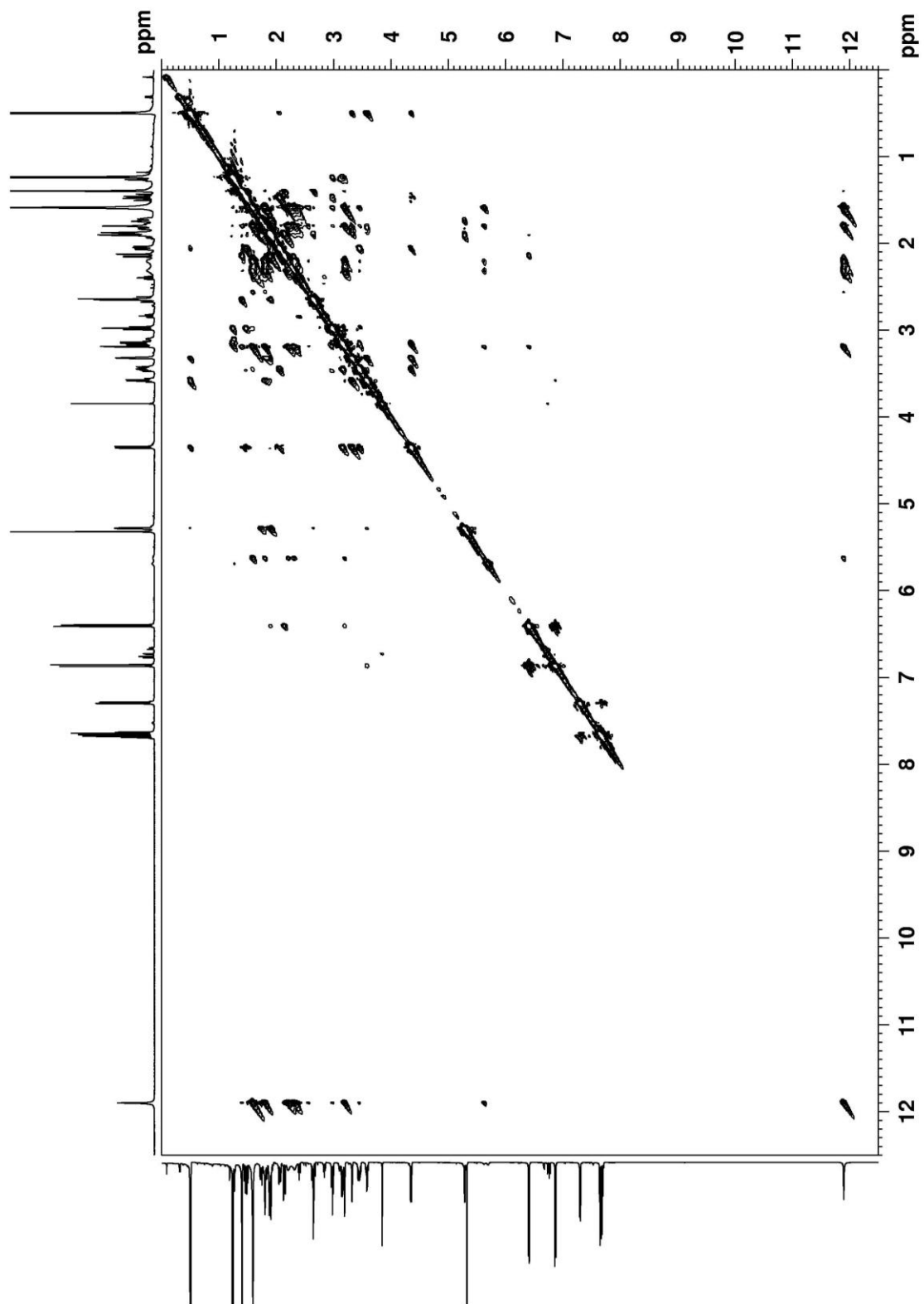


Abbildung 14-20:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A1 (1) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

### 14.3 Langkocyclin A2

**Tabelle 14-3:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und COSY Signale von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	HMBC	COSY
1	—	201.7	—	—
2 <sub>eq</sub>	2.66 (1H, dd, 11.9, 2.3)	54.9	1, 3, 4, 12b, 13	4 <sub>eq</sub>
2 <sub>ax</sub>	2.62 (1H, d, 11.9)	54.9	1, 3, 4, 12b, 13	13
3	—	73.8	—	—
3-OH	1.85 (1H, s)	—	2, 3, 13	—
4 <sub>eq</sub>	2.12 (1H, dd, 14.6, 2.3)	46.3	2, 3, 4a, 5, 12b, 13	2 <sub>eq</sub> , 4 <sub>ax</sub>
4 <sub>ax</sub>	1.89 (1H, Signalüberlagerung)	46.3	3, 13	4 <sub>eq</sub>
4a	—	77.9	—	—
4a-OH	3.19 (1H, s)	—	4, 4a, 12b	—
5	6.40 (1H, d, 9.8)	147.0	1, 4, 4a, 6, 12, 12a, 12b	6
6	6.86 (1H, d, 9.8)	116.8	4, 4a, 6a, 7, 12, 12a, 12b	5
6a	—	137.9	—	—
7	—	188.6	—	—
7a	—	114.9	—	—
8	—	162.2	—	—
8-OH	11.90 (1H, s)	—	7a, 8, 9, 10	—
9	7.29 (1H, dd, 8.2, 1.3)	125.0	7, 7a, 8, 11, 11a	10
10	7.68 (1H, pt, 7.6, 8.1)	137.8	7a, 8, 9, 11, 11a, 12	9, 11
11	7.63 (1H, dd, 7.6, 1.3)	120.4	7, 7a, 9, 12	10
11a	—	132.4	—	—
12	—	183.3	—	—
12a	—	139.3	—	—
12b	—	80.6	—	—
13	1.39 (3H, s)	28.8	2, 3, 4	2 <sub>ax</sub>
Zuckersignale				
A1	5.27 (1H, br, s)	94.8	12b, A3, A5	A2 <sub>eq</sub> , A2 <sub>ax</sub> , A4
A2 <sub>eq</sub>	1.89 (1H, m)	24.3	A1, A4	A1, A2 <sub>ax</sub>
A2 <sub>ax</sub>	1.72 (1H, m)	24.3	A1, A3, A4	A1, A2 <sub>eq</sub>



A3 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, m)	24.8	A4	A2 <sub>eq</sub>
A3 <sub>ax</sub>	1.82 (1H, m)	24.8	A2	A4
A4	3.32 (1H, br, s)	76.4	A3	A5
A5	3.56 (1H, q, 6.6)	67.3	A1, A4, A6	A4, A6
A6	0.49 (3H, d, 6.5)	16.6	A4, A5	A5
B1	4.32 (1H, dd, 9.9, 1.8)	101.9	A4, B2, B3, B5	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub>
B2 <sub>eq</sub>	2.04 (1H, ddd, 12.8, 5.2, 1.8)	37.4	B1, B3, B4	B1, B2 <sub>ax</sub> , B3
B2 <sub>ax</sub>	1.47 (1H, m)	37.4	B1, B3, B4	B1, B2 <sub>eq</sub> , B3
B3	3.36 (1H, m)	81.2	B2, B4, C1	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub> , B4
B4	2.96 (1H, pt, 8.7, 8.7)	76.1	B2, B3, B5, B6	B3, B4-OH, B5
B4-OH	4.24 (1H, s)	—	B3, B4, B5	B4
B5	3.14 (1H, m)	72.0	B1, B3, B4, B6	B4, B6
B6	1.24 (3H, d, 6.0)	18.3	B4, B5	B5
C1	4.84 (1H, br, s)	98.0	B3, C3, C5	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>eq</sub>	1.98 (1H, m)	25.4	C1, C3, C4, C5	C1, C2 <sub>ax</sub> , C3
C2 <sub>ax</sub>	1.46 (1H, m)	25.4	B3, C3, C4	C1, C3
C3	1.90 (2H, m)	24.9	C1, C2, C4, C5	C2 <sub>ax</sub> , C4
C4	3.49 (1H, br, s)	76.4	C2, D1	C3, C5
C5	4.02 (1H, q, 6.6)	67.9	C1, C4, C6	C4, C6
C6	1.11 (3H, d, 6.6)	17.1	C1, C4, C5	C5
D1	4.47 (1H, dd, 9.7, 1.9)	101.7	C4, D2, D3	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub>
D2 <sub>eq</sub>	2.20 (1H, ddd, 12.5, 5.0, 1.9)	39.5	D1, D3, D4	D1, D2 <sub>ax</sub> , D3
D2 <sub>ax</sub>	1.56 (1H, m)	39.5	D1, D3, D4	D1, D2 <sub>eq</sub> , D3
D3	3.52 (1H, m)	72.1	D2, D4, D5	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub> , D4
D4	3.02 (1H, pt, 8.9, 8.9)	78.1	D2, D3, D6	D3, D5
D4-OH	n.d	—	—	—
D5	3.21 (1H, m)	71.9	D1, D3, D6	D4, D6
D6	1.25 (3H, d, 6.0)	17.9	D1, D3, D4	D5

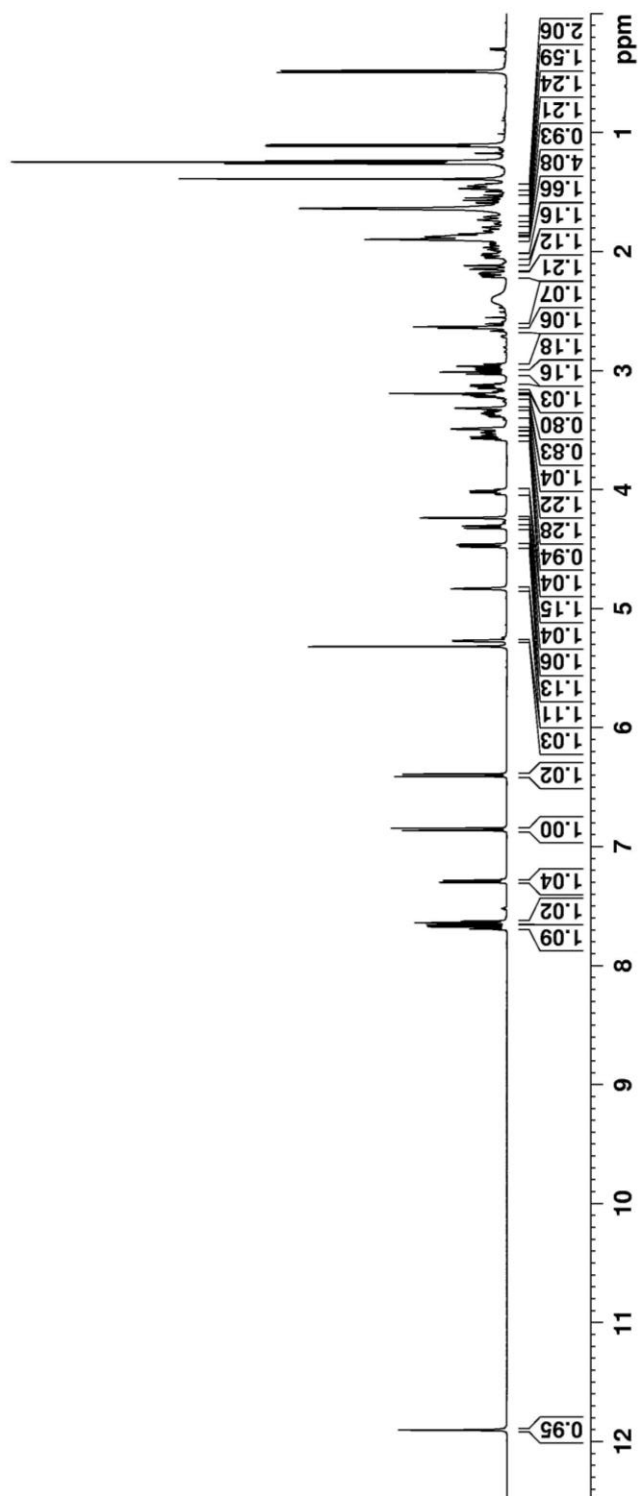


Abbildung 14-21:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Langkocyclin A2 (2) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

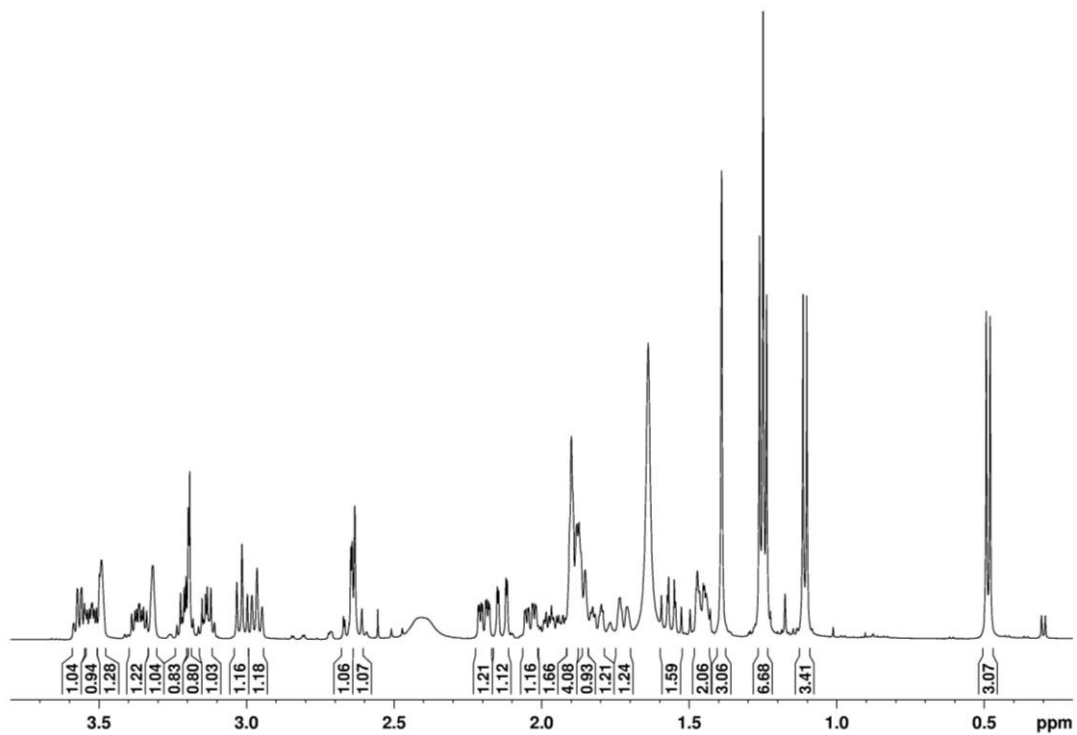


Abbildung 14-22: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (0.2 – 3.8 ppm) von Langkocyclin A2 (**2**) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.

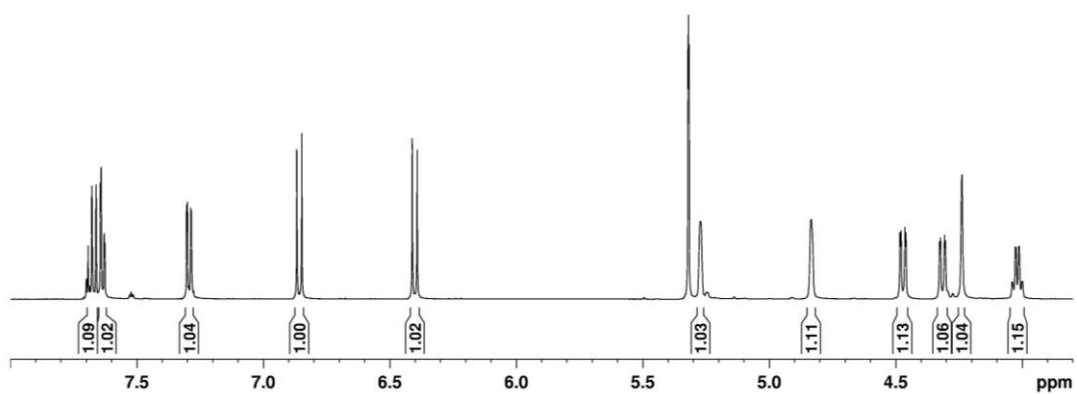
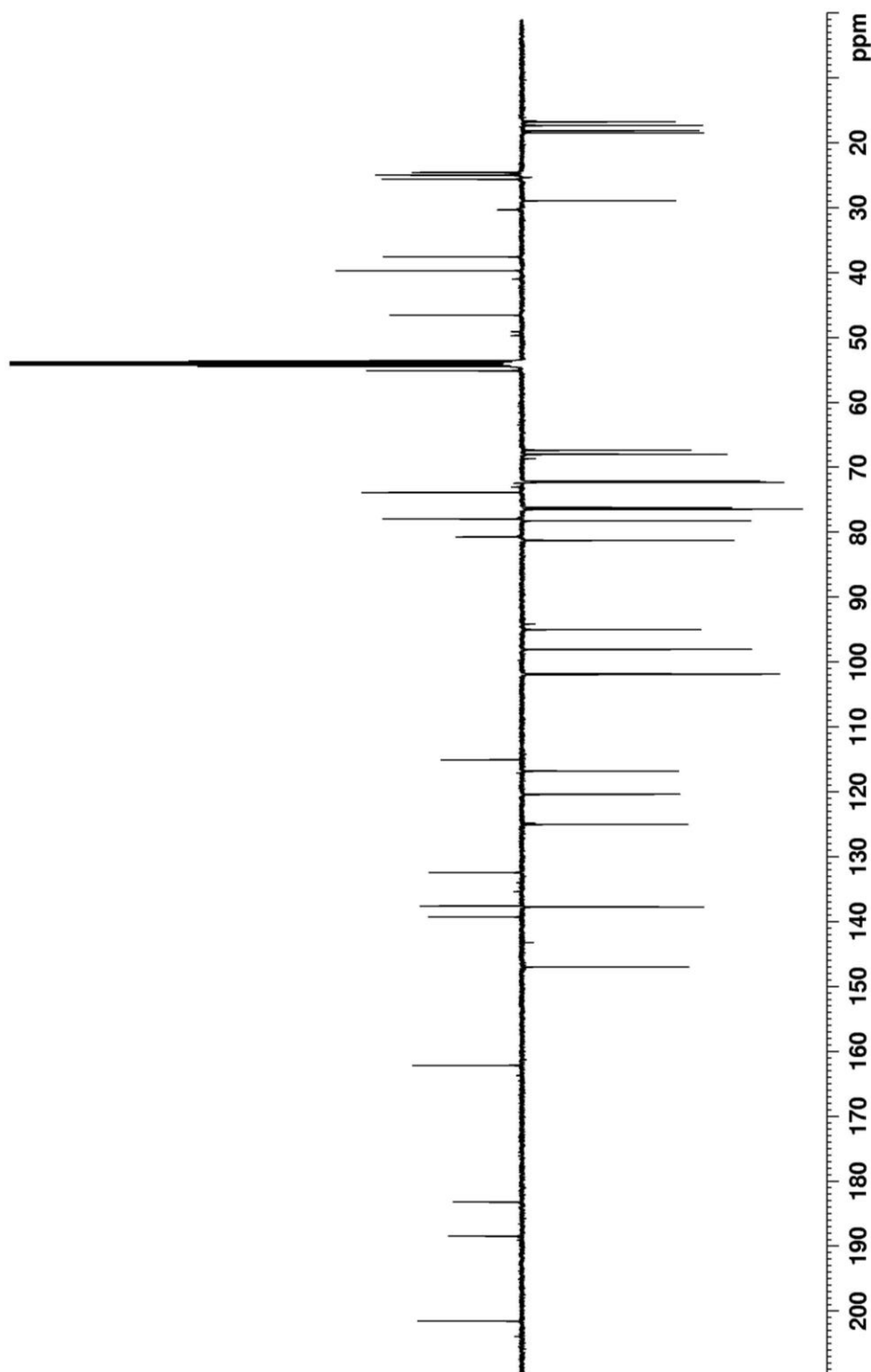


Abbildung 14-23: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (3.8 – 8.0 ppm) von Langkocyclin A2 (**2**) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.



**Abbildung 14-24:**  $^{13}\text{C}$ -APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

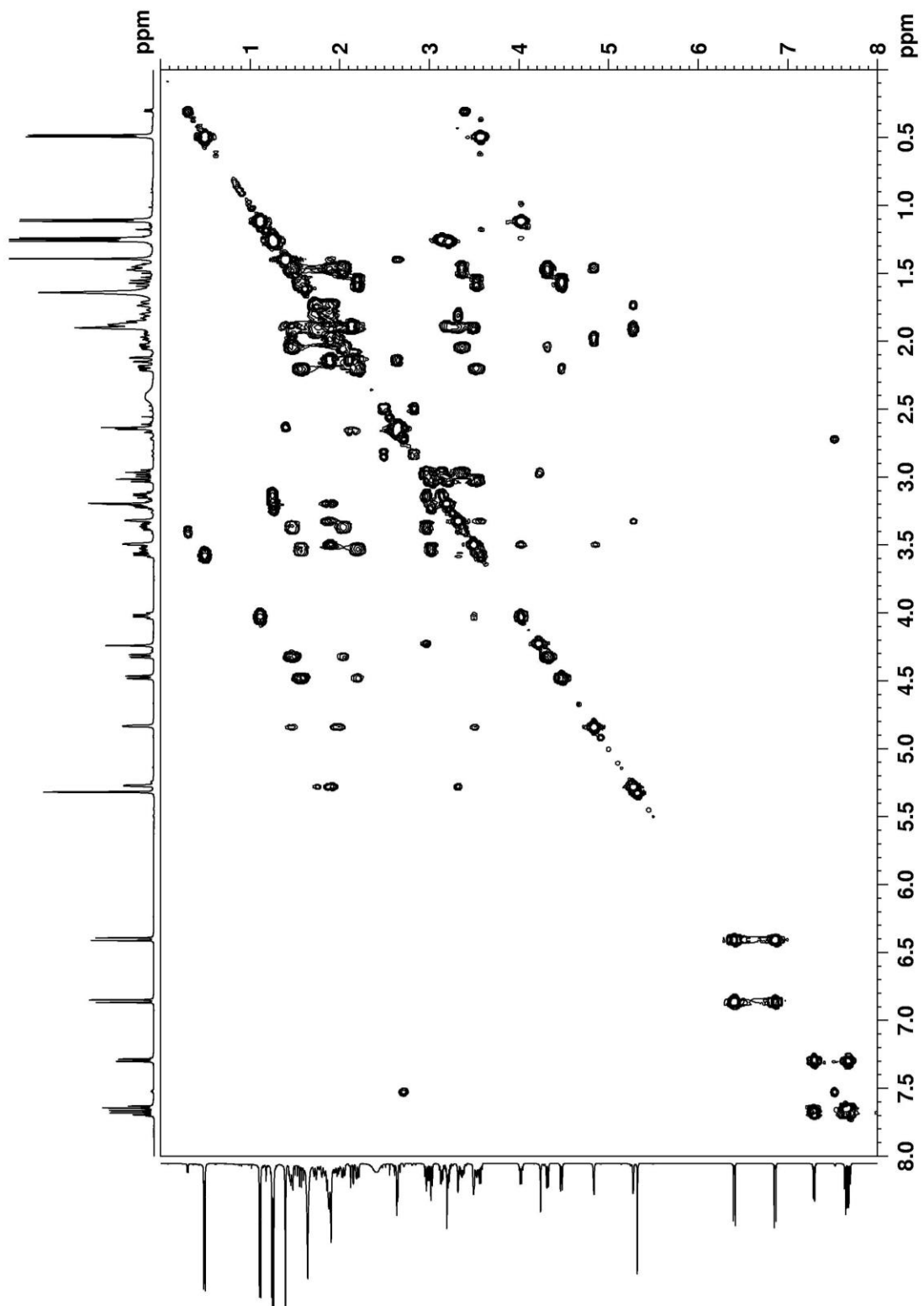


Abbildung 14-25:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

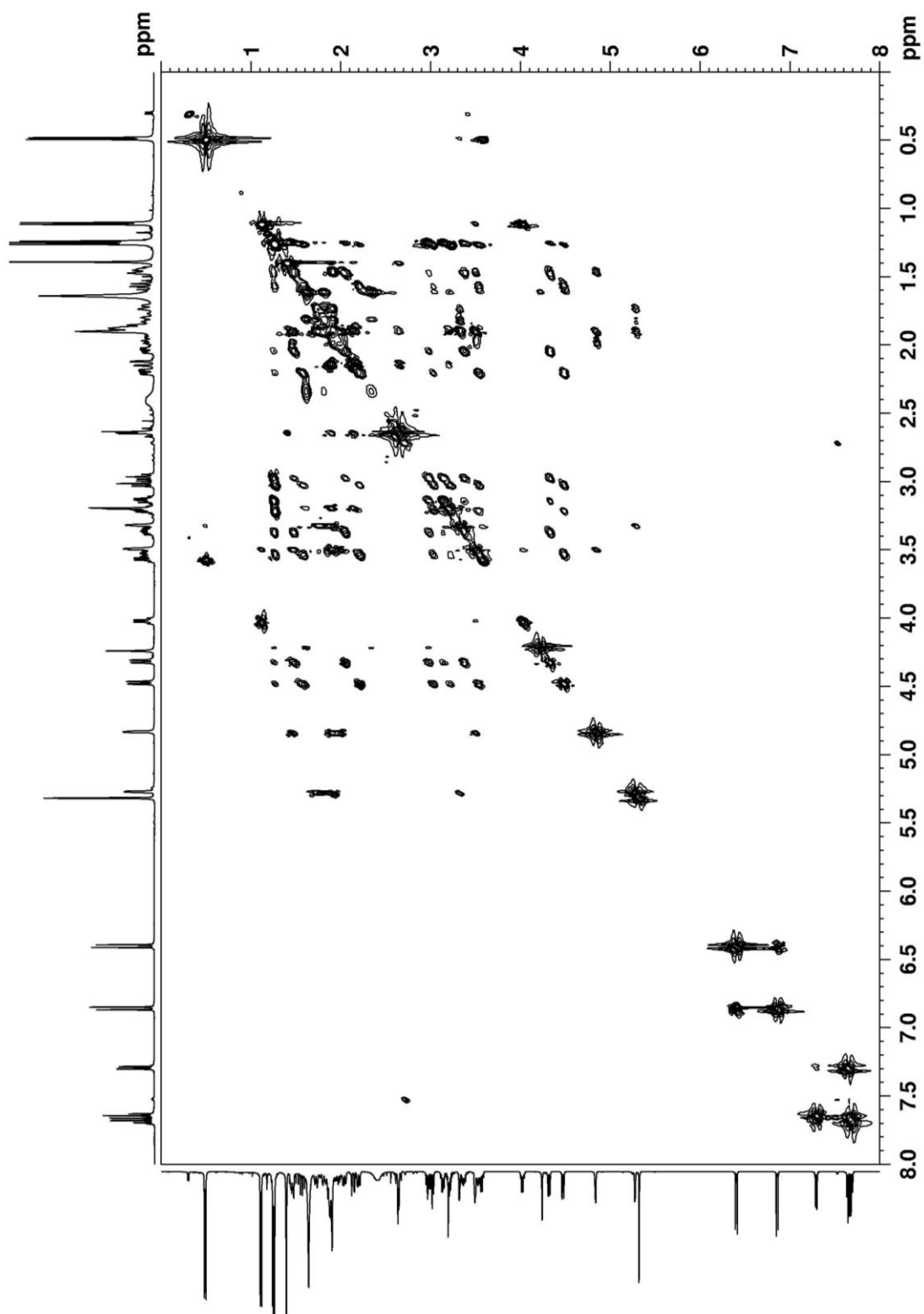


Abbildung 14-26:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

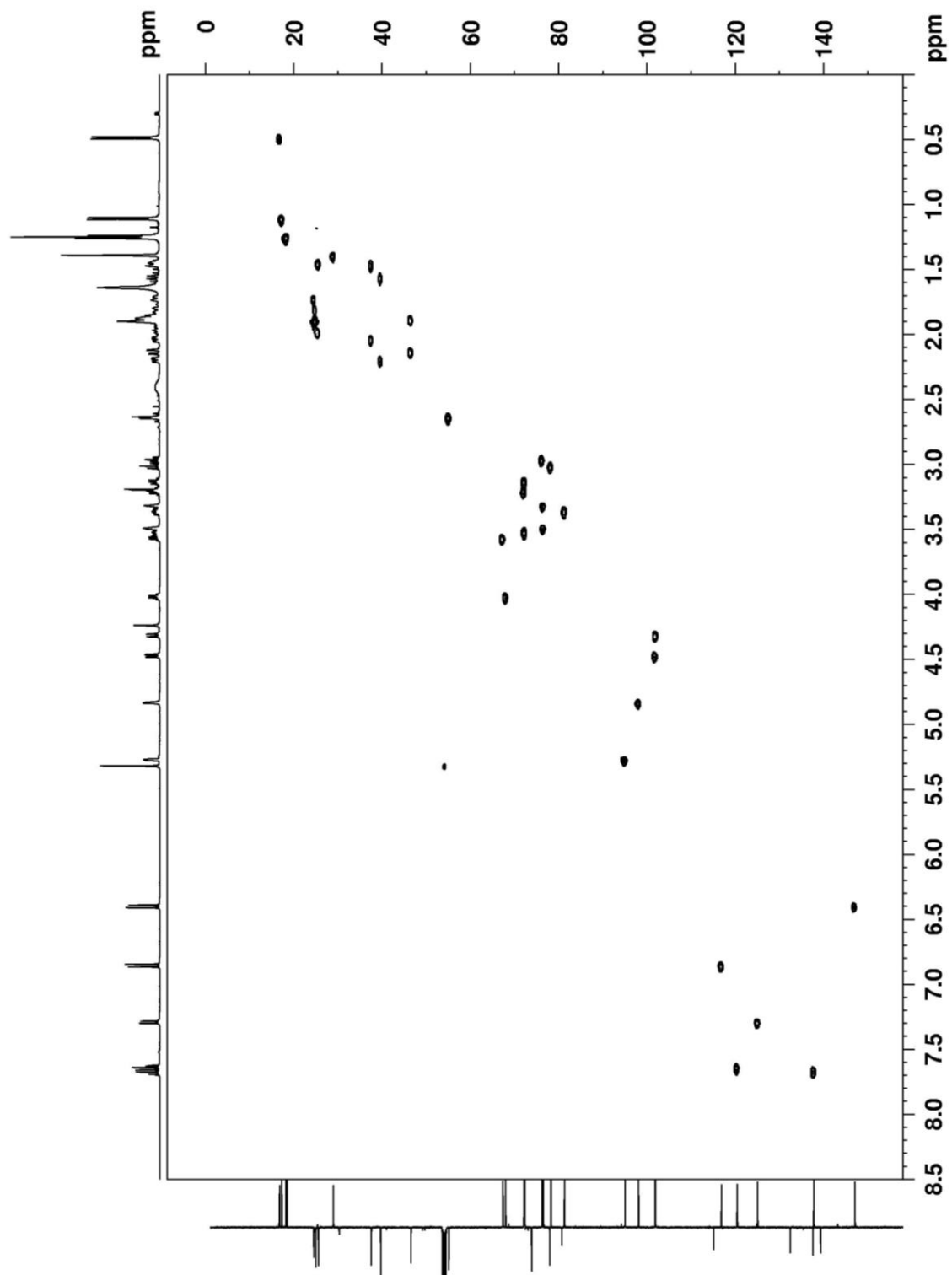


Abbildung 14-27:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

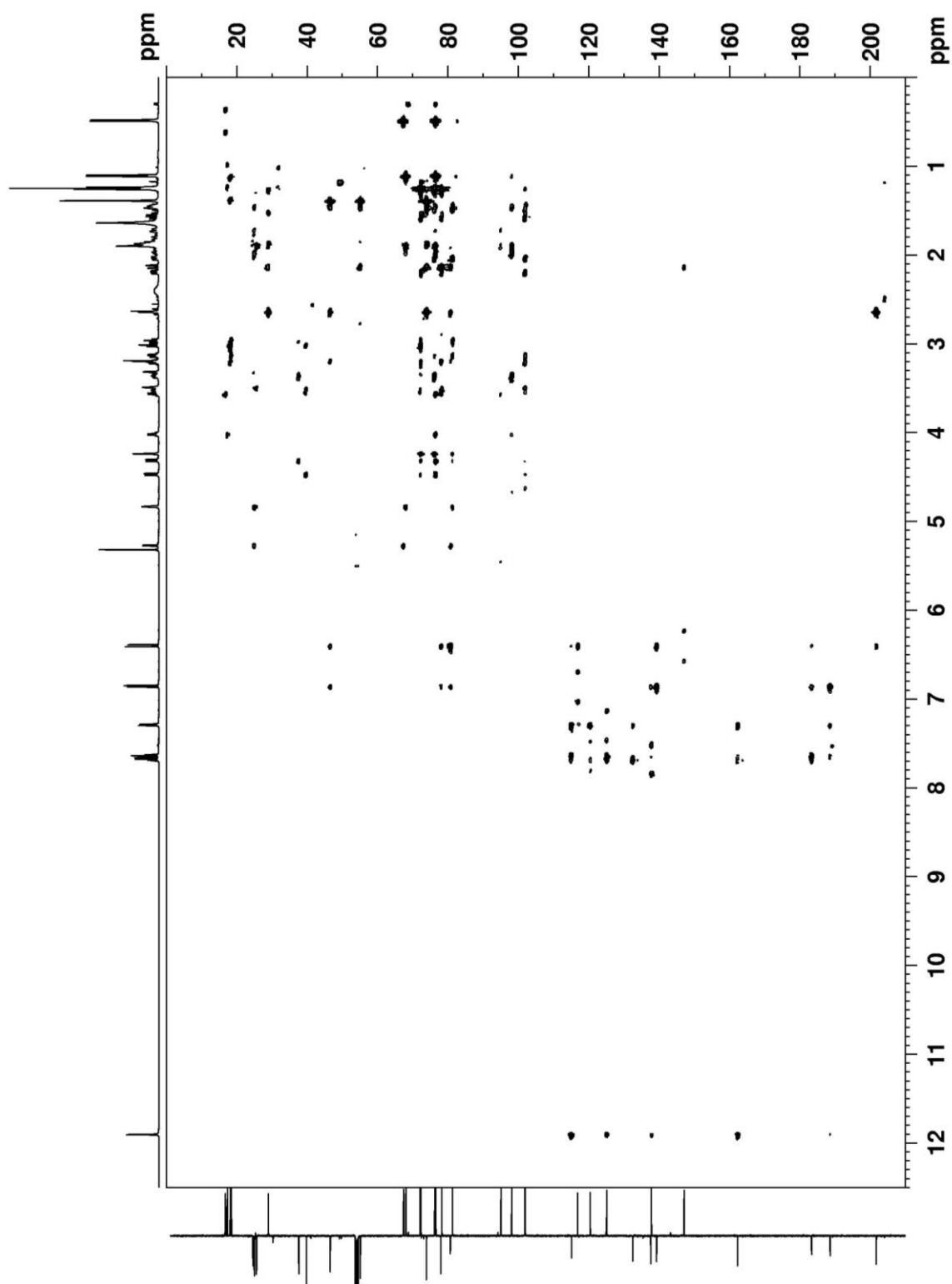


Abbildung 14-28:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .



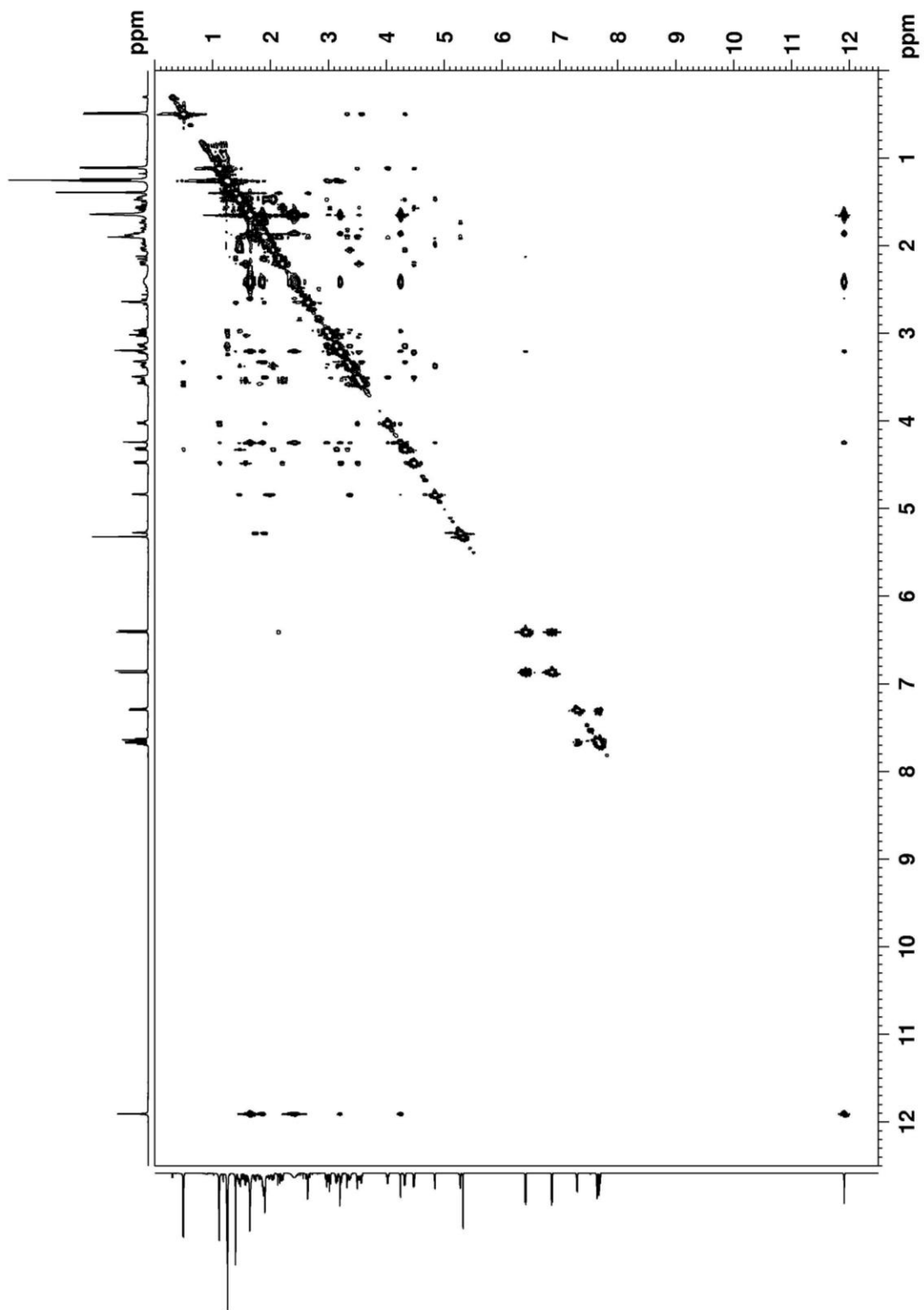


Abbildung 14-29:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A2 (**2**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

## 14.4 Langkocyclin A3

**Tabelle 14-4:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und COSY Signale von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	HMBC	COSY
1	—	201.7	—	—
2 <sub>eq</sub>	2.66 (1H, dd, 11.9, 2.3)	54.9	1, 3, 4, 12b, 13	4 <sub>eq</sub>
2 <sub>ax</sub>	2.62 (1H, d, 11.9)	54.9	1, 3, 4, 12b, 13	13
3	—	73.8	—	—
3-OH	1.76 (1H, s)	—	2, 3, 4, 13	—
4 <sub>eq</sub>	2.13 (1H, dd, 14.6, 2.3)	46.3	2, 3, 4a, 5, 12b, 13	2 <sub>eq</sub> , 4 <sub>ax</sub>
4 <sub>ax</sub>	1.89 (1H, Signalüberlagerung)	46.3	3, 13	4 <sub>eq</sub>
4a	—	77.9	—	—
4a-OH	3.18 (1H, s)	—	4, 4a, 12b	—
5	6.40 (1H, d, 9.8)	147.0	6, 6a, 12a, 12b	6
6	6.86 (1H, d, 9.8)	116.8	4a, 7, 12a	5
6a	—	137.9	—	—
7	—	188.6	—	—
7a	—	114.9	—	—
8	—	162.2	—	—
8-OH	11.90 (1H, s)	—	7a, 8, 9	—
9	7.29 (1H, dd, 8.2, 1.3)	125.0	7, 7a, 8, 11	10
10	7.68 (1H, pt, 7.6, 8.2)	137.8	8, 11a	9, 11
11	7.63 (1H, dd, 7.6, 1.3)	120.4	7a, 9, 12	10
11a	—	132.4	—	—
12	—	183.3	—	—
12a	—	139.3	—	—
12b	—	80.6	—	—
13	1.39 (3H, s)	28.8	2, 3, 4	2 <sub>ax</sub>
Zuckersignale				
A1	5.27 (1H, br. s)	94.8	12b, A3, A5	A2 <sub>eq</sub> , A2 <sub>ax</sub>
A2 <sub>eq</sub>	1.89 (1H, m)	24.3	A1, A3, A4, A5	A1, A2 <sub>ax</sub>
A2 <sub>ax</sub>	1.72 (1H, m)	24.3	A3, A5	A1, A2 <sub>eq</sub>
A3 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, m)	24.8	—	A3 <sub>ax</sub>
A3 <sub>ax</sub>	1.81 (1H, m)	24.8	—	A2 <sub>eq</sub> , A2 <sub>ax</sub> , A4
A4	3.32 (1H, br. s)	76.4	A2, B1	A5

A5	3.56 (1H, q, 6.6)	67.3	A1, A4, A6	A4, A6
A6	0.49 (3H, d, 6.5)	16.6	A4, A5	A5
B1	4.32 (1H, dd, 9.9, 1.8)	101.9	A4, B2	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub>
B2 <sub>eq</sub>	2.04 (1H, ddd, 12.8, 5.2, 1.8)	37.4	B1, B3, B4	B1, B2 <sub>ax</sub> , B3
B2 <sub>ax</sub>	1.47 (1H, m)	37.4	B1, B3	B1, B2 <sub>eq</sub> , B3
B3	3.36 (1H, m)	81.2	B4, C1	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub> , B4
B4	2.96 (1H, pt, 8.7, 8.7)	76.1	B3, B5, B6	B3, B4-OH, B5
B4-OH	4.21 (1H, s)	—	B3, B4, B5	B4
B5	3.14 (1H, m)	72.0	B1, B3, B4, B6	B4, B6
B6	1.25 (3H, d, 6.1)	18.2	B4, B5	B5
C1	4.84 (1H, br. s)	98.0	B3, C3, C5	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>eq</sub>	1.98 (1H, m)	25.4	—	C1, C2 <sub>ax</sub> , C3
C2 <sub>ax</sub>	1.46 (1H, m)	25.4	B3	C1, C2 <sub>eq</sub> , C3
C3	1.90 (2H, m)	24.9	C1, C2, C4	C2 <sub>ax</sub> , C4
C4	3.49 (1H, br. s)	76.4	C2, D1	C3, C5
C5	4.02 (1H, q, 6.6)	67.9	C1, C4, C6	C4, C6
C6	1.11 (3H, d, 6.6)	17.1	C4, C5	C5
D1	4.45 (1H, dd, 9.8, 1.8)	101.7	C4, D2, D5	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub>
D2 <sub>eq</sub>	2.21 (1H, ddd, 12.6, 5.2, 1.8)	37.4	D1, D3, D4	D1, D2 <sub>ax</sub> , D3
D2 <sub>ax</sub>	1.56 (1H, m)	37.4	D1, D3	D1, D2 <sub>eq</sub> , D3
D3	3.46 (1H, m)	81.1	D4, E1	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub> , D4
D4	3.03 (1H, pt, 8.6, 8.8)	76.1	D3, D5, D6	D3, D5
D4-OH	4.11 (1H, d, 1.6)	—	D3, D4, D5	—
D5	3.21 (1H, m)	71.9	D1, D3, D6	D4, D6
D6	1.28 (3H, d, 6.1)	18.2	D4, D5	D5
E1	4.91 (1H, br. s)	97.7	D3, E3, E5	E2 <sub>eq</sub> , E2 <sub>ax</sub>
E2 <sub>eq</sub>	2.00 (1H, m)	24.5	—	E1, E2 <sub>ax</sub> , E3
E2 <sub>ax</sub>	1.54 (1H, m)	24.5	E1, E5	E1, E2 <sub>eq</sub> , E3
E3	1.71 (2H, m)	26.1	E1, E5	E2 <sub>eq</sub> , E2 <sub>ax</sub>
E4	3.58 (1H, br. s)	67.7	E2	E3, E5
E5	4.10 (1H, q, 6.6)	68.1	E1, E4, E6	E4, E6
E6	1.16 (3H, d, 6.6)	17.2	E5	E5

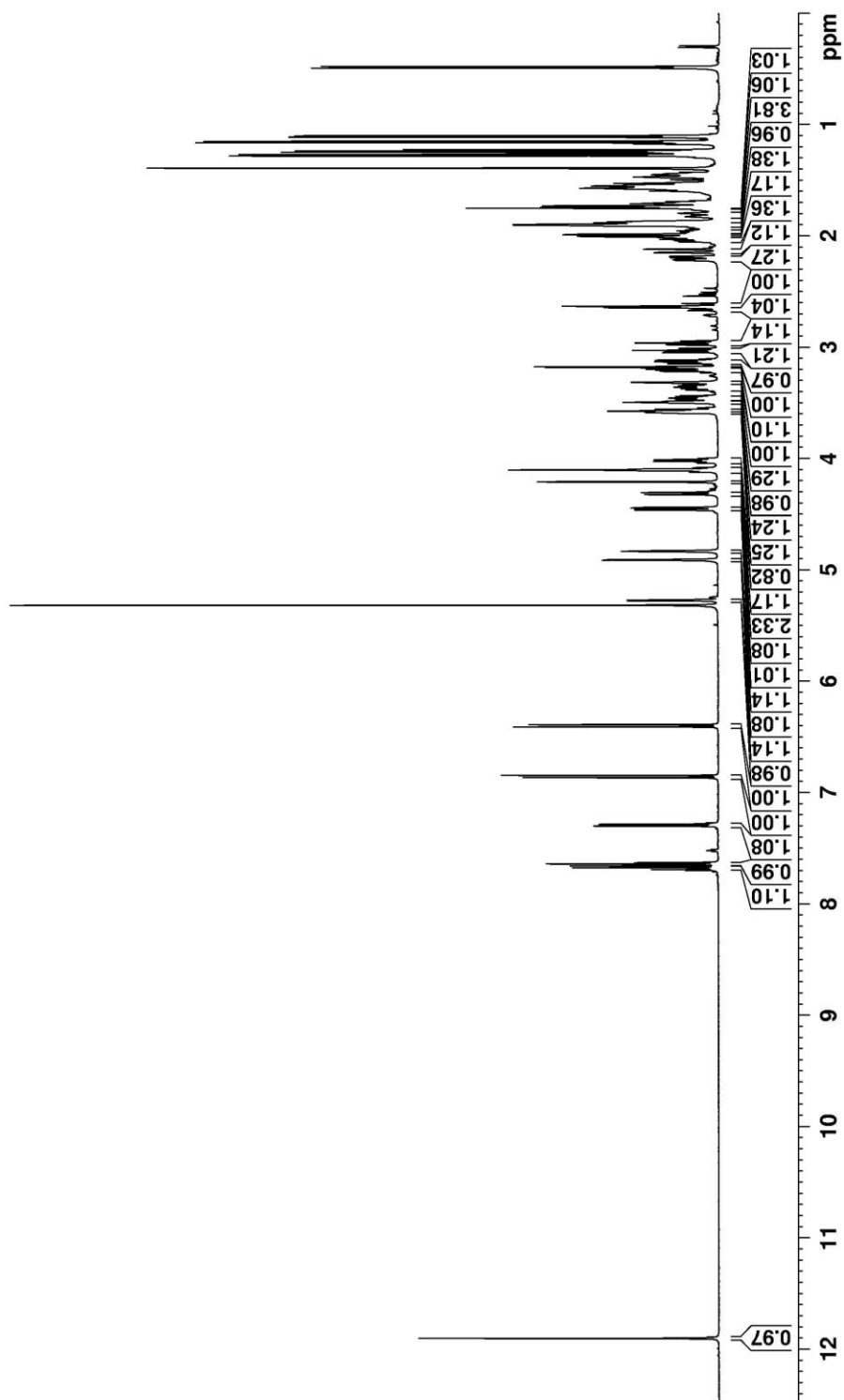


Abbildung 14-30:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Langkocyclin A3 (3) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

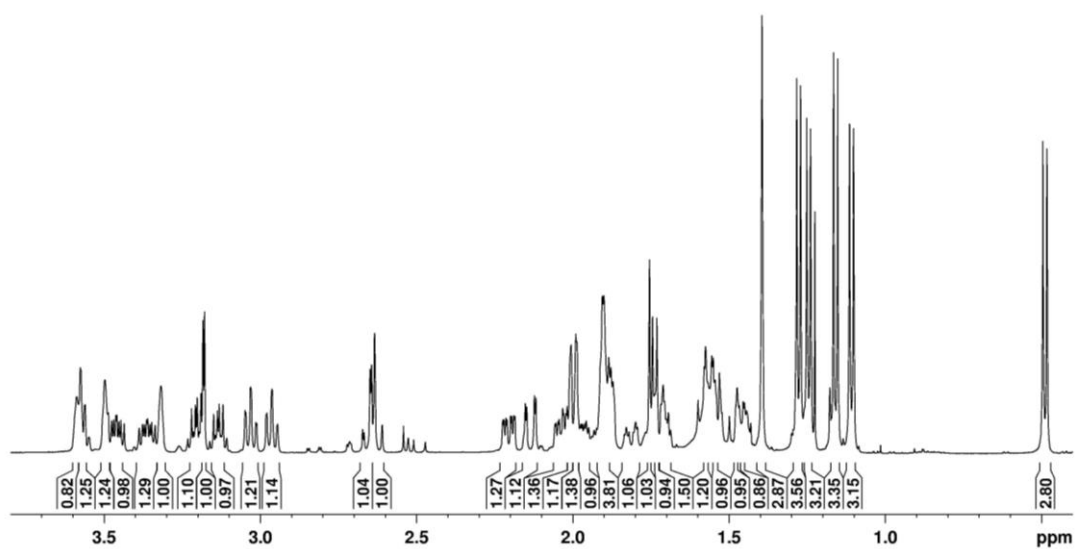


Abbildung 14-31: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (0.4 – 3.8 ppm) von Langkocyclin A3 (3) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.

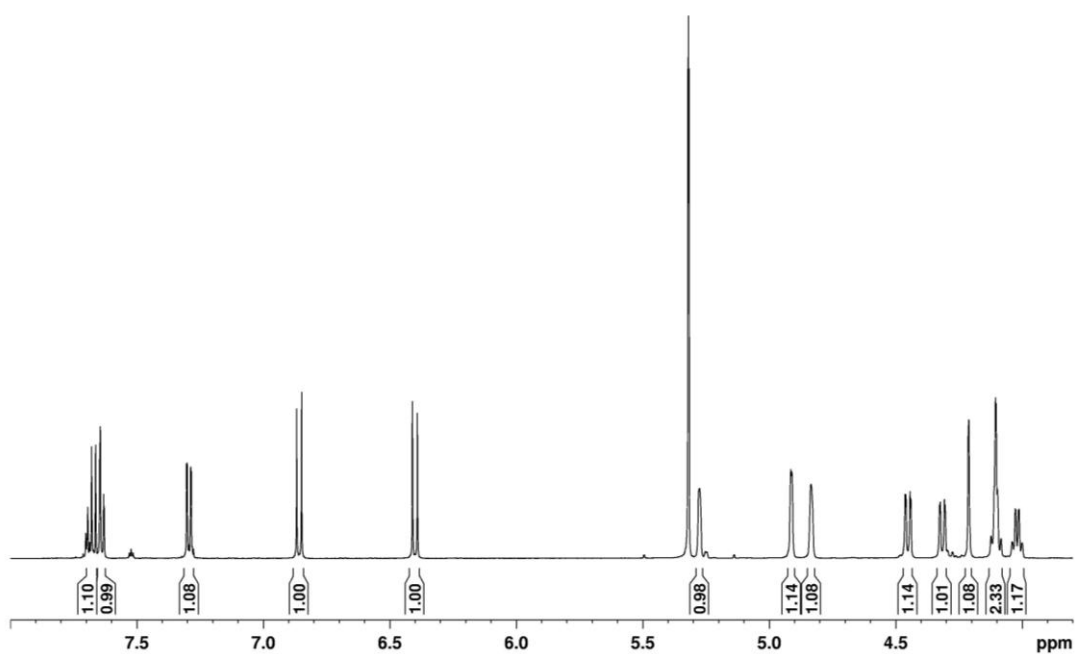
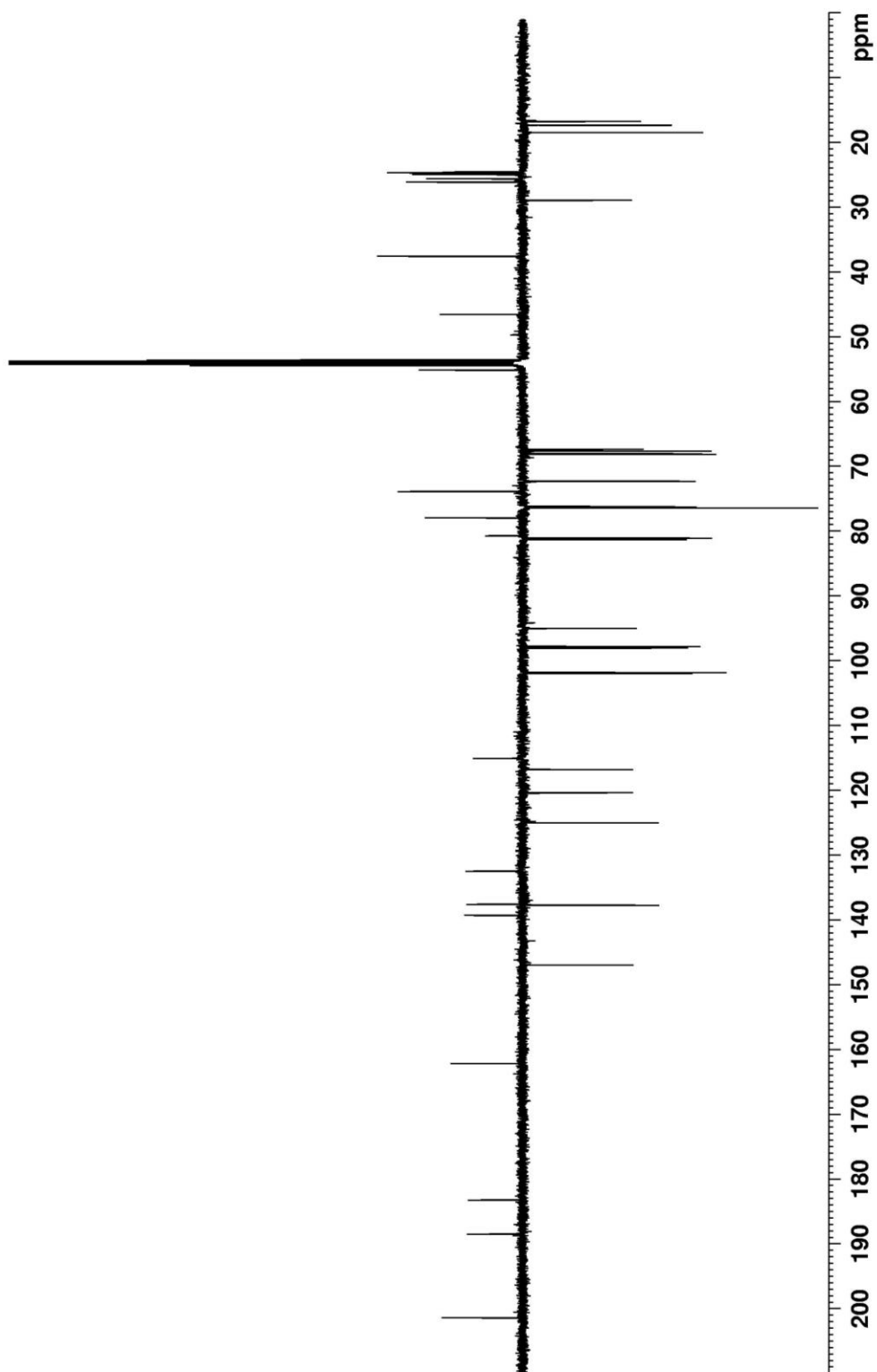


Abbildung 14-32: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (3.8 – 8.0 ppm) von Langkocyclin A3 (3) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.



**Abbildung 14-33:**  $^{13}\text{C}$ -APT-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

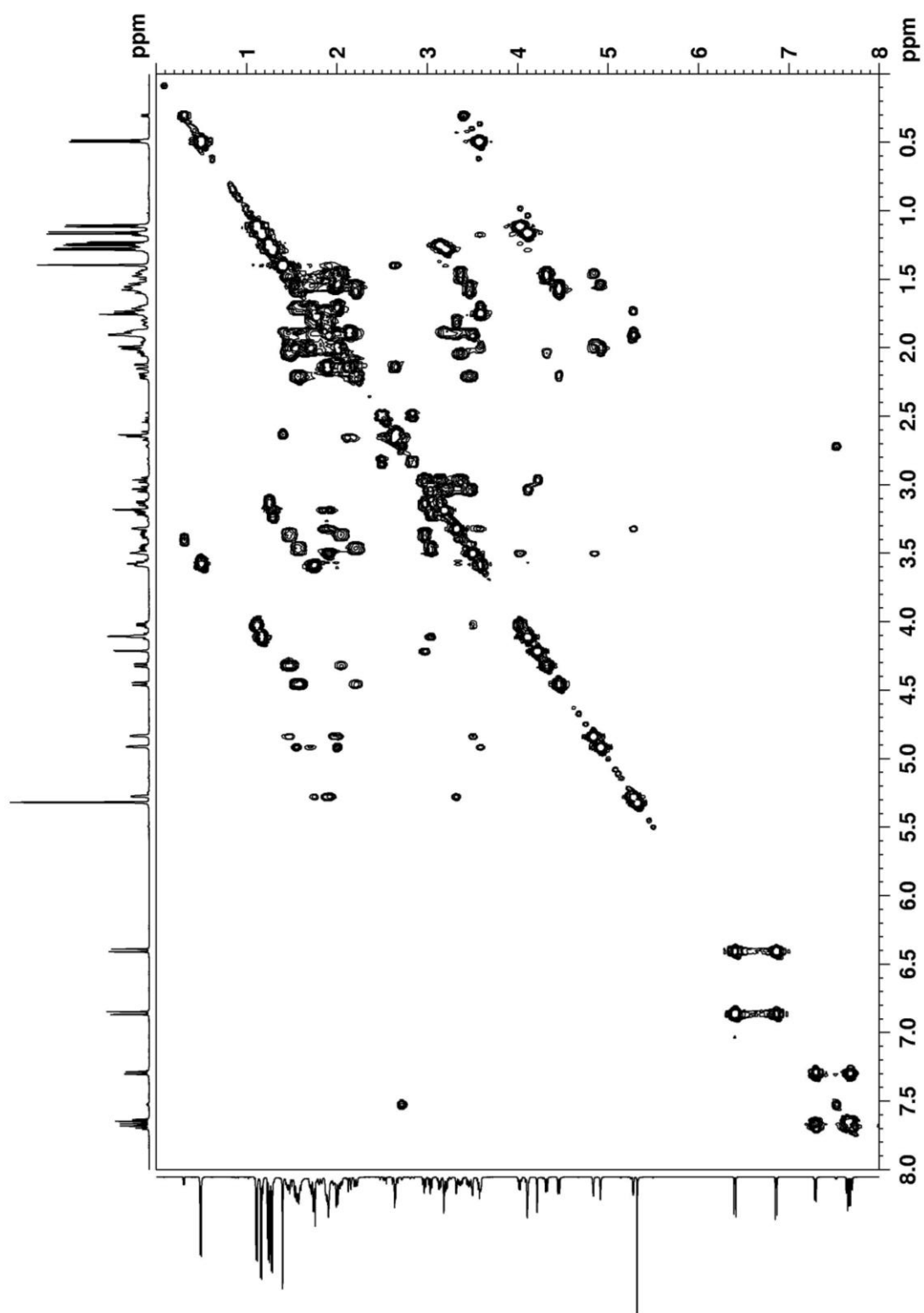


Abbildung 14-34:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

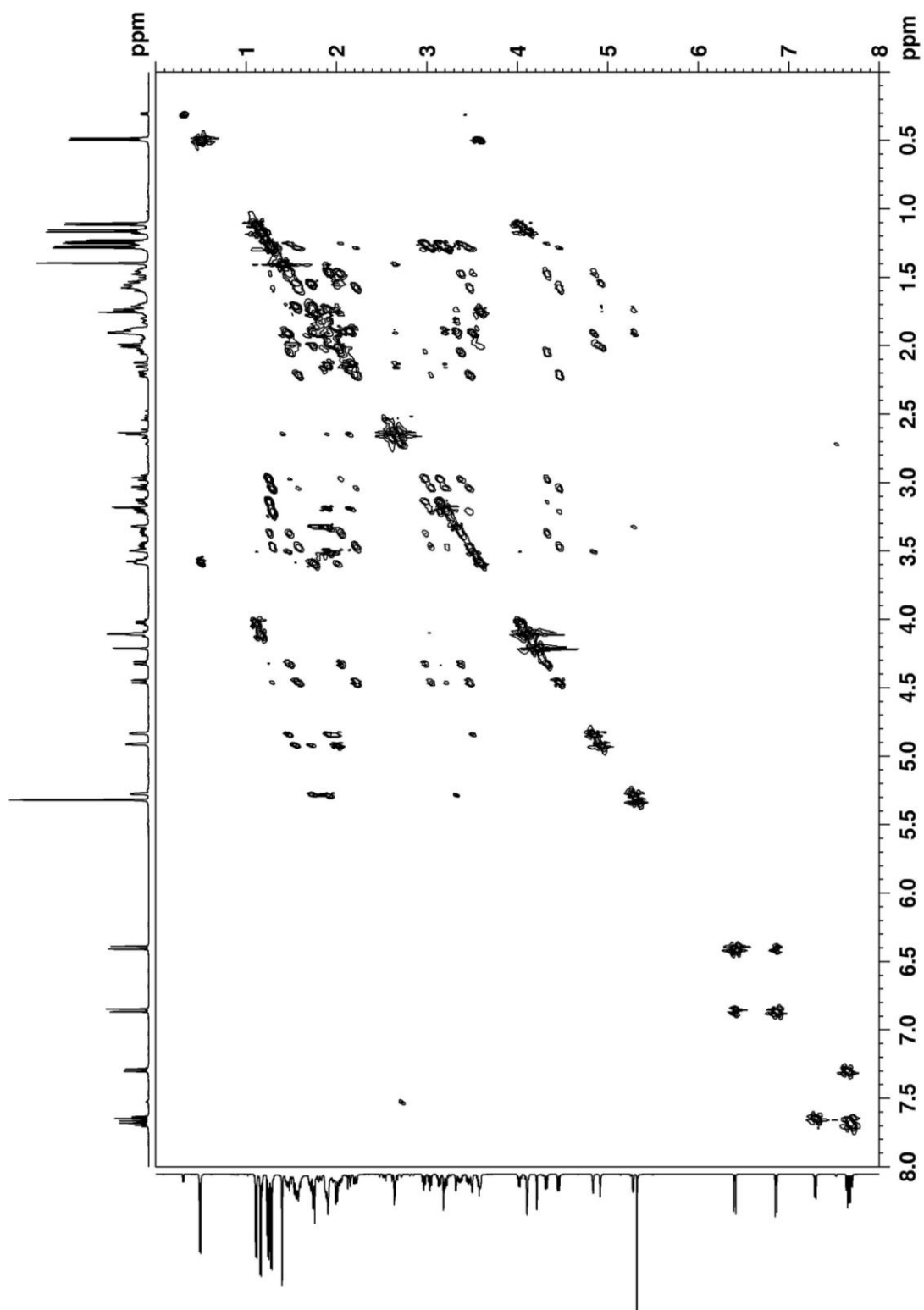


Abbildung 14-35:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .



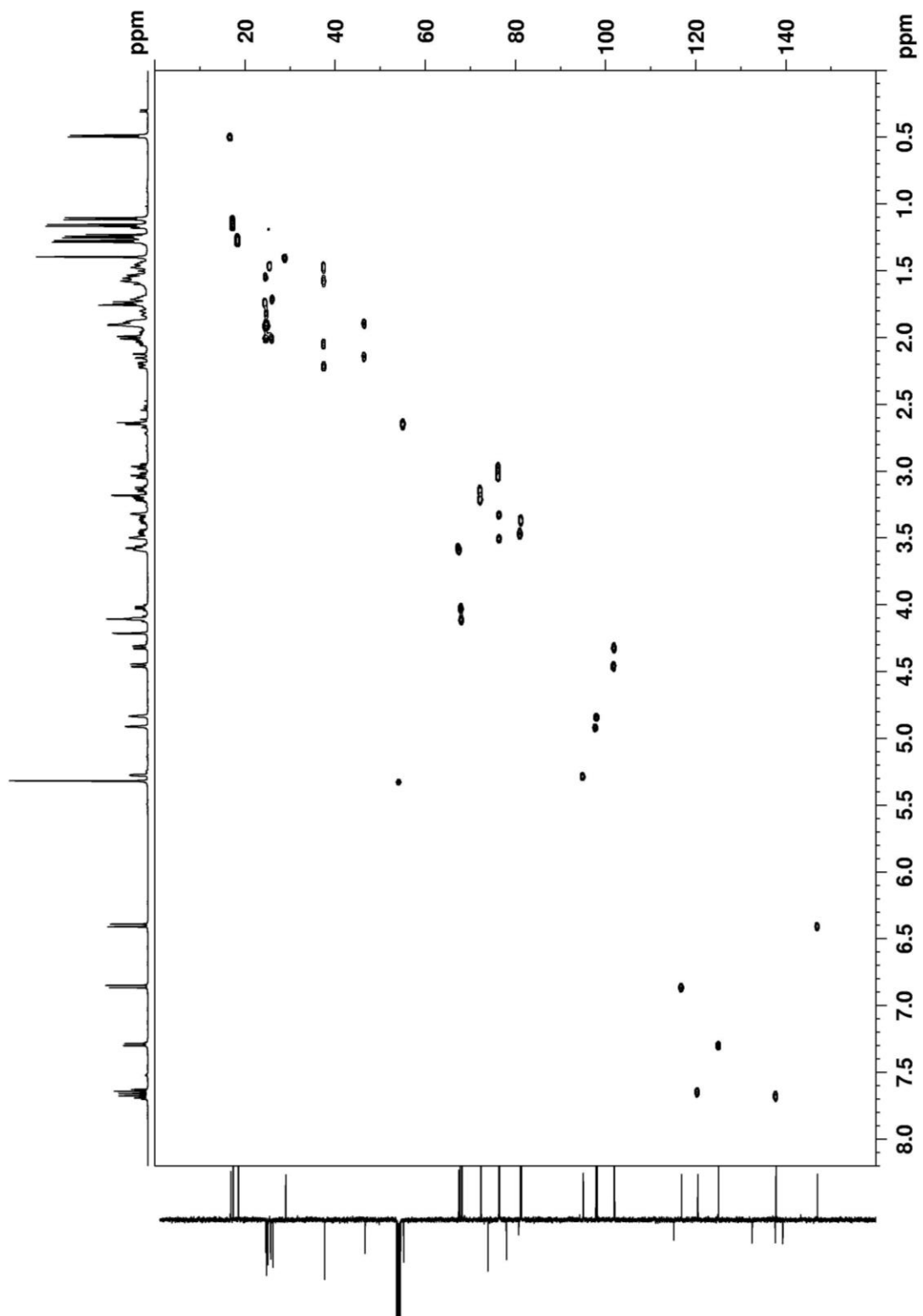


Abbildung 14-36:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

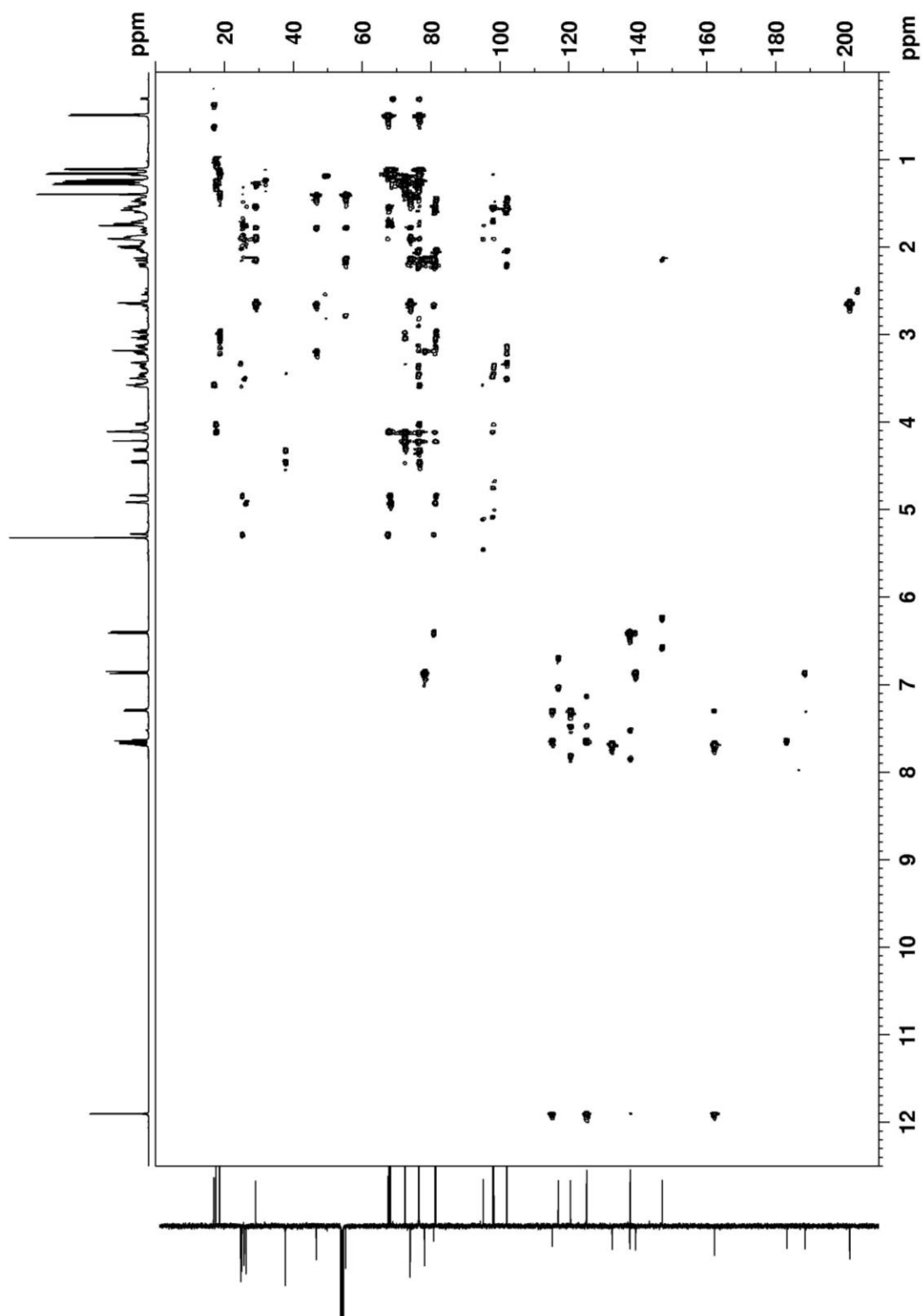


Abbildung 14-37:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ - $d_2$ .

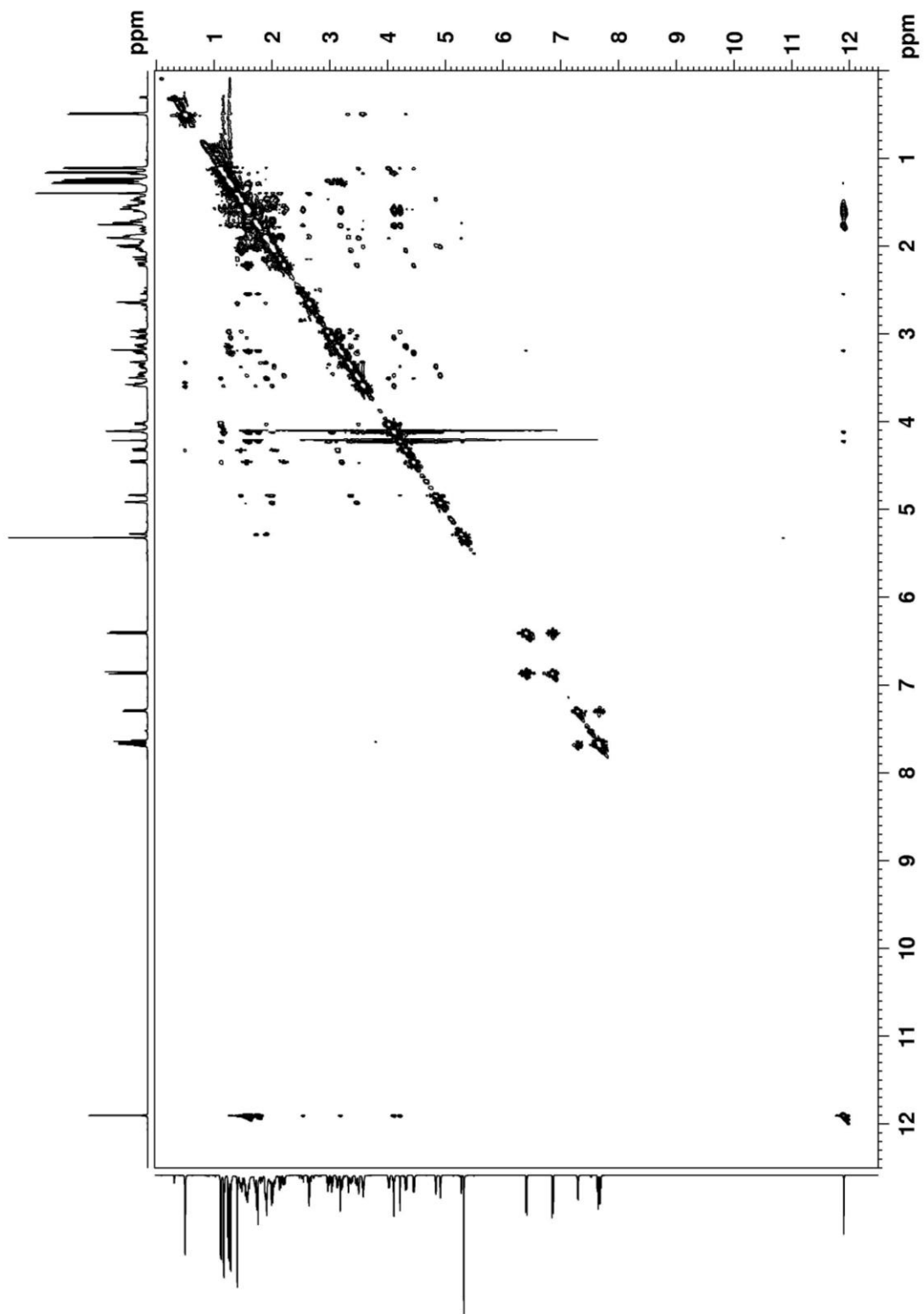


Abbildung 14-38:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Langkocyclin A3 (**3**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

## 14.5 Langkocyclin B1

**Tabelle 14-5:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und COSY Signale von Langkocyclin B1 (**4**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	HMBC	COSY
1	—	203.2	—	—
2 <sub>eq</sub>	2.97 (1H, d, 12.0)	54.8	1, 3, 13	2 <sub>ax</sub> , 13
2 <sub>ax</sub>	2.77 (1H, dd, 12.0, 2.8)	54.8	1, 3, 4, 12b	2 <sub>eq</sub>
3	—	73.0	—	—
3-OH	n.d.	—	—	—
4 <sub>eq</sub>	2.17 (1H, dd, 14.1, 2.8)	46.4	2, 3, 4a, 12b	4 <sub>ax</sub>
4 <sub>ax</sub>	2.02 (1H, Signalüberlagerung)	46.4	3, 13	4 <sub>eq</sub>
4a	—	77.9	—	—
4a-OH	3.19 (1H, Signalüberlagerung)	—	4	—
5	6.09 (1H, d, 9.9)	138.9	6a, 12b	6
6	7.03 (1H, d, 9.9)	118.6	4a, 6a, 7, 12a	5
6a	—	124.2	—	—
7	—	156.2	—	—
7-OH	13.14 (1H, s)	—	6a, 7, 7a	—
7a	—	112.9	—	—
8	—	188.9	—	—
9	6.74 (1H, d, 10.1)	132.1	7a, 11	10
10	7.89 (1H, d, 10.1)	140.2	8, 11, 11a, 3'	9
11	—	132.2	—	—
11a	—	116.6	—	—
12	—	142.7	—	—
12a	—	127.1	—	—
12b	—	82.5	—	—
13	1.46 (3H, s)	29.5	2, 3, 4	4 <sub>ax</sub>
2'	—	159.2	—	—
3'	—	127.1	—	—
4'	—	108.9	—	—
5'	7.82 (1H, d, 2.8)	131.2	4', 6'a, 10'a	6'
6'	9.02 (1H, s)	—	4', 10'a	5'
6'a	—	136.6	—	—
7'	7.53 (1H, d, 7.8, Überla-	112.4	9', 10'a	8'

	gerung mit 7.55)			
8'	7.30 (1H, pt, 7.5, 7.8)	124.0	6'a, 10'	7', 9'
9'	7.22 (1H, pt, 7.5, 7.6)	122.2	7', 10'a	8', 10'
10'	7.55 (1H, d, 7.6, Überlagerung mit 7.53)	120.6	4', 6'a, 8'	9'
10'a	—	127.5	—	—
Zuckersignale				
A1	5.42 (1H, br, s)	95.9	12b, A3, A5	A2 <sub>eq</sub>
A2 <sub>eq</sub>	1.89 (1H, m)	24.8	—	A1, A3 <sub>eq</sub>
A2 <sub>ax</sub>	1.71 (1H, m)	24.8	—	—
A3 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, m)	25.2	A2	A2 <sub>eq</sub>
A3 <sub>ax</sub>	1.82 (1H, m)	25.2	A1, A2, A4	A4
A4	3.32 (1H, br, s)	76.5	A3, B1	A3 <sub>eq</sub> , A3 <sub>ax</sub> , A5
A5	3.62 (1H, q, 6.5)	67.1	A4, A6	A4, A6
A6	0.45 (3H, d, 6.5)	16.8	A4, A5	A5
B1	4.32 (1H, dd, 9.9, 1.8)	101.9	A4, B2	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub>
B2 <sub>eq</sub>	2.00 (Signalüberlagerung)	37.6	B3, B4	B2 <sub>ax</sub> , B3
B2 <sub>ax</sub>	1.44 (1H, Signalüberlagerung)	37.6	B1, B3	B1, B2 <sub>eq</sub> , B3
B3	3.37 (1H, m)	81.3	—	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub> , B4
B4	2.96 (1H, Signalüberlagerung mit 2 <sub>eq</sub> )	76.3	B3, B5	B3, B4-OH, B5
B4-OH	4.17 (1H, s)	—	B5	B4
B5	3.13 (1H, m)	72.3	B1	B4, B6
B6	1.25 (3H, d, 6.1)	18.0	B4, B5	B5
C1	4.83 (1H, br, s)	98.0	B3, C3, C5	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, Signalüberlagerung)	25.7	C3	C1, C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>ax</sub>	1.45 (1H, Signalüberlagerung)	25.7	C3	—
C3	1.89 (2H, m)	25.0	—	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub> , C4
C4	3.48 (1H, br, s)	76.5	C2, D1	C3, C5
C5	4.01 (1H, q, 6.6)	68.1	C4, C6	C4, C6
C6	1.11 (3H, d, 6.6)	17.3	C4, C5	C5

---

D1	4.47 (1H, dd, 9.7, 2.0)	101.9	C4, D2	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub>
D2 <sub>eq</sub>	2.20 (1H, ddd, 12.6, 5.1, 1.8)	39.4	—	D1, D2 <sub>ax</sub> , D3
D2 <sub>ax</sub>	1.56 (1H, Signalüberlagerung)	39.4	D1, D3	D1, D2 <sub>eq</sub> , D3
D3	3.53 (1H, m)	72.0	—	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub> , D4
D4	3.02 (1H, pt, 8.9, 8.9)	78.0	D3, D5, D6	D3, D5
D4-OH	n.d.	—	—	—
D5	3.21 (1H, Signalüberlagerung)	72.4	—	D4, D6
D6	1.26 (3H, d, 6.2)	18.0	D4, D5	D5

---

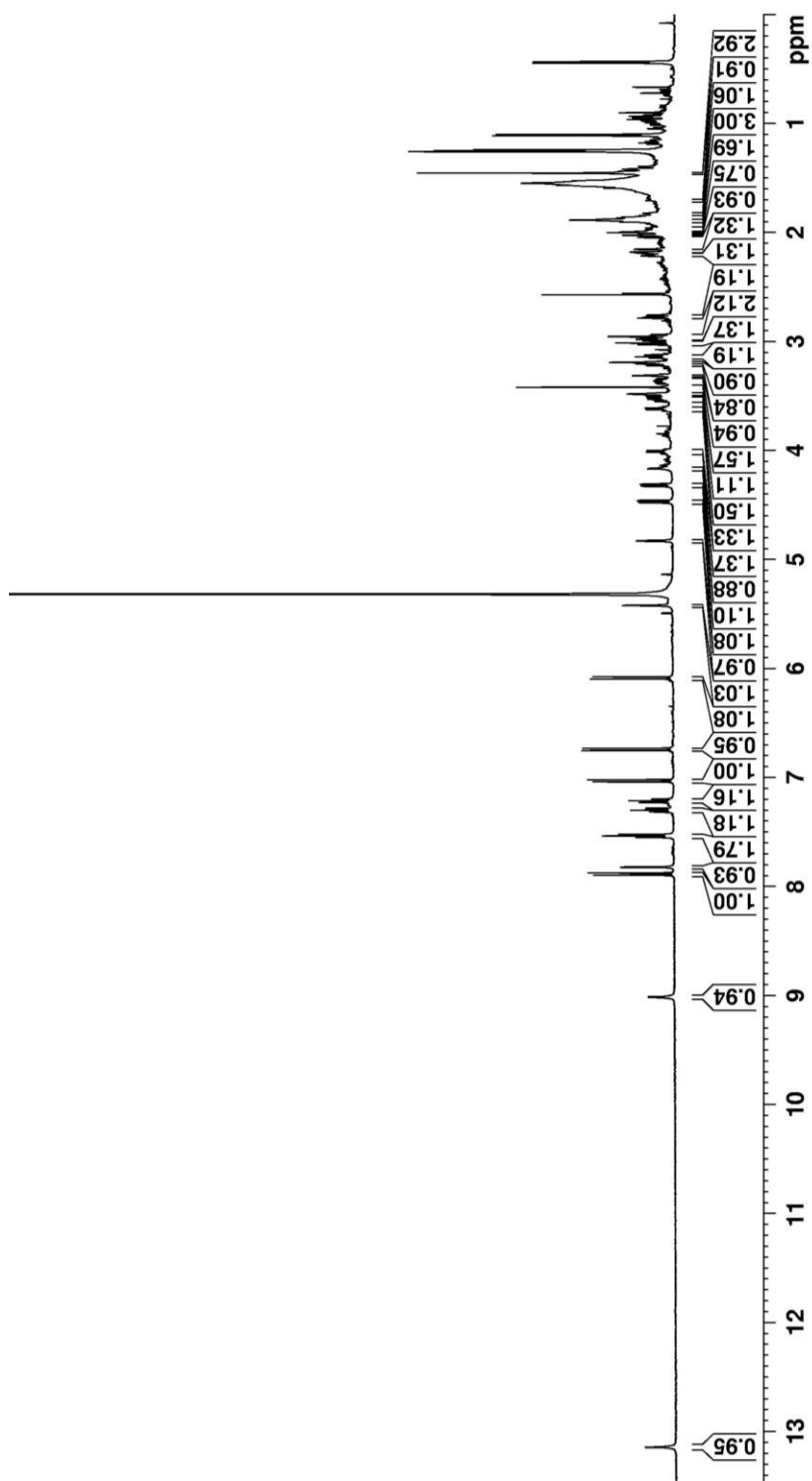


Abbildung 14-39:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Langkocyclin B1 (4) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

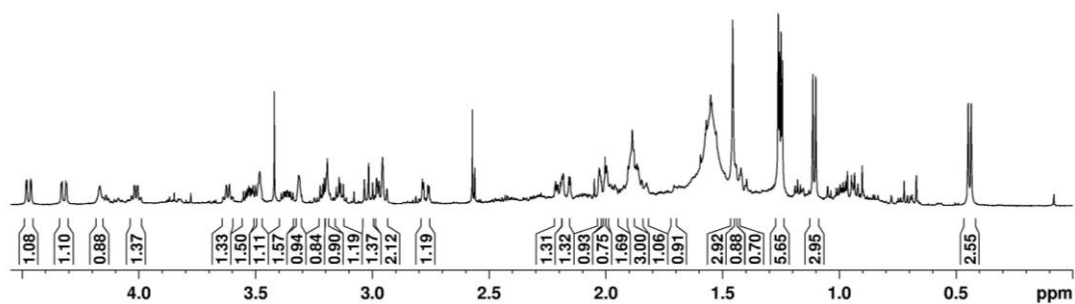


Abbildung 14-40:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (0.0 – 4.5 ppm) von Langkocyclin B1 (4) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

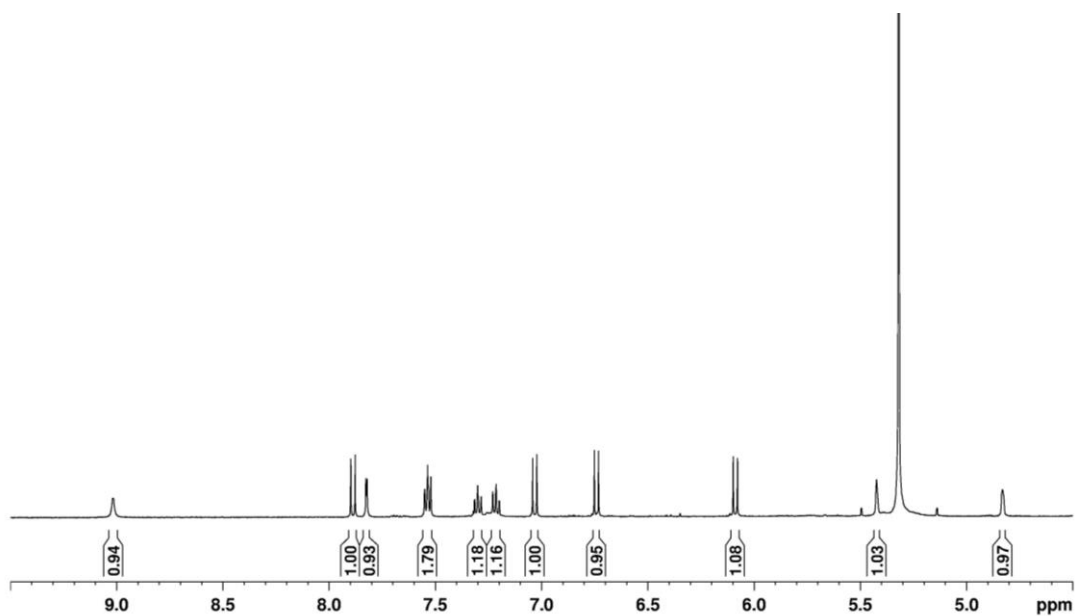
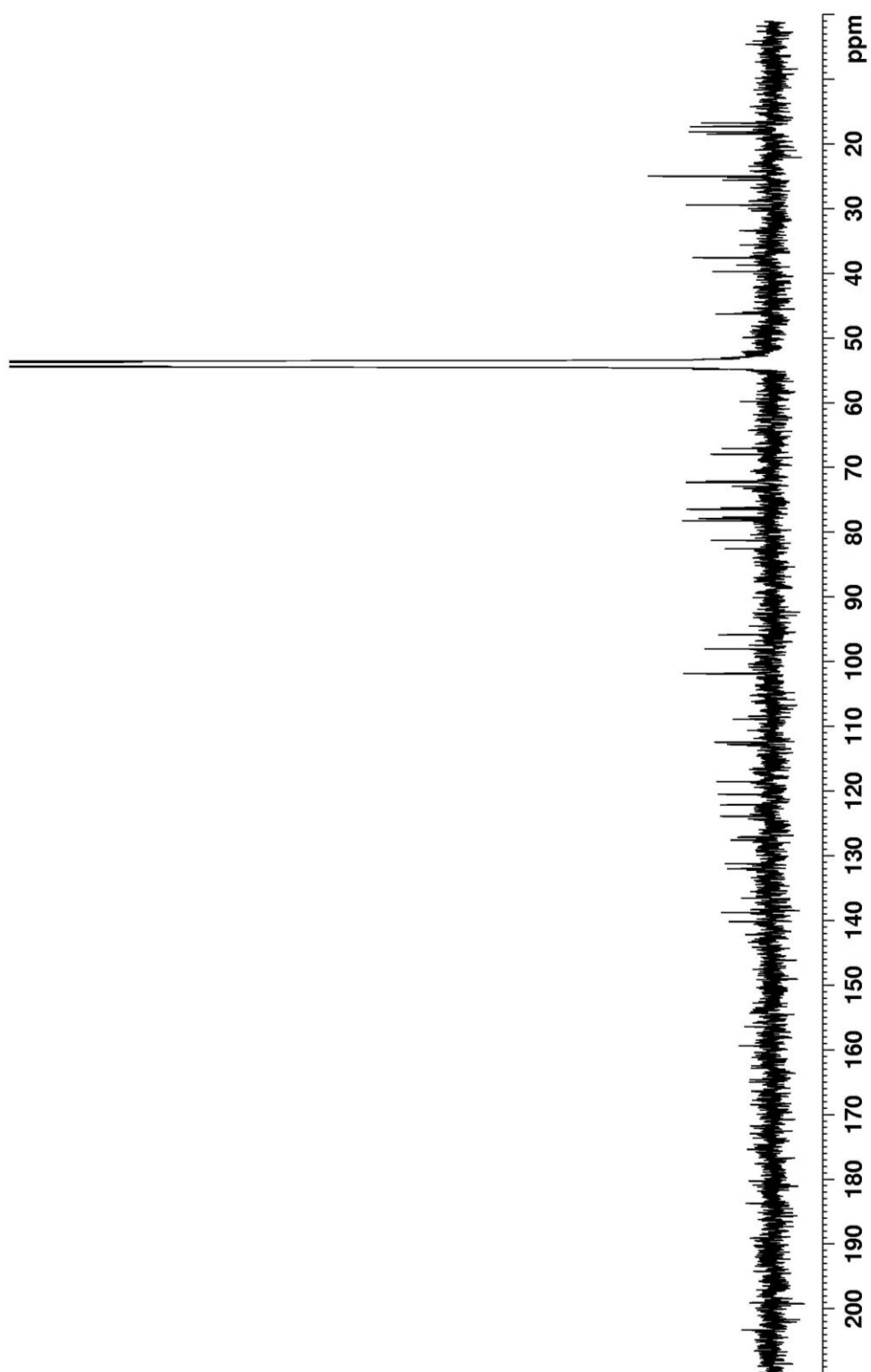


Abbildung 14-41:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (4.5 – 9.5 ppm) von Langkocyclin B1 (4) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .





**Abbildung 14-42:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (4) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

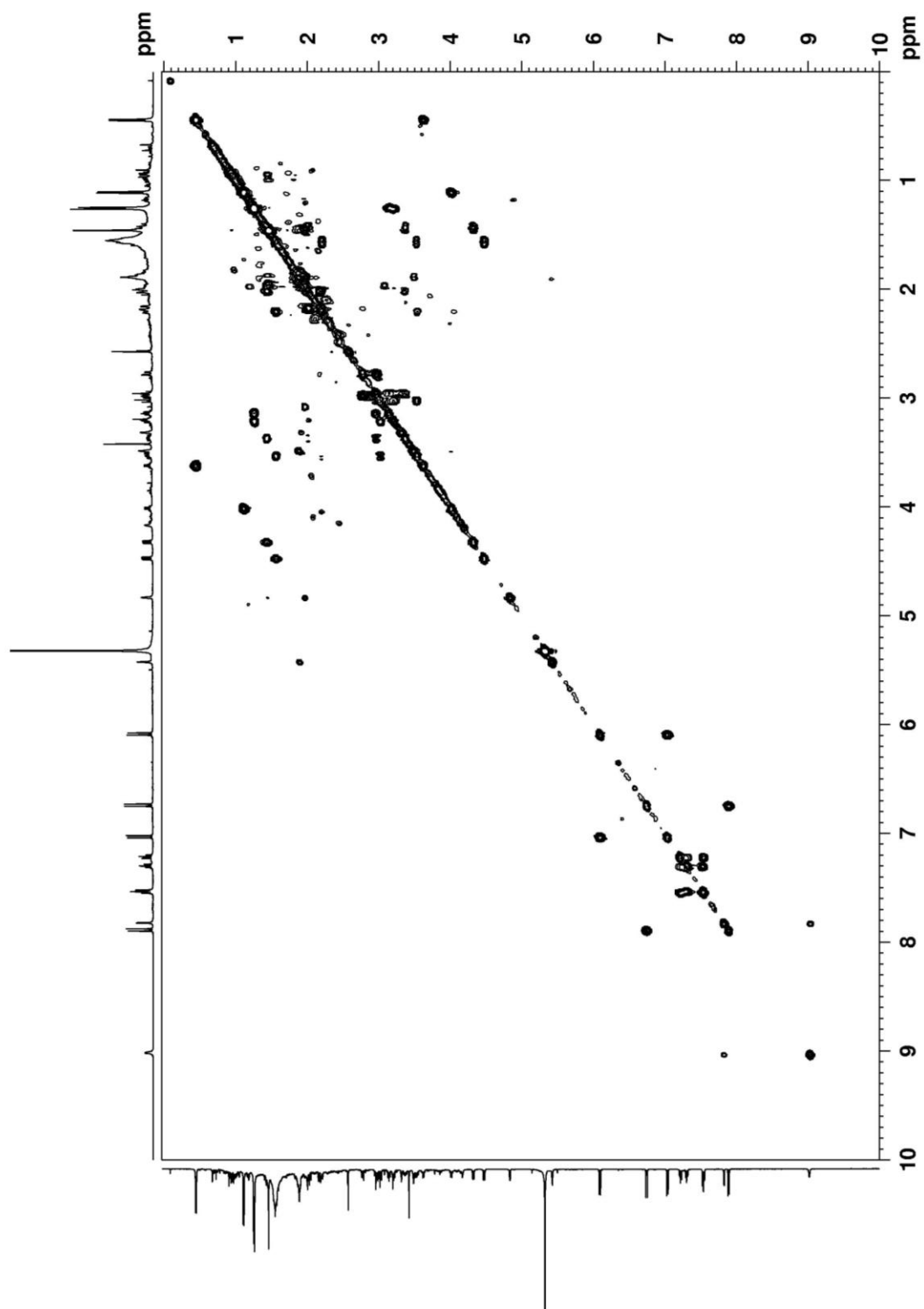
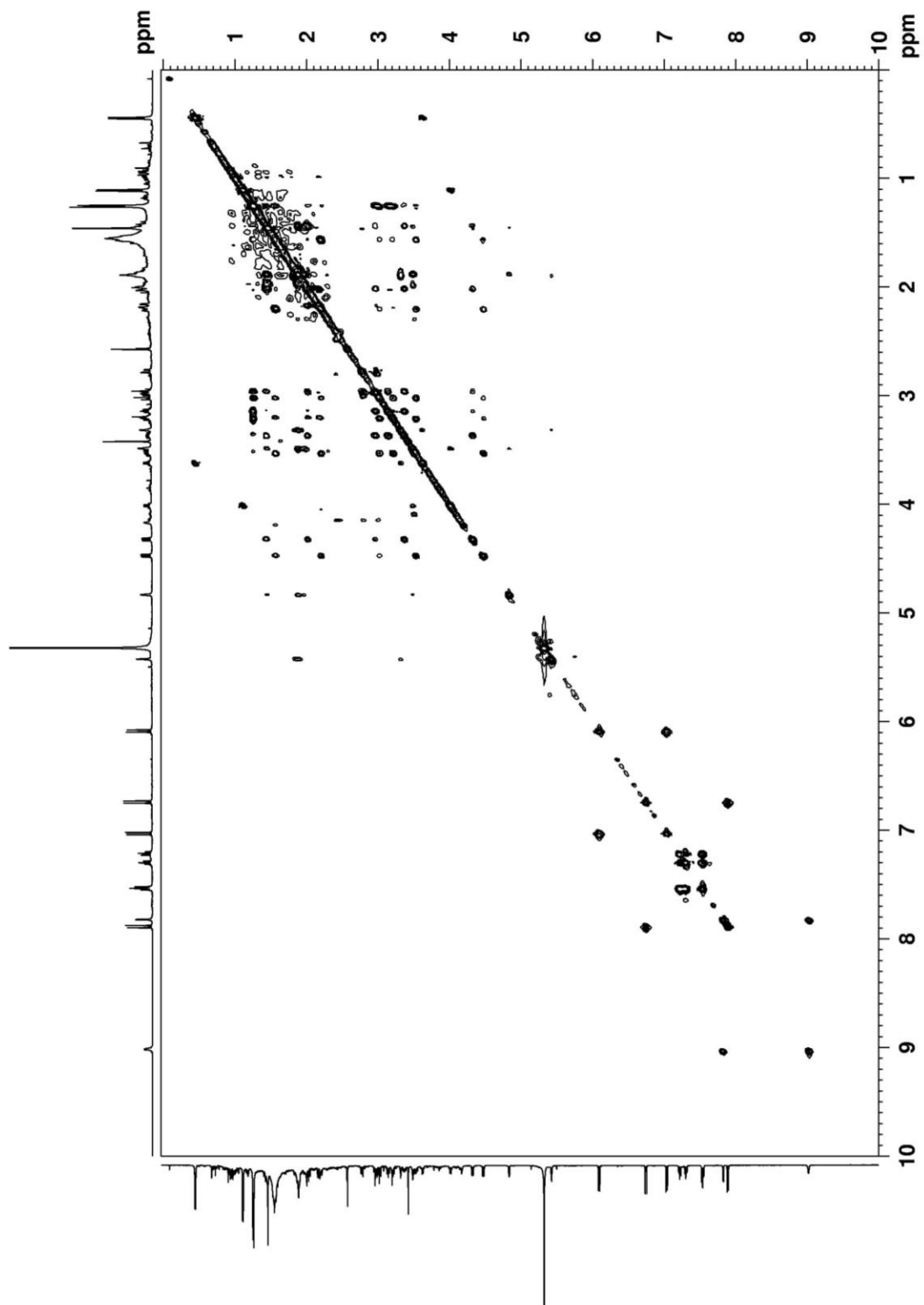


Abbildung 14-43:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (**4**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .



**Abbildung 14-44:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (**4**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

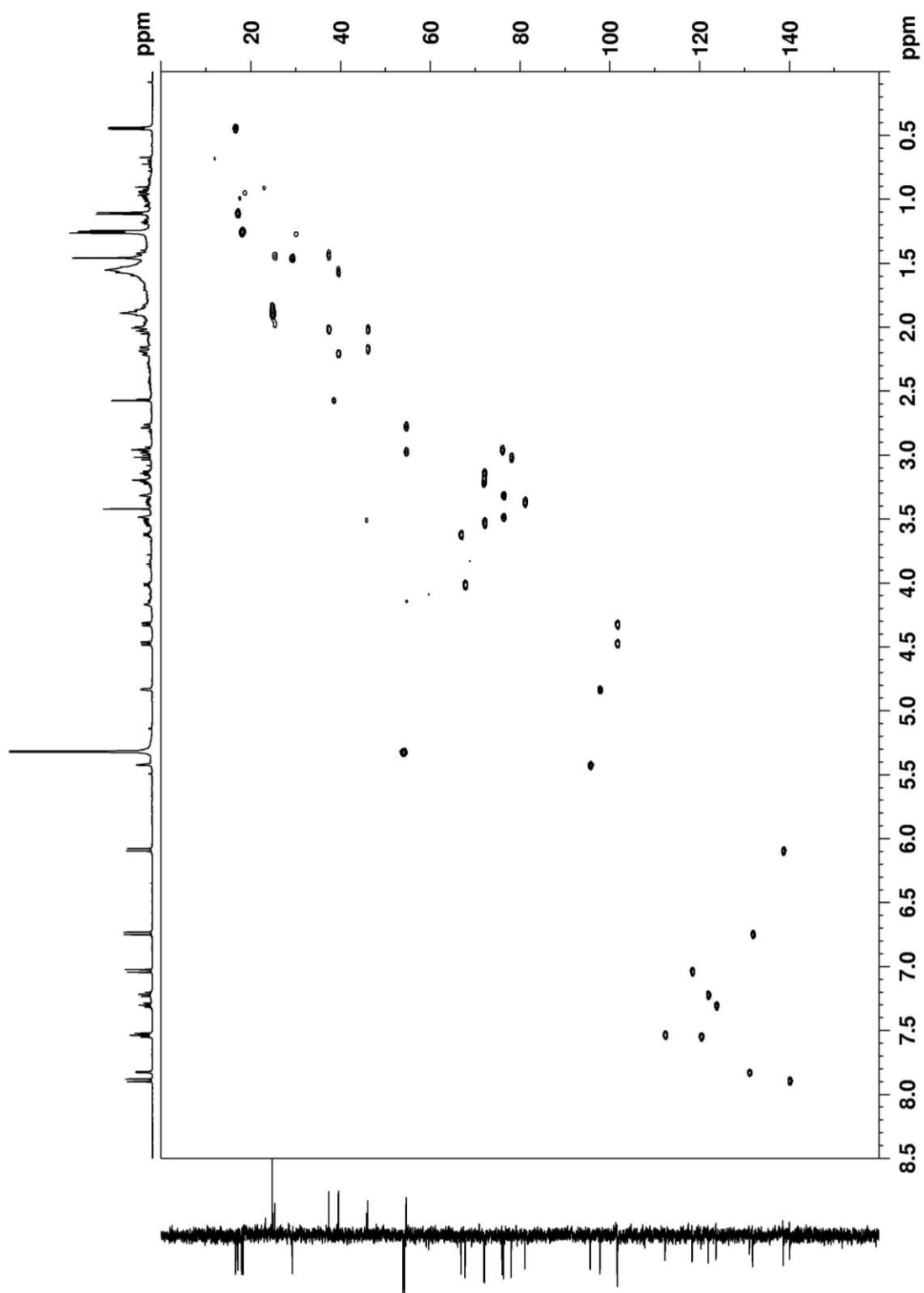


Abbildung 14-45:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (**4**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ - $d_2$ .

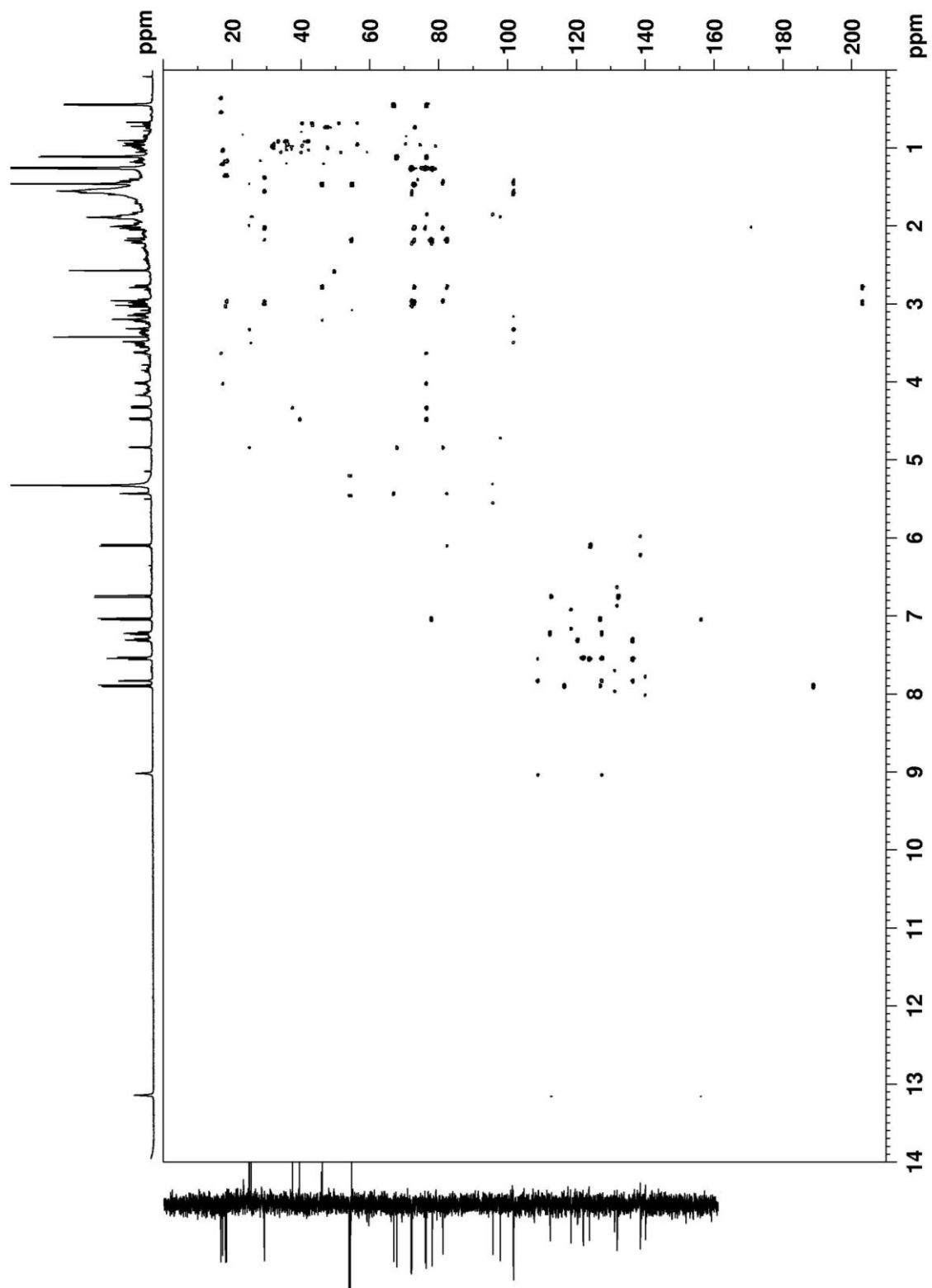


Abbildung 14-46:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (**4**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

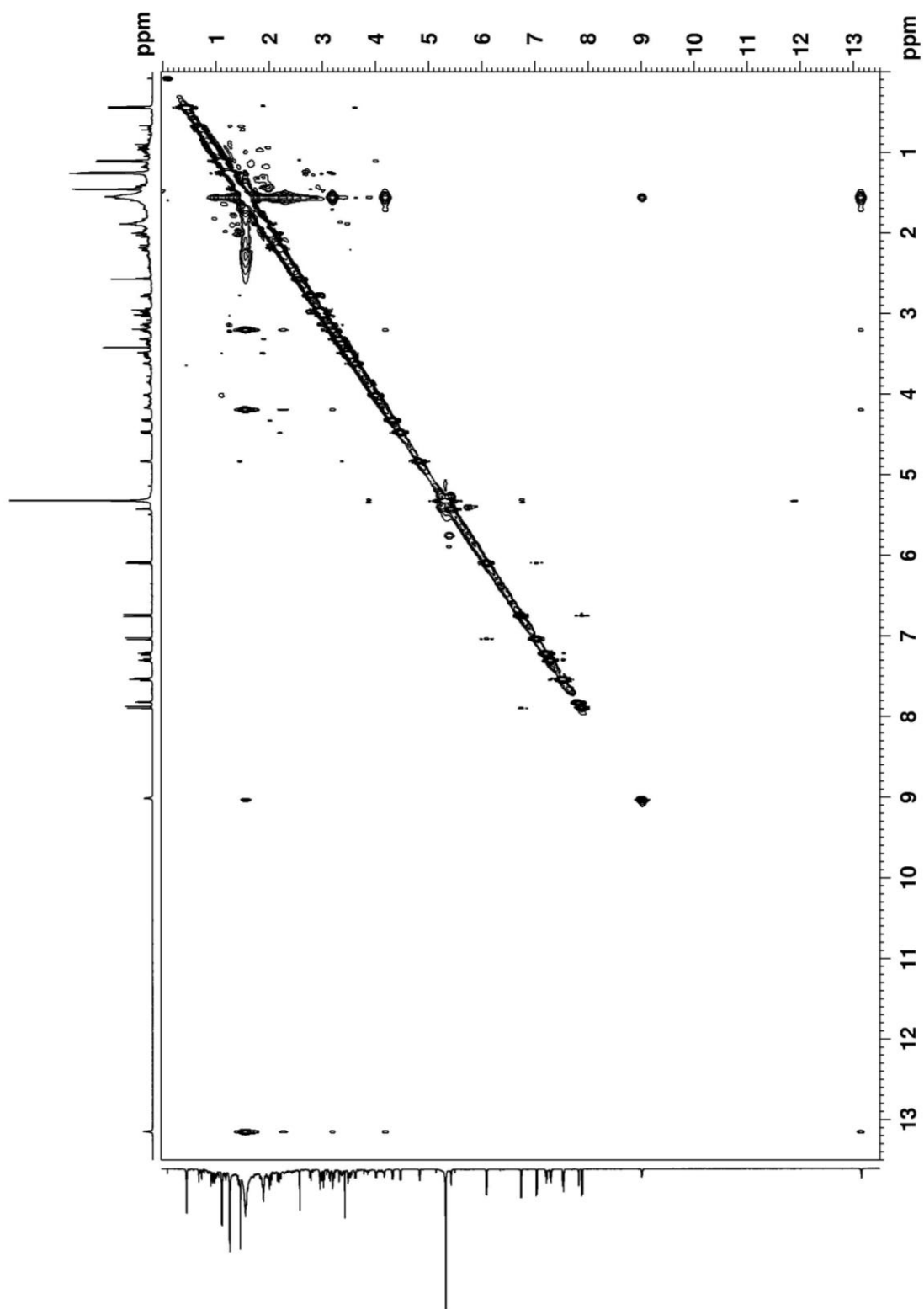


Abbildung 14-47:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B1 (4) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

## 14.6 Langkocyclin B2

**Tabelle 14-6:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und COSY Signale von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

Position	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) (p.p.m.) J in Hz	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) (p.p.m.)	HMBC	COSY
1	—	203.2	—	—
2 <sub>eq</sub>	2.97 (1H, d, 12.0)	54.8	1, 3, 13	2 <sub>ax</sub>
2 <sub>ax</sub>	2.77 (1H, dd, 12.0, 2.7)	54.8	1, 3, 4, 12b, 13	2 <sub>eq</sub>
3	—	73.0	—	—
3-OH	1.67 (1H, s)	—	2, 3, 4, 13	
4 <sub>eq</sub>	2.17 (1H, dd, 14.1, 2.7)	46.4	2, 3, 4a, 12b	4 <sub>ax</sub>
4 <sub>ax</sub>	2.02 (1H, Signalüberlagerung)	46.4	3, 13	4 <sub>eq</sub>
4a	—	77.9	—	—
4a-OH	3.19 (1H, Signalüberlagerung)	—	4, 4a, 12b	—
5	6.09 (1H, d, 9.9)	138.9	6a, 12b	6
6	7.04 (1H, d, 9.9)	118.6	4a, 6a, 7, 12a	5
6a	—	124.2	—	—
7	—	156.2	—	—
7-OH	13.14 (1H, s)	—	6a, 7, 7a	—
7a	—	112.9	—	—
8	—	188.9	—	—
9	6.74 (1H, d, 10.1)	132.1	7a, 11	10
10	7.89 (1H, d, 10.1)	140.2	8, 11, 11a, 3'	9
11	—	132.2	—	—
11a	—	116.6	—	—
12	—	142.7	—	—
12a	—	127.1	—	—
12b	—	82.5	—	—
13	1.46 (3H, s)	29.5	2, 3, 4	—
2'	—	159.2	—	—
3'	—	127.1	—	—
4'	—	108.9	—	—
5'	7.82 (1H, d, 2.8)	131.2	4', 6'a, 10'a	6'
6'	8.99 (1H, s)	—	4', 5', 6'a, 10'a	5'
6'a	—	136.6	—	—
7'	7.53 (1H, d, 7.8, Über-	112.4	9', 10'a	8'

	lagerung mit 7.55)			
8'	7.30 (1H, pt, 7.5, 7.8)	124.0	6'a, 10'	7', 9'
9'	7.22 (1H, pt, 7.5, 7.7)	122.2	7', 10'a	8', 10'
10'	7.55 (1H, d, 7.7 Überlagerung mit 7.53)	120.6	4', 6'a, 8'	9'
10'a	—	127.5	—	—
Zuckersignale				
A1	5.43 (1H, br, s)	95.9	12b, A3, A5	A2 <sub>eq</sub>
A2 <sub>eq</sub>	1.89 (1H, m)	24.8	A4	A3 <sub>eq</sub>
A2 <sub>ax</sub>	1.72 (1H, m)	24.8	—	A3 <sub>eq</sub> , A3 <sub>ax</sub>
A3 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, m)	25.2	A2	A3 <sub>ax</sub>
A3 <sub>ax</sub>	1.82 (1H, m)	25.2	A1, A4	—
A4	3.32 (1H, br, s)	76.5	A3, B1	A3, A5
A5	3.62 (1H, q, 6.5)	67.1	A4, A6	A4, A6
A6	0.45 (3H, d, 6.5)	16.8	A4, A5	A5
B1	4.32 (1H, dd, 9.9, 1.8)	101.9	A4, B2	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub>
B2 <sub>eq</sub>	2.00 (1H, Signalüberlagerung)	37.6	B3, B4	B2 <sub>ax</sub> , B3
B2 <sub>ax</sub>	1.44 (1H, Signalüberlagerung)	37.6	B1, B3	B1, B2 <sub>eq</sub> , B3
B3	3.37 (1H, m)	81.3	B4, C1	B2 <sub>eq</sub> , B2 <sub>ax</sub> , B4
B4	2.96 (1H, pt, 8.5, 8.8)	76.3	B3, B5	B3, B4-OH, B5
B4-OH	4.16 (1H, d, 1.5)	—	B4, B5	B4
B5	3.13 (1H, m)	72.3	B1	B4, B6
B6	1.25 (3H, d, 6.1)	18.5	B4, B5	B5
C1	4.83 (1H, br, s)	98.0	B3, C3, C5	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>eq</sub>	1.97 (1H, Signalüberlagerung)	25.7	C3	C1, C2 <sub>ax</sub>
C2 <sub>ax</sub>	1.45 (1H, Signalüberlagerung)	25.7	C4	—
C3	1.89 (2H, m)	25.0	C4	C2 <sub>eq</sub> , C2 <sub>ax</sub> , C4
C4	3.49 (1H, br, s)	76.5	C2, D1	C3, C5
C5	4.01 (1H, q, 6.6)	68.1	C1, C4, C6	C4, C6
C6	1.11 (3H, d, 6.6)	17.3	C4, C5	C5
D1	4.45 (1H, dd, 9.8, 2.0)	101.9	C4, D2	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub>



D2 <sub>eq</sub>	2.19 (1H, ddd, 12.7, 5.2, 1.8)	37.6	D1, D3, D4	D1, D2 <sub>ax</sub> , D3
D2 <sub>ax</sub>	1.56 (1H, Überlagerung mit H <sub>2</sub> O-Signal)	37.6	D1, D3	D1, D2 <sub>eq</sub> , D3
D3	3.46 (1H, m)	81.1	D4, E1	D2 <sub>eq</sub> , D2 <sub>ax</sub> , D4
D4	3.03 (1H, pt, 8.7, 8.8)	76.3	D3, D5, D6	D3, D5
D4-OH	4.07 (1H, d, 1.6)	—	D4, D5	4D
D5	3.20 (1H, Signalüberlagerung)	72.4	D1	D4, D6
D6	1.27 (3H, d, 6.2)	18.5	D4, D5	D5
E1	4.91 (1H, d, 2.2)	97.9	D3, E3, E5	E2 <sub>eq</sub> , E2 <sub>ax</sub>
E2 <sub>eq</sub>	1.99 (1H, Signalüberlagerung)	24.6	—	E1, E2 <sub>ax</sub> , E3
E2 <sub>ax</sub>	1.55 (1H, dd, 12.6, 2.2)	24.6	E1, E3, E4	E2 <sub>eq</sub> , E3
E3	1.70 (2H, m)	26.2	E1, E4	E2 <sub>eq</sub> , E2 <sub>ax</sub> , E4
E4	3.58 (1H, br, s)	67.7	—	E3, E5
E5	4.10 (1H, q, 6.6)	68.2	E4, E6	E6
E6	1.16 (3H, d, 6.6)	17.4	E4	E5

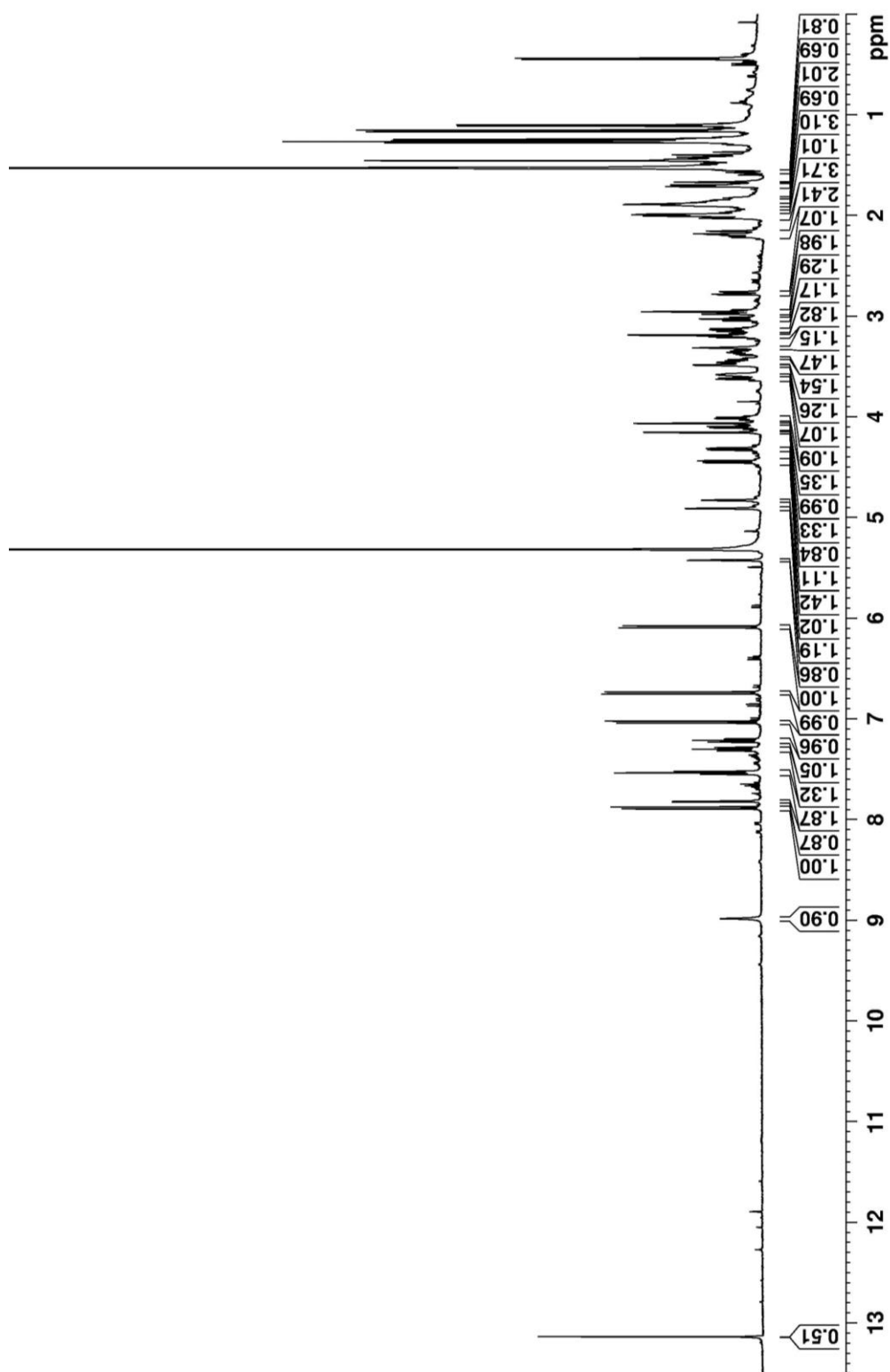


Abbildung 14-48:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Langkocyclin B2 (5) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

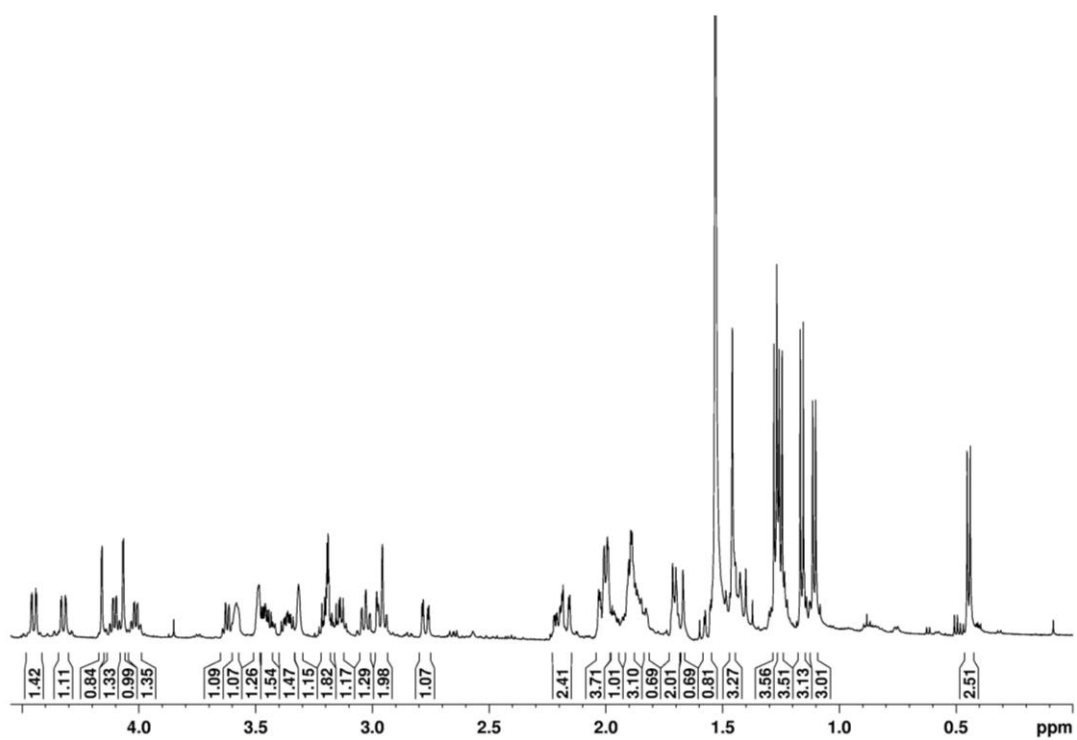


Abbildung 9-49: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (0.0 – 4.5 ppm) von Langkocyclin B2 (5) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.

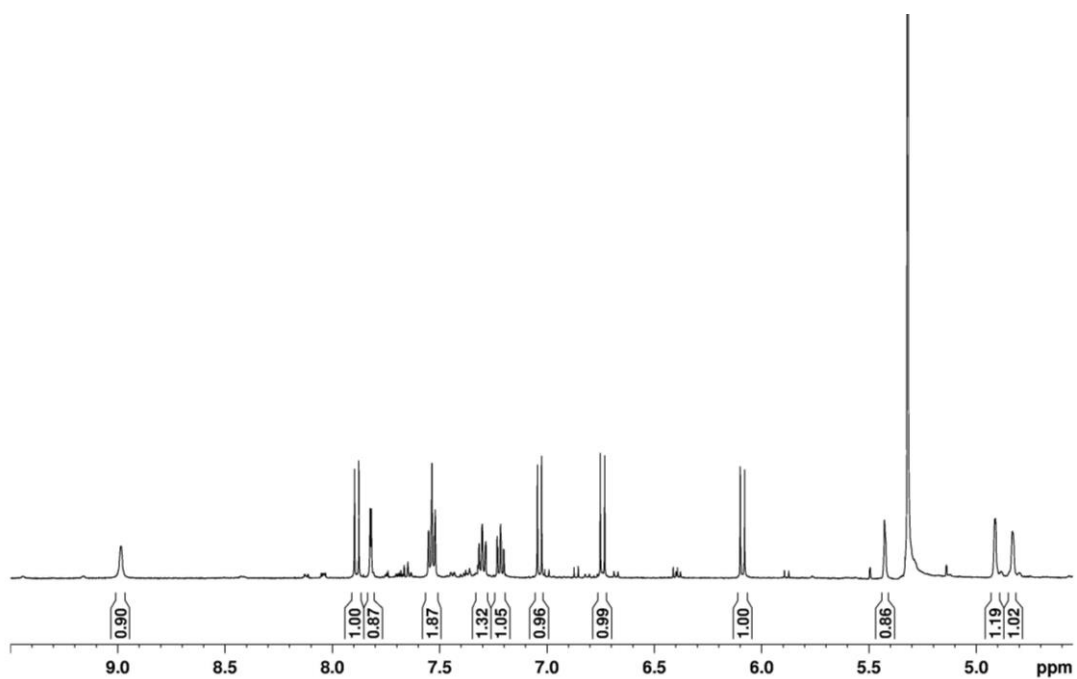
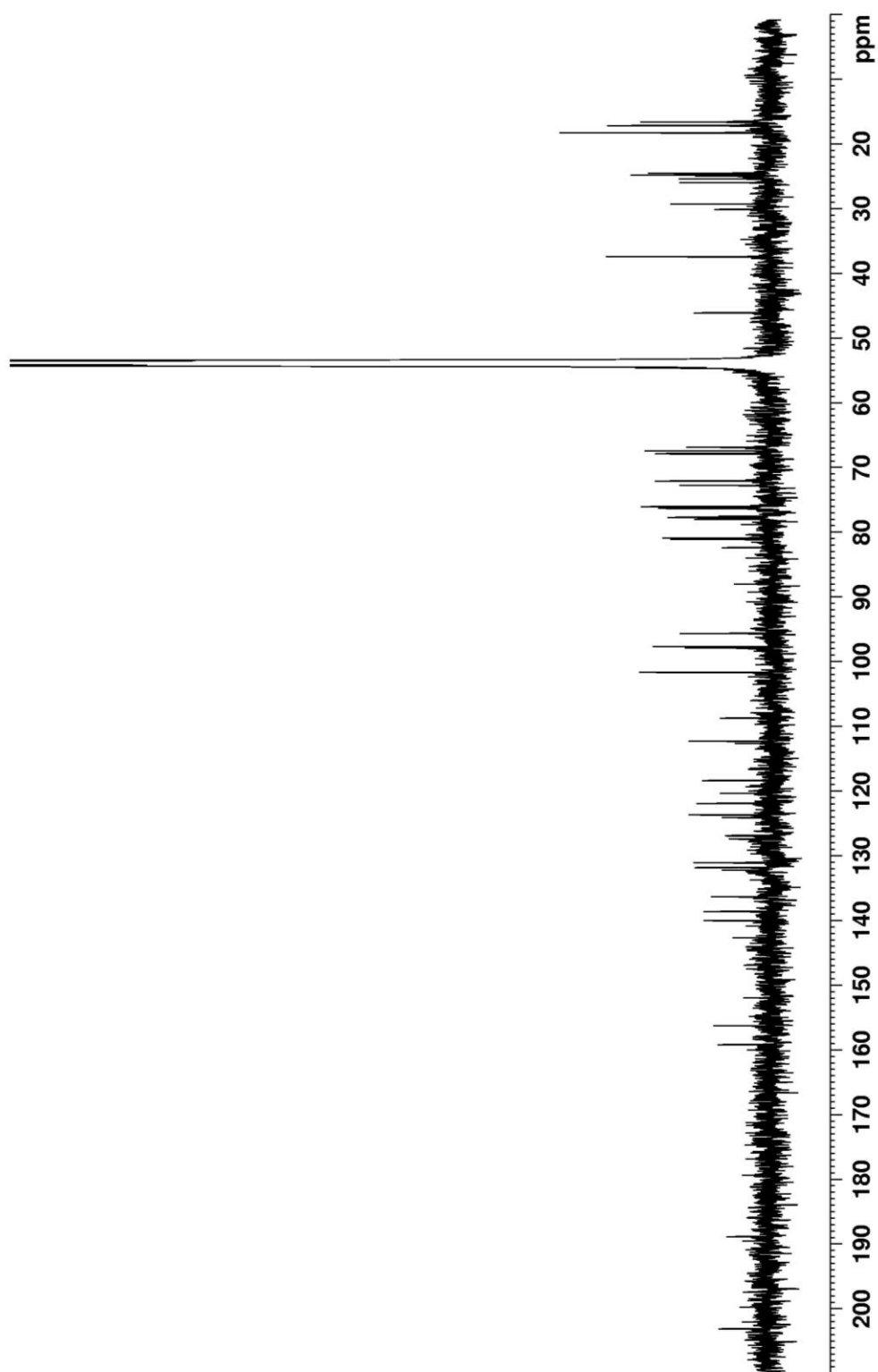


Abbildung 14-50: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (4.5 – 9.5 ppm) von Langkocyclin B2 (5) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>.



**Abbildung 14-51:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

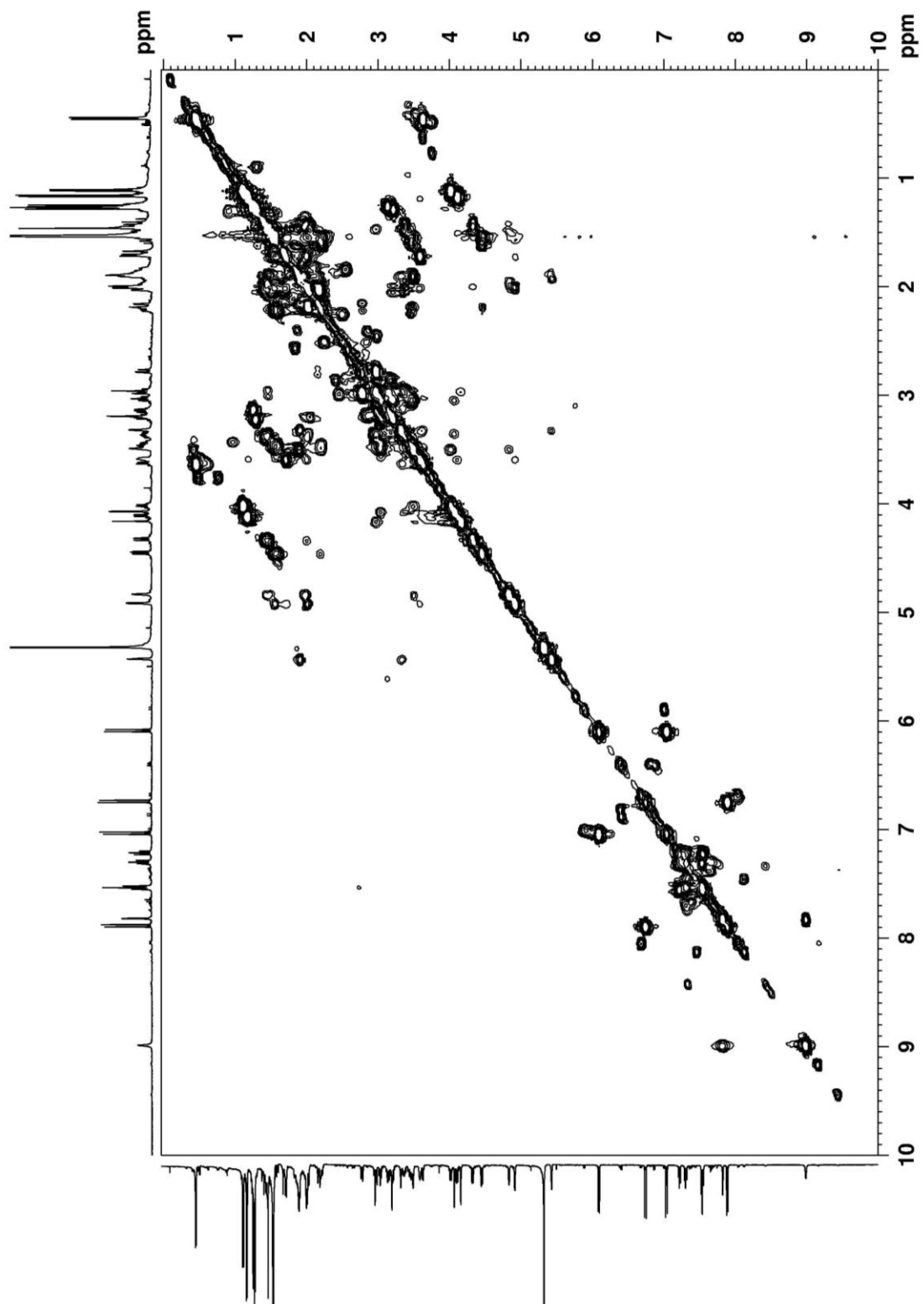


Abbildung 14-52:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

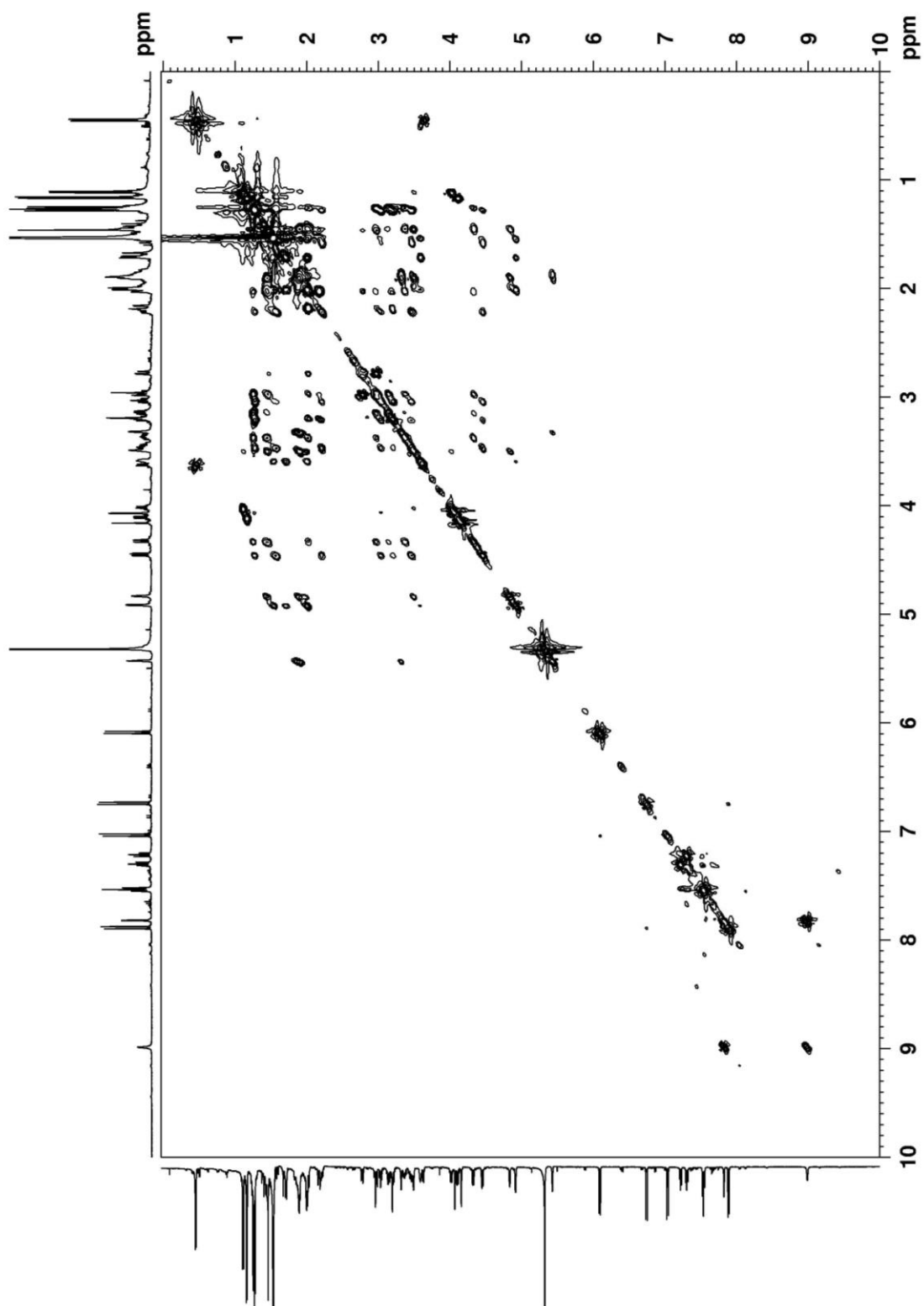


Abbildung 14-53:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .

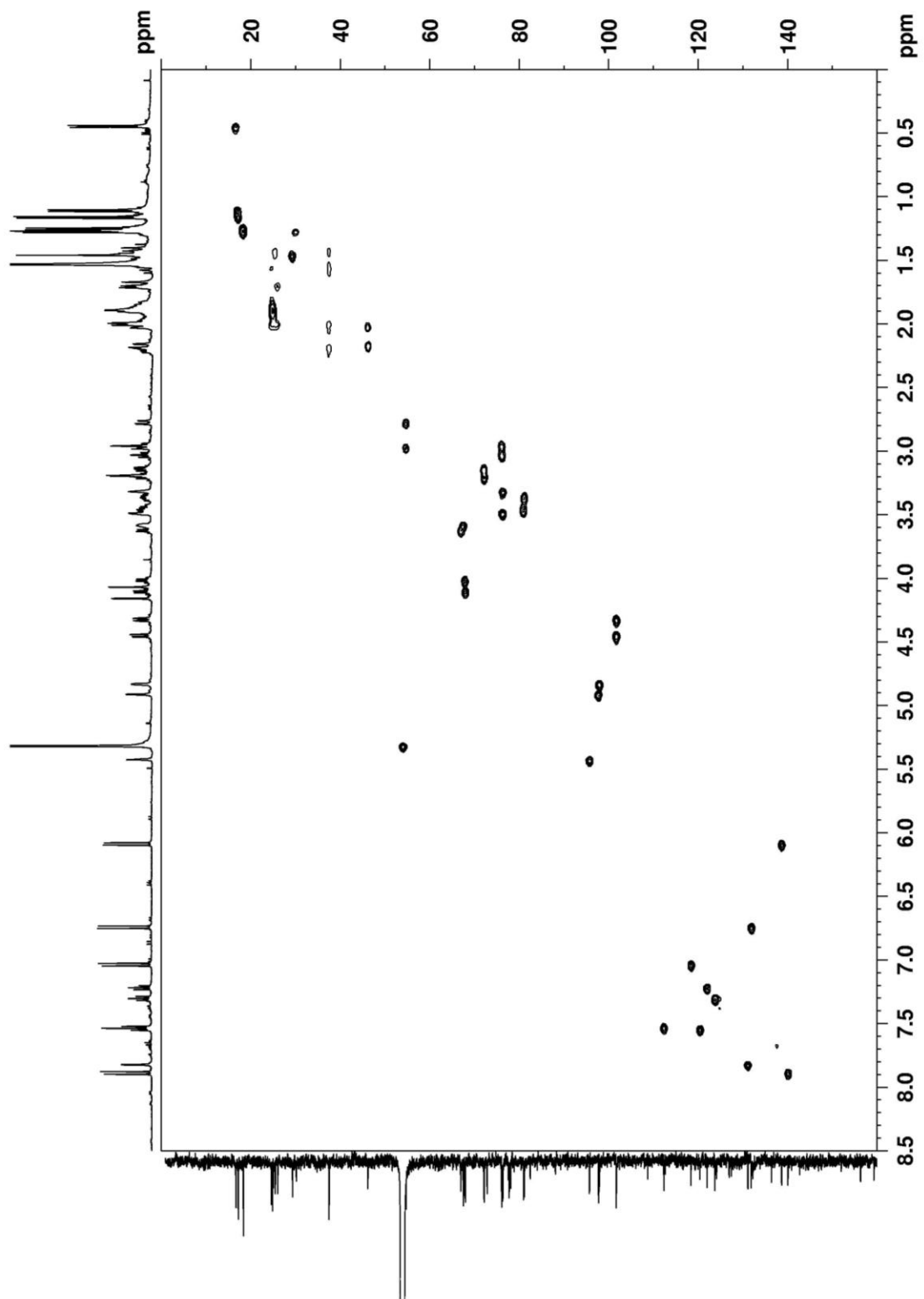


Abbildung 14-54:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (5) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .

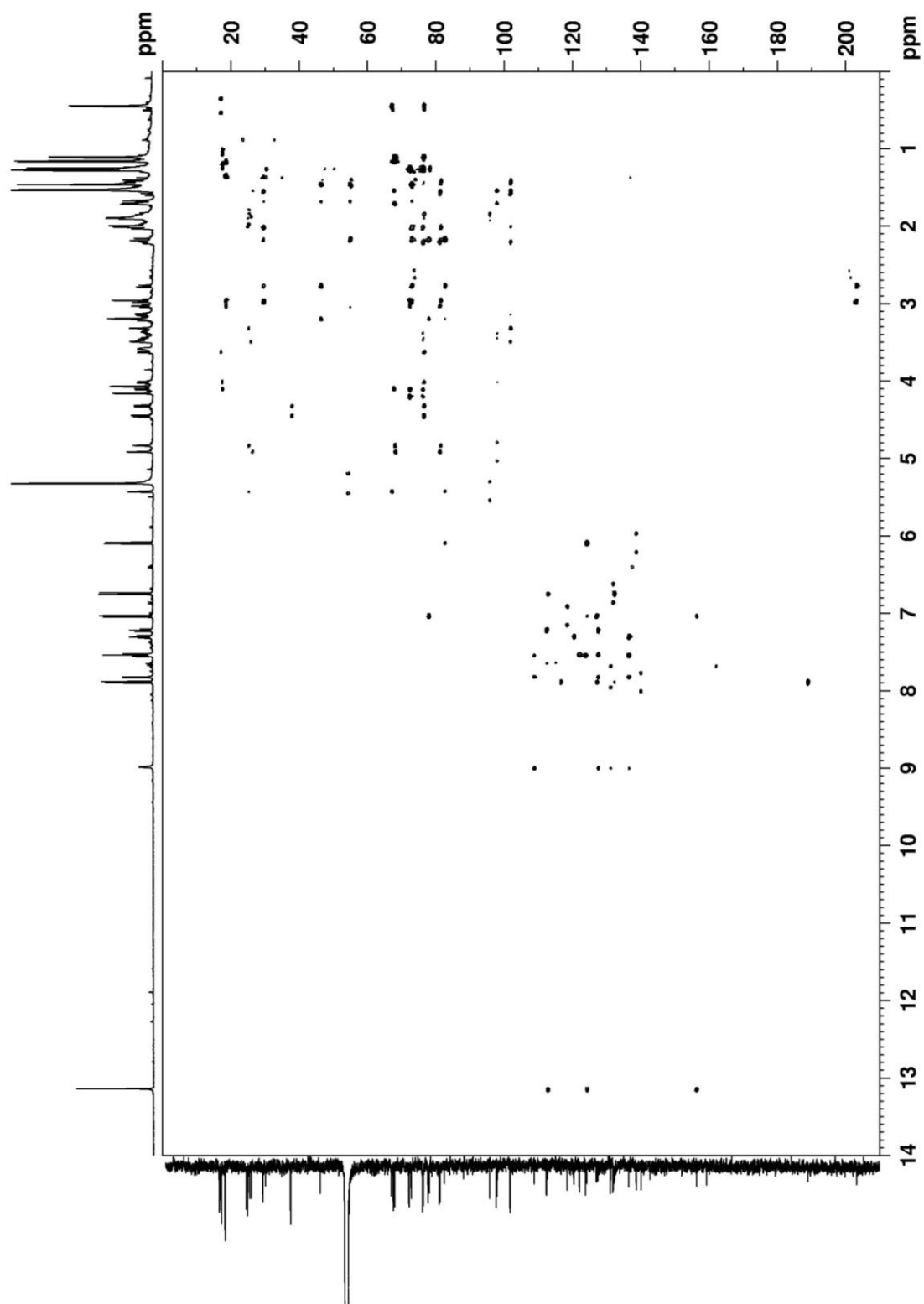


Abbildung 14-55:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2-d_2$ .



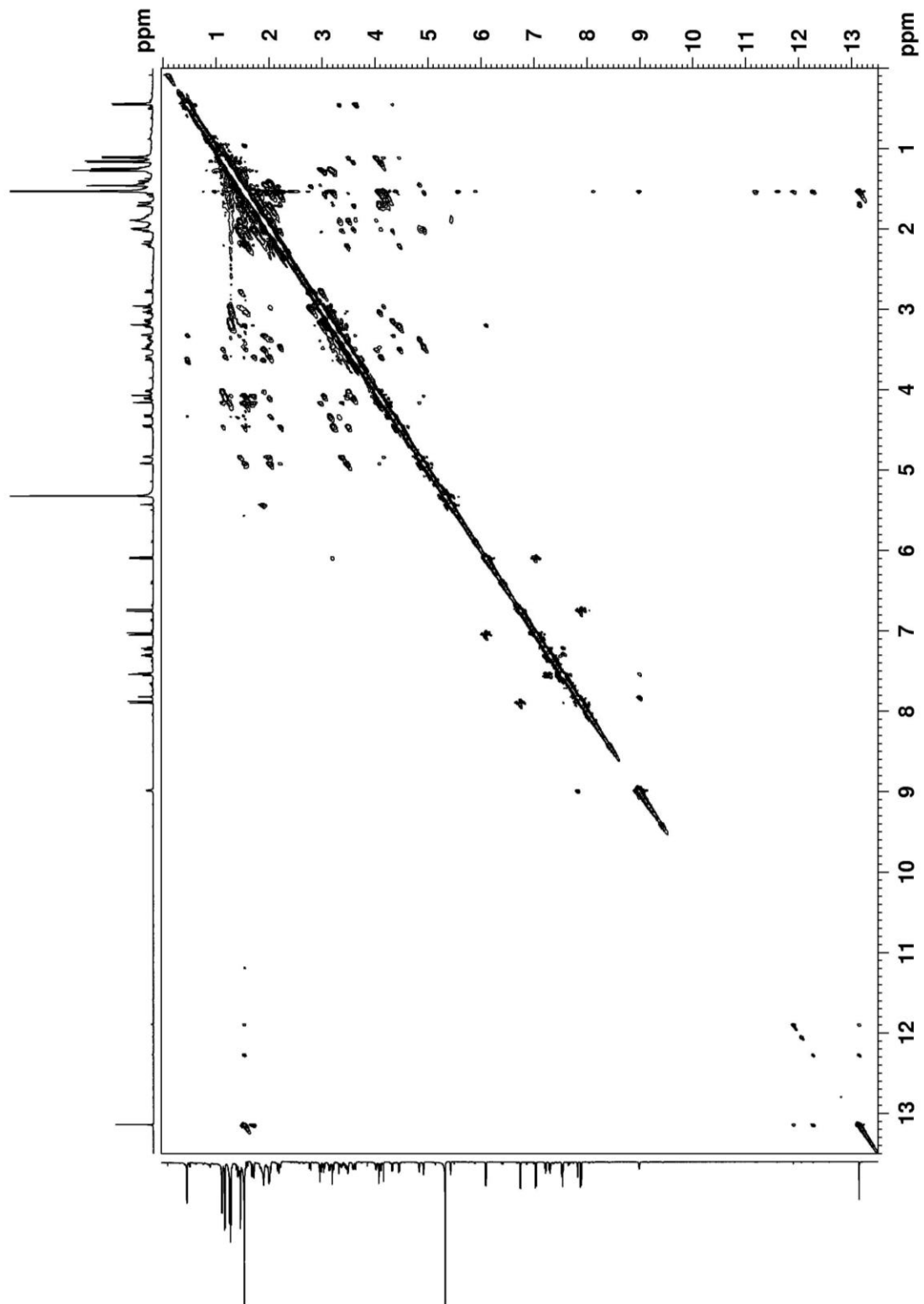


Abbildung 14-56:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Langkocyclin B2 (**5**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-}d_2$ .